

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE 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



Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT

En : Biologie

Spécialité : Physiologie et Biochimie de la Nutrition

Par : **BADI Zouleykha**

Sujet

*Valorisation et effets métaboliques des grignons d'olive de la région de l'ouest
Algérien : Etude Expérimentale*

Soutenue publiquement, le 03 /03 /2024, devant le jury composé de :

Mme MERZOUK Hafida	Professeur	Univ. Tlemcen	Présidente
Mme GUERMOUCHE Baya	Professeur	Univ. Tlemcen	Directrice de thèse
Mme HADDAM Nahida	Professeur	Univ. Tlemcen	Examinatrice
Mme MEDJDOUB Amel	MCA	Univ. Oran	Examinatrice
Mlle IMESSAOUDENE Asmahan	MCA	Univ. Tissemsilt	Examinatrice

Année Universitaire : 2023-2024

«La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de la science..... »

François Jacob



*À l'âme de ma mère, qui nous a quittés très tôt
Ton souvenir reste à jamais gravé dans ma mémoire
Je regrette que tu ne sois pas là en ce jour spécial*



Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir cette thèse.

Je dédie ce modeste travail : À mon père, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation, ma formation et mon bien être.

À mes sœurs Karima et Imane, mes frères Mohammed, Salah Eddine et Hamza.

Que dieu les protèges.

À toute ma grande famille.

À ma chère amie Rougueb Karima.

À tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon cœur.

Remerciements

Avant d'aborder l'exposé de mes résultats, qu'il me soit permis de remercier toutes les personnes qui, à des degrés divers, ont contribué à faciliter l'élaboration de cette étude.

Dans un premier temps, je souhaite remercier ma directrice de thèse Madame **GUERMOUCHE Baya**, Professeur à l'Université de Tlemcen et membre du Laboratoire de Recherche Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition où j'ai effectué mes travaux de recherche. Elle n'a épargné aucun effort pour que ce travail s'effectue dans les meilleures conditions. Je voudrais lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir guidé sur la voie de la recherche scientifique, pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé au laboratoire. Son soutien s'est avéré déterminant pour mener ce travail à terme. Merci pour cette confiance sans faille, pour les encouragements dans les moments difficiles comme dans les bons, et d'avoir toujours cru en moi. Nul doute que ce soutien a été très précieux. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je suis très reconnaissante à madame la professeur **MERZOUK Hafida** de l'Université de Tlemcen pour avoir accepté de juger ce travail ; je suis très sensible à l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury. Merci aussi de vos conseils, et pour m'avoir donné la chance de travailler sur ce sujet de thèse et m'accueilli dans leur laboratoire, que pour m'avoir guidée dans mon travail durant ces années.

Que madame **HADDAM Nahida**, professeur à l'Université de Tlemcen et madame **MEDJDOUB Amel** MCA à l'université d'Oran, mademoiselle **IMESSAOUDENE Asmahan** MCA de l'université de Tissemsilt, trouvent ici l'expression de ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon étude. Je les remercie, vivement, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée en acceptant de juger ce travail, et pour les précieux conseils.

Un grand respectueux remerciement va à Madame **BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila**, professeur à l'Université de Tlemcen, qui n'a pas hésité de m'aider. J'ai eu le privilège de bénéficier de son enseignement, ses conseils, son savoir et de sa grande expérience, qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie en particulier Madame **LOUKIDI Bouchra**, professeur à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir apporté de l'aide lorsque j'en avais besoin, ses conseils techniques, son assistance et surtout pour sa bonne humeur.

Je voudrais aussi remercier Monsieur **KECHEKOUCHE Youssouf**, pour ses orientations et son aide dans l'étude statistique. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Un remerciement amical pour ma chère amie et sœur **ROUIGUEB Karima**, doctorante dans laboratoire de recherche Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition pour son soutien pratique et moral, son bon humour, sa gentillesse, sa simplicité et pour tout les moments inoubliables gravés à jamais dans notre mémoire.

Je voudrais également adresser mes remerciements au docteur **TALEB Fouzi**, responsable de laboratoire d'histologie, faculté de Médecine pour leur accueil et leur aide durant notre stage pratique ; ainsi docteur **BENZAZOUA Nassima** pour ses orientations, son soutien pratique et sa gentillesse, et à toute l'équipe du laboratoire d'Anatomie Pathologique CHU. Tlemcen en particulier docteur **BENZARDJEB Hadjer** pour son aide, ses conseils et pour le temps que vous avez consacré pour la réalisation de ce modeste travail. Qu'elle soit assurée de ma considération et de toute mon estime.

Pendant ces années de thèse au laboratoire PPABIONUT, j'ai eu le plaisir de travailler avec des personnes qui ont eu un rôle fondamental pour l'aboutissement de mon travail. Merci à tous les chercheurs, les enseignants-chercheurs, les ingénieurs et les techniciens pour leur aide au quotidien et leur bonne humeur. Je tiens à remercier particulièrement l'ingénieur **Fadia** pour toutes nos discussions et ses conseils tout au long de ma thèse.

A la mémoire de celle qui nous a quittées très tôt, ma chère amie **HACHEMI Leila**, paix à son âme.

Enfin, il m'est agréable d'exprimer mes sincères remerciements à tous les enseignants qui ont participé à ma formation, et à toute personne ayant contribué à la réalisation de ce projet de thèse.

Mes vifs remerciements à mes parents de m'avoir fait confiance, de m'avoir toujours soutenu et encouragé dans tous les moments. Sans eux je ne serais pas là, et surtout je ne serais pas moi-même.

Et à tous ceux que j'aurais oubliés bien involontairement, merci !

AVANT PROPOS

Ce travail de doctorat a été réalisé en grande partie au laboratoire PPABIONUT, Université de Tlemcen. Une petite partie des manipulations a été faite au laboratoire de Produits naturels, Tlemcen.

Le travail exposé dans cette thèse de doctorat a fait l'objet de publication scientifique et a été présenté par communications lors des congrès scientifiques internationaux et nationaux.

Publication Internationale

Badi Z, Guermouche B, Haddam N, Belyagoubi N, Rouigueb K, Benzerjeb H, Dali-Sahi M, Kechkouche Y, Merzouk H (2022). Assessment of acute and sub-acute toxicity of olive pomace in female Wistar rats. *World Cancer Res J.* 9:2359.

Communications Nationales et Internationales

Guermouche Baya, **Badi Zouleykha**, Merzouk Hafida (2019). Etude de la toxicité aigüe et détermination de la DL₅₀ de l'extrait brut éthanolique de grignon d'olive traités aux pesticides de la région de Tlemcen. First National Scientific Day of Biotechnology and Bioactivity: Le 27 Novembre 2019, Oran.

Guermouche B, **Badi Z**, Haddam N, Loukidi B, Rouigeb K, Merzouk H (2019). Etude de la toxicité aigüe et détermination de la DL₅₀ de l'extrait brut éthanolique de grignon d'olive traités aux pesticides de la région de Tlemcen. 3ème CONGRÈS MÉDITERRANÉEN EN BIO-ANALYSES- CMB: Toxicologie, Ecotoxicologie, Aliment et Santé : Le 13-15 Décembre 2019 à Mahdia, Tunisie.

Badi Z, Guermouche B, Imessaoudene A (2021). Activité anti-inflammatoire in vitro des extraits éthanolique et méthanolique des grignons d'olive. *SÉMINAIRE INTERNATIONAL SUR LES SCIENCES NATURELLES ET DE LA VIE (webinaire)*, organisé par *International Journal of Human Settlements* : Le 19 et 20 Février 2021. Oran.

Badi Zouleykha, Guermouche, B. Rouigueb, K., Haddem, N. and Merzouk, H (2021). Evaluation des paramètres hépatiques et rénales au cours de la toxicité subaiguë par l'extrait méthanolique des grignons d'olive. *Séminaire National (Webinaire) : Bio-ressources : Nutrition, Santé et Environnement* : Le 17-18 Mai, 2021. Université Mohamed Boudiaf-M'sila.

BADI ZOULEYKHA, GUERMOUCHE B, HADDAM N, LOUKIDI B, ROUIGUEB K, BEN HAMOU N, MERZOUK H (2021). Etude de la toxicité subaiguë de l'extrait brut phénolique de grignons d'olive. *Webinaire National sur « Valorisation des matières résiduelles du secteur agro-alimentaire »* : Le 26 juin 2021. Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition (PPABIONUT). Tlemcen.

Benmeliani Fatiha, Guermouche B, **Badi Z**, Tahir F.Z (2021). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique et éthanolique des grignons d'olive. *Webinaire National sur « Valorisation des matières résiduelles du secteur agro-alimentaire »* : Le 26 juin 2021. Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition (PPABIONUT). Tlemcen.

Badi Zouleykha, GUERMOUCHE B., ROUIGUEB K., LOUKIDI B., BEN HAMMOU N., MERZOUK H (2021). Effet de l'extrait des grignons d'olive sur quelques paramètres biochimiques chez les rats rendus obèses. *4ème Congrès International de la SAN* : Le 16-17 Octobre 2021. Oran.

BADI Zouleykha, Guermouche B, Loukidi B, Rouigueb K, Ben Hamou N, Hachemi L, Merzouk H (2021). Etude des caractères phytochimique des polyphénols de l'extrait méthanolique des grignons d'olive dans la région de Tlemcen. *The seventh MGIBR International Seminar of Startups and smart agriculture "Train the next generation of farmers prosperous"* : Le 15-16 Décembre 2021. Tlemcen.

Zouleykha BADI, GUERMOUCHE B., ROUIGUEB K., LOUKIDI B., HACHEMI L., MERZOUK H (2022). Dosage des paramètres de stress oxydatif au niveau hépatique chez les rats obèses gavés aux grignons d'olive. *Journée Nationale de la SAN* : le 15 Octobre 2022 à Alger, Faculté des Sciences Biologiques (USTHB).

Zouleykha Badi, Baya Guermouche, Karima Rouigueb, Bouchra Loukidi, Hafida Merzouk (2022). Evaluation des caractères phytochimiques des grignons d'olive à la fin de les valoriser dans la Wilaya de Tlemcen. *Journée d'Etude sur la Promotion de l'Economie Forestière* : le 22 décembre 2022 à la Faculté SNV-STU de l'Université de Tlemcen.

Badi Zouleykha, Guermouche B, Rouigueb Karima, Loukida Bouchra, Ben Hammou N, Merzouk H (2022). The effect of olive pomace on lipid parameters during obesity: Experimental study. *Le 5ème séminaire LAREDIAB et des 11ème journée AMIWIT* : Le 9-10 Décembre 2022. Faculté de Médecine Benouda Benzerdjeb. Tlemcen.

Résumé

Le rejet des effluents des industries productrices d'huile d'olive tels que les grignons d'olives et les margines pose un problème majeur surtout dans les pays du Bassin Méditerranéen. Ces rejets fortement pollués causent de sérieux dégâts environnementaux.

Ce travail se focalise sur la mise en évidence l'effet métabolique et l'activité anti-oxydante de l'extrait des grignons d'olive in vivo (étude expérimentale) à la fin de valoriser ce déchet précieux. Pour faire ce travail on a évalué l'activité anti-oxydante de l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive ceci a été fait par plusieurs techniques : la capacité anti-oxydante totale, DPPH, Pouvoir de réduction du Fer (FRAP). En outre, les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensées ont été mesurées par des techniques spectrophotométriques. L'effet métabolique de l'extrait des grignons d'olive est déterminé chez les rats Wistar rendus obèses par un régime cafeteria par l'administration d'une dose de 200mg/kg du poids corporel d'extrait des GO en évaluant les paramètres biochimiques (glucose, cholestérol, triglycérines, TGO, TGP, créatinine et l'urée) aussi les paramètres de statut Redox (vitamine C, SOD, GSH, catalase, MDA et protéines carbonylés) au niveau érythrocytaire et tissulaire. De plus on a étudié la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait des grignons d'olive chez les rats Wistar à différentes doses en déterminant la dose à effet toxique par l'étude des paramètres biochimiques et des paramètres de stress oxydatif et même l'effet au niveau des organes (foie, rein et tissu adipeux) en réalisant des coupes histologiques. Finalement on a évalué quelques activités biologiques de notre extrait in vitro, tel que l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique. Nos résultats montrent que l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive délipidé et non délipidé sont riches en polyphénols, flavonoïdes et présentent une activité anti-oxydante importante dans les deux tests DPPH et FRAP. In vivo notre extrait montre un effet métabolique très important au cours d'obésité en diminuant le taux de glucose, cholestérol et TG. De plus une amélioration de l'activité anti-oxydante au niveau érythrocytaire et tissulaire. Les tests de toxicité montrent que l'extrait des GO a un effet toxique sur les paramètres biochimique à la dose 500mg/kg et au niveau des organes à partir de la dose 2000mg/kg. D'autre part l'extrait des GO délipidé et non délipidé montrent une activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique très importantes.

En conclusion l'extrait hydro-méthanolique des GO montre des résultats excellents *In vivo* et *In vitro* et présente une source précieuse des composés bioactifs qui méritent d'être réutiliser au niveau nutritifs et pharmaceutiques.

Mots clés : grignons d'olive- extrait hydro-méthanolique- obésité- extrait dé lipide- extrait non dé lipide- polyphénols-paramètres biochimiques- paramètres de stress oxydatif- toxicité aiguë et subaiguë- activité biologiques

Tables des matières

Introduction Générale.....	01
Chapitre I : Etude phytochimique.....	05
I-L'oléiculture à Tlemcen.....	05
II- Procédés d'obtention l'huile d'olive	06
II-1-Procédé discontinu ou système à presse.	06
II-2-Procédé continu ou système à centrifugation.....	07
II-3- Secteur oléicole : entre la production et les coproduits.	07
III-Les grignons d'olives : un déchet précieux.....	08
III-1-Généralités	08
III-2- La composition de grignon d'olive.....	08
III-2-1-Caractéristiques physiques	08
III-2-2-Caractéristiques chimiques.....	09
Matériels et Méthodes	11
I- Préparation du substrat végétal.....	11
II-Extraction.....	11
II-1-Extraction avec délipidation	11
II-2- Préparation des extraits hydro-méthanoliques	12
II-3- Criblage phytochimique.....	12
III-Dosage phytochimique des extraits	14
III-1-Dosage des polyphénols	14
III-2-Dosage des flavonoïdes	14
III-3-Dosage des tanins	15
IV- L'activité anti-oxydante.....	15
IV-1- Piégeage des radicaux libres DPPH	15
IV-2- La réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	16
V-Analyse les statistiques	16
Résultats et Interprétation.....	17
I-1-Tests phytochimiques.....	17
I-2-Rendements des extraits	18
I-3-Rendement de l'extraction d'huile des grignons d'olive	18
II-1- Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins.....	18
II-2-Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux	19

II-3-Dosage des polyphénols totaux dans l'extrait délipidé et non délipidé	19
II-4-Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.....	20
II-5-Dosage des flavonoïdes.....	20
II-6- Dosage des tanins.....	21
II-7-Dosage des tanins condensés	21
III-Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits.....	22
III-1-Le piégeage du radical libre DPPH	22
III-2-La réduction du fer (FRAP).....	23
Discussion.....	25
Conclusion.....	28
Chapitre II : Effet métabolique et l'activité anti-oxydante de l'extrait du grignon d'olive au cours d'obésité	29
I- L'obésité : maladie du siècle	29
I-1-Généralités.....	29
I-2- Les différents stades d'obésité	29
I-3- Les types d'obésité	30
I-4- Les causes et les facteurs de risque de l'obésité.....	31
I-5- Physiopathologie de l'obésité.....	32
I-5-1- Le tissu adipeux	32
I-5-2- Obésité et Tissu adipeux	33
I-6- Les complications liées à l'obésité.....	34
I-7- La prise en charge de l'obésité : lutte contre le poids enjeux médicaux et sociaux.....	37
II- Stress Oxydatif	39
II-1- Définition	39
II-2- Les radicaux libres	39
II-3- Les antioxydants	40
II-3-1- Les antioxydants enzymatiques	41
II-3-2 -Les antioxydants non-enzymatiques.....	43
II-4- Le stress oxydatif et l'obésité.....	45
III- Valorisation des grignons d'olive	47
Matériels et Méthodes	49
I- Matériel Végétal	49
I-1- Préparation de l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive.....	49

I-2- Préparation de la solution du gavage.....	49
II- Matériel Animal	49
II 1- Dosage des paramètres biochimiques.....	51
II-2- Détermination des paramètres de statut oxydant, antioxydant	54
II-3- Étude Histologique.....	55
III-Analyse statistique	57
Résultats et Interprétation.....	58
I-Rendement d'extraction.....	58
II-2- Effet de l'extrait des GO sur les paramètres biochimiques.....	58
II-2-1- Teneurs plasmatiques en glucose chez les rats témoins et les rats expérimentaux	59
II-2-2- Teneurs plasmatiques en protéines totales chez les rats témoins et les rats expérimentaux	59
II-2-3- Teneurs plasmatiques en cholestérol, en triglycérides et en HDLc chez les rats témoins et les rats expérimentaux	59
II-2-4- Teneurs plasmatiques en transaminases chez les rats témoins et les rats expérimentaux	59
II-2-5- Teneurs plasmatiques en urée et en créatinine chez les rats témoins et les rats expérimentaux	60
II-3- Effet de l'extrait des GO sur les paramètres de stress oxydatif	63
II-3-1- Teneur plasmatique en vitamine C	63
II-3-2- Détermination de l'activité érythrocytaire de la superoxyde dismutase, de la Catalase et de Glutathion réduit chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	63
II-3-3- Teneurs érythrocytaires en malondialdéhyde (MDA) et en protéines carbonylés chez les rats témoins et les rats expérimentaux	63
II-4- Effet de l'extrait des GO sur les organes	64
II-4-1- Variation des poids des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux	64
II-4-2- Teneurs en cholestérol des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux ...	65
II-4-3- Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux.	65
II-4-4- Teneurs en protéines totales (mg.g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux	66
II-4-5- Teneurs en malondialdéhyde (MDA) au niveau des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux	66
II-4-6- Teneurs en Glutathion (GSH) au niveau des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux	66

II-4-7- Teneurs en Catalase au niveau des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux	66
II-4-8- Teneurs en superoxyde dismutase (SOD) au niveau des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux	66
II-4- Effet d'extrait hydro-méthanolique des GO au niveau tissulaire.....	71
II-4-1- Influence d'extrait des GO sur l'histologie du foie	71
II-4-2- Influence d'extrait des GO sur l'histologie des reins	72
II-4-3- Influence d'extrait des GO sur l'histologie du tissu adipeux	73
Discussion.....	75
Conclusion.....	82
Chapitre III : Etude de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait des grignons d'olive....	83
I- Notion de Toxicologie	83
II-1- Toxicité	83
II-2- Les relations « dose-effet » et « dose-réponse »	84
II-3- La toxicité et l'organe cible	85
III- Les différentes formes de toxicité.....	86
III-1- Toxicité aiguë	87
III-2- Toxicité subaiguë.....	88
III-3- Toxicité chronique	88
Matériels et Méthodes.....	89
I- Préparation de L'extrait	89
II- Animaux d'expérimentation.....	89
II-1-Étude de la toxicité aiguë 90	89
II-2- Étude de la toxicité subaiguë	90
II-3-Détermination des paramètres hématologiques	91
II-4-Détermination des paramètres biochimiques et de stress oxydatif	89
III- Analyse statistique	91
Résultats et Interprétation.....	91
I- Évaluation de la toxicité aiguë.....	91
I-1- Mortalité et observation des comportements	91
I-2-Évaluation du poids corporel.....	92
I-3- Poids relatifs des organes	93
I-4-Paramètres biochimiques.....	94

I-5-Paramètres de stress oxydatif	95
II- Évaluation de la toxicité sub-aiguë	96
II-1- Signes cliniques	96
II-2- Évaluation du poids corporel	97
II-3- Poids relatif des organes	97
II-4- Paramètres hématologiques	98
II-5- Paramètres biochimiques.....	100
II-6-Paramètres de stress oxydatif.....	102
II-7-Étude histologique de foie, rein et tissu adipeux	103
Discussion.....	106
Conclusion.....	110
Chapitre IV : Etude de quelques activités biologiques de l'extrait des grignons d'olive	109
I- Activité anti-inflammatoire	109
I-1- L'inflammation.....	109
I-2- Physiopathologie de l'inflammation	109
I-3- Le processus anti-inflammatoire	111
I-3-1- Les anti-inflammatoire stéroïdiens	111
I-3-2- Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS).....	111
II- Hémolyse.....	112
II-1- Définition	112
II-2- Hémolyse pathologique.....	112
Matériels et Méthodes.....	114
I-Obtention des extraits végétaux.....	114
II- Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRH)	114
III- Étude des activités biologiques	115
III-1- Test de cytotoxicité.....	115
III-2- Évaluation de l'activité anti-hémolytique.....	115
III-3- Évaluation de l'activité anti-inflammatoire	116
IV- Analyse statistique	117
Résultats et Interprétation.....	118
I-1- Rendement d'extraction des extraits de grignons d'olive	118
II- Évaluation des activités biologiques <i>in vitro</i> des extraits biologiques.....	118

II-1- Test de cytotoxicité	118
II-2- Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges).....	120
II-3- Activité anti-inflammatoire.....	122
Discussion.....	125
Conclusion.....	128
Conclusion Générale	129
Références bibliographiques	132
Annexes	158

Liste des Figures

Figure 01 : Situation géographique de la Wilaya de Tlemcen.	05
Figure 02 : Réduction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle en diphényle picryl hydrazine	15
Figure 03 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.	19
Figure 04 : Teneurs en phénols totaux.	19
Figure 05 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	20
Figure 06 : Teneurs en flavonoïdes.	20
Figure 07 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.	21
Figure 08 : Teneurs en tanins condensées.	21
Figure 09 : Pourcentage d'inhibition % de DPPH en fonction des concentrations (mg/ml) de l'extrait non délipidé et délipidé des grignons d'olives.	22
Figure 10 : Tracés de calibration de l'inhibition de l'activité (FRAP) en différentes concentrations (Extrait non délipidé).	23
Figure 11 : Tracés de calibration de l'inhibition de l'activité (FRAP) en différentes concentrations (Extrait délipidé).	24
Figure 12 : L'activité réductrice de fer de l'extrait non délipidé (brut) et l'extrait délipidé des grignons d'olives.	24
Figure 13 : Facteurs favorisant le surpoids (obésité).	32
Figure 14 : Inflammation des adipocytes au cours d'obésité.	34
Figure 15 : Protocole Expérimental.	35
Figure 16 : Evaluation du PC des rats durant 8 semaines d'expérimentation.....	38
Figure 17 : Teneur plasmatique en glucose et en protéines totales.	60
Figure 18 : Teneur plasmatique en paramètres lipidiques.	61
Figure 19 : Teneurs plasmatiques en transaminases.	62
Figure 20 : Teneur plasmatique en Urée et en Créatinine.....	62
Figure 21 : Teneur de cholestérol (mg/g) des différents organes chez les rats.	67
Figure 22 : Teneur de triglycérides (mg/g) des différents organes chez les rats.....	67
Figure 23 : Teneur en protéines totales (mg/g) des différents organes chez les rats.....	68
Figure 24 : Teneur en MDA ($\mu\text{mol/g}$) au niveau des organes chez les rats.....	68
Figure 25 : Teneur en protéines carbonylés ($\mu\text{mol/g}$) au niveau des organes chez les rats. ...	69
Figure 26 : Teneur en GSH ($\mu\text{mol/g}$) au niveau des organes.....	69
Figure 27 : Activité de catalase (U/min/g) au niveau des organes.....	70
Figure 28 : Activité de la SOD (U/g) au niveau des organes.....	70

Figure 29 : Coupes histologiques du foie des rats expérimentaux.....	72
Figure 30 : Coupes histologiques du rein des rats expérimentaux.....	73
Figure 31 : Coupes histologiques du TA des rats expérimentaux.....	74
Figure 32 : Evolution du poids corporel des rates au cours de la toxicité aiguë.....	91
Figure 33 : Teneurs plasmatiques en urée (mg/dl) et en créatinine (mg/dl).	92
Figure 34 : Teneurs plasmatiques en transaminases (UI/L).....	92
Figure 35 : Evolution du poids corporel des rates pendant la période d'expérimentation...	95
Figure 36 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates témoins.....	101
Figure 37 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 2000mg/kg.	101
Figure 38 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 500mg/kg.	102
Figure 39 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 125mg/kg.....	102
Figure 40 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 31.25mg/kg.....	102
Figure 41 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 3.12mg/kg.....	103
Figure 42 : Le résidu sec des grignons d'olive.	114
Figure 43 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique.	119
Figure 44 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par les extraits méthanoliques et éthanoliques bruts et délipidé des grignons d'olive.	120
Figure 45 : Comparaison de l'activité anti-hémolytique entre l'acide gallique, Diclofénac et les extraits méthanoliques et éthanoliques des grignons d'olive.....	122
Figure 46 : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac.	123

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Composition physique des différents types de grignon.	09
Tableau 02 : Composition chimique du différent type des grignons.	10
Tableau 03 : Résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'extrait brut des grignons d'olive.....	17
Tableau 04 : Rendement des extractions.	18
Tableau 05 : Rendement d'huile extraite.	18
Tableau 06 : Teneurs des phénols totaux, flavonoïdes et tanins dans les deux extraits.....	18
Tableau 07 : Résultats du piégeage du radical DPPH des extraits non délipidé et délipidé exprimés en mg/mL.....	22
Tableau 08 : Proposition de classification des conséquences de l'obésité.	36
Tableau 09 : Objectifs appropriés pour la prise en charge de l'obésité et des comorbidités..	38
Tableau 10 : Variation des enzymes anti-oxydantes.....	43
Tableau 11 : Le rendement d'extrait brut hydro-méthanolique.	58
Tableau 12 : Paramètres pro-oxydant/ antioxydant au niveau érythrocytaire chez les rats. ...	64
Tableau 13 : Poids relatif des organes chez les rats.....	65
Tableau 14 : Les différentes formes de toxicité.....	86
Tableau 15 : Evaluation des comportements et symptômes des rates lors de l'étude de la toxicité aiguë.	90
Tableau 16 : Poids relatifs (%) des organes des rates traitées avec l'extrait hydro-méthanolique des GO.....	91
Tableau 17 : Teneurs érythrocytaires des paramètres de stress oxydatif.....	93
Tableau 18 : L'effet toxique de l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive sur le comportement des rates.....	94
Tableau 19 : Poids relatif des organes.	96
Tableau 20 : Evaluation de taux des paramètres hématologiques des différents lots traités et témoin dans les conditions de toxicité subaigüe.	97
Tableau 21 : Evaluation des teneurs des paramètres biochimiques des différents lots traités et témoin dans les conditions de toxicité subaigüe.	99
Tableau 22 : Evaluation des teneurs des paramètres érythrocytaires des différents lots traités et témoin dans les conditions de toxicité subaigüe.	100
Tableau 23 : Couleur et rendement des différents extraits obtenus à partir des GO.	118
Tableau 24 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> des extraits des GO.....	123

Liste des Abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AG** : Acide gallique
- ALCL₃** : Trichlorure d'aluminium
- BHA** : Butylhydroxyanisole
- BSA** : Albumine de sérum bovin (bovine serum albumin).
- CAT** : Catalase.
- CE₅₀** : Concentration effective médiane
- CI₅₀** : Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH.
- CP** : Composés phénoliques.
- CRP** : Protéine C réactive.
- DL₅₀** : Dose létale médiane.
- DMSO** : Dimethylsulfoxyde.
- DO** : Densité Optique.
- DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
- DSA** : Direction des Services Agricoles de la Wilaya de Tlemcen.
- EBM** : extrait brut hydro-méthanolique (non délipidé)
- EDM**: extrait délipidé hydro-métholique.
- EBE** : extrait brut hydro-éthanolique.
- EDE** : extrait délipidé hydro-éthanolique.
- ERO**: Espèces réactives de l'oxygène.
- FeCL₃**: Trichlorure de fer.
- K₃Fe(CN)₆** : Ferricyanure de potassium.
- Fe²⁺** : Ion ferrique.
- Fe³⁺** : Ion ferrique.
- FRAP**: Ferric reducing antioxidant power
- GO**: Grignons d'olive
- GPX**: glutathion peroxydase
- GR** : Globules rouges.
- GSH**: Glutathion réduit
- GSSG**: Glutathion S-S oxide.
- Ha**: Hectare
- HCL**: Acide chlorhydrique.

HDL-C: Cholestérol des lipoprotéines de haute densité

H₂O₂: Péroxyde d'hydrogène

H₃PO₄: Acide phosphorique.

IC₅₀: Concentration inhibitrice 50 %.

IL : interleukine

IMC : Indice de masse corporelle.

KOH: Hydroxyde de potassium.

LDH : Lactate déshydrogénase.

LDL : lipoprotéines de basse densité (low density lipoprotein)

MDA: Malondialdéhyde.

MDH: Malate déshydrogénase.

mg EAA/g MS : mg équivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche

mg EAG/g MS : mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche

mg EC/g MS : mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche

mg : Milligramme.

mL : Millilitre.

MS(%): pourcentage en matière sèche (%).

m,v : masse/volume.

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NaNO₂ : Nitrite de sodium.

NASH : Stéato-hépatite non alcoolique.

NFKB: Nuclear factor-Kappa B.

NO: monoxyde d'azote

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PT : Polyphénols totaux.

SOD : Superoxyde dismutase

REME : Réseau des Entreprises Maghrébines pour l'Environnement.

rpm : Tour/ minute.

TA : Tissu adipeux.

TBA: Acide thiobarbiturique

TBARS : Substance réactive aux acides thiobarbituriques (Thiobarbituric acid reactive substances).

TCA : Acide trichloroacétique

TG: Triglycérides

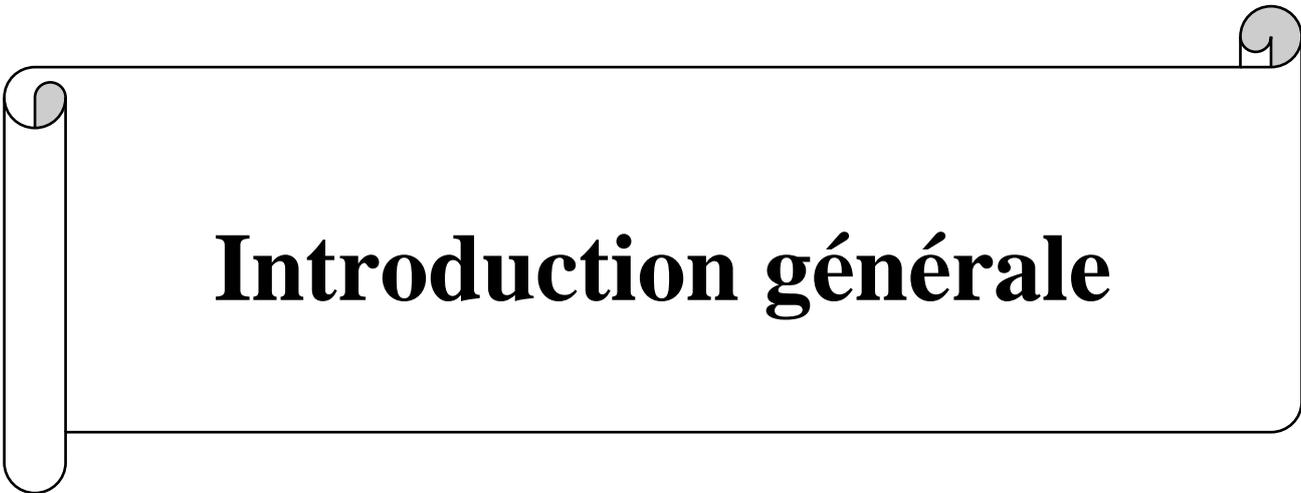
TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

VLDL : lipoprotéines de très faible densité (Very Low-density Lipoprotein).

% : Pourcentage.

μ g : microgramme.

μ l : microlitre.



Introduction générale

Introduction générale

Depuis le début des années 1990, la protection de l'environnement est devenue une préoccupation collective. La question des déchets est quotidienne et touche chaque individu tant sur le plan professionnel que familial. En tant que consommateur, jeteur, usager du ramassage des ordures ménagères, et trieur de déchets recyclables, citoyen ou contribuable, chacun peut et doit être acteur d'une meilleure gestion des déchets (**Rajendran et al., 2021**).

La culture de l'olivier, à forte valeur culturelle et patrimoniale en région méditerranéenne, et la production d'huile d'olive, représentent environ 97 % de la production mondiale. L'Algérie a une riche histoire de l'oléiculture. De plus, l'agriculture traditionnelle est en grande partie liée à la gestion des oliviers (**Bendi et al., 2022**). Cette production s'accompagne de l'apparition de sous-produits (grignons et margines) peu ou pas valorisés à l'heure actuelle, ces résidus bruts sortant des chaînes de trituration d'olives ne peuvent cependant être retournés aux champs directement que dans des conditions précises et limitées, car ils contiennent des substances phytotoxiques et antimicrobiennes (phénols, acides gras et acides organiques). Leur fort contenu en matières organiques non stabilisées et en matières minérales (N, P, K) représente de toute façon un risque de pollution pour l'environnement (**M'Sadek et al., 2015**).

La résistance de ces rejets des huileries à la biodégradation en raison de leur richesse en composés phénoliques et en chaînes d'acides gras constitue un problème majeur de pollution (**De Martino et al., 2013**). En raison de cette nuisibilité sur l'environnement, il est nécessaire de valoriser ces sous-produits (**Puig-Gamero et al., 2021**).

Les composés phénoliques totaux (CP) contenus dans les grignons d'olives peuvent être récupérés pour des applications ultérieures particulièrement en pharmacologie, en phytothérapie, en hygiène alimentaire, en agroalimentaire ou en cosmétologie en raison des effets biologiques qu'ils présentent : activité antioxydante, antimicrobienne, antivirale, antifongique, etc. (**Senani, 2012**).

Les antioxydants naturels sont donc une alternative intéressante en raison de leurs variétés des structures et d'interactions chimiques, ainsi que des nombreuses activités biologiques qu'ils possèdent. En s'appuyant sur cette vision, il est indispensable d'intensifier l'effort de recherche pour développer des nouvelles molécules biologiquement actives à partir des plantes. À cet effet, plusieurs investigations chimiques ont été réalisées afin d'apporter une explication scientifique à l'efficacité des plantes utilisées en médecine traditionnelle. Le résultat fut la découverte de composés chimiques, dits métabolites secondaires qui ont répartis

Introduction générale

en plusieurs classes, parmi lesquelles la plus étudiée, celle des polyphénols qui sont reconnus comme de très bons antioxydants (**Shen et al., 2022**).

Les éventuels bénéfices que pourraient apporter à la santé humaine les polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie – puisque l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes et l'hygiène alimentaire, de plus en plus d'études indiquant que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (**De Lima Cherubim et al., 2020**).

Les données récentes laissent penser que les polyphénols auraient des actions sur les facteurs impliqués dans le syndrome métabolique et les complications qui leur sont associées. Ces substances, présentes dans de nombreux aliments et boissons d'origine végétale, sont capables de stimuler ou d'inhiber certaines voies de signalisation et de moduler l'expression de gènes impliqués dans de nombreuses voies métaboliques : lipides, glucides, xénobiotiques, adipokines (**Jiang, 2019**).

L'obésité est un problème multifactoriel qui comprend des facteurs biologiques, génétiques, comportementaux et sociaux. Le traitement de l'obésité est toujours inévitablement associé à la réduction du poids corporel. Cela peut être réalisé grâce à diverses stratégies normalisant le taux des lipides (alimentation, exercice physique, intervention chirurgicale...). Actuellement, les études récentes montrent que l'apport alimentaire en CP peut aider à réduire la prise de poids physiologique (**Boccellino et al., 2020**). Les effets des polyphénols contre l'obésité sont obtenus par leur capacité à interagir directement ou indirectement avec le tissu adipeux en activant la protéine kinase liée à l'adénosine monophosphate (AMPK) qui entraîne la réduction du cholestérol, la synthèse des acides gras et des triglycérides. De plus, les polyphénols peuvent réprimer les gènes qui régulent la différenciation des adipocytes et l'accumulation des triglycérides (**Fortunato et al., 2021**). Plusieurs études montrent d'autres mécanismes anti-obésité des polyphénols tels que la suppression de l'appétit, l'inhibition des enzymes digestives responsable de la digestion et l'absorption des lipides, régulation de la différenciation adipocytaire, stimulation de la dépense énergétique, amélioration de la dysbiose du microbiote intestinal... (**Zhang et al., 2023**). Parmi ces CP on a la curcumine, le resvératrol, les catéchines, les quercétines, la rutine, etc. peuvent prévenir et gérer l'obésité

Introduction générale

(Wang et al., 2014). Ces propriétés bénéfiques des CP sont dues à leur capacité de piéger les radicaux libres formant des complexes stables et fournir une protection contre le stress oxydatif (Singh et al., 2020). D'autre part, les polyphénols peuvent entraîner un problème de toxicité dans l'organisme lorsqu'ils sont administrés à forte dose et agissent dans le sens inverse : au lieu de prévenir les maladies, ils peuvent les déclencher (Mojzer et al., 2016). Par exemple, les polyphénols alimentaires sont métabolisés en radicaux peroxydes par l'intermédiaire de la peroxydase entraînant la formation des espèces réactives (ROS) (Zeggwagh AA et al., 2013). D'autres types des CP comme les catéchols sont convertis en un homologue O-quinone qui subit une auto-oxydation entraînant une diminution de la capacité anti-oxydante ; en plus, la pro-oxydation des CP cause une oxydation des protéines cellulaire et les lipides membranaires aussi une perturbation de la fonction de la molécule d'ADN (Murakami, 2022).

Les buts de la valorisation des grignons d'olive sont multiples, tout d'abord la protection de l'environnement contre la toxicité que représentent ces déchets, d'autre part, ouvrir la voie du marché de la valorisation oléicole afin de rendre cette technique opérationnelle et utilisable dans tous les pays producteurs d'huile d'olive ; et le plus important actuellement, c'est de transformer ce principale polluant de l'oléiculture à une substance thérapeutique en étudiant ces caractéristiques phytochimiques. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de cette thèse.

Le but général de cette étude est d'étudier les effets métaboliques des grignons d'olive de la région de l'ouest Algérien au cours d'obésité. Les effets anti-obésité du GO sont précédemment rapportés mais ils sont un peu clairs. C'est pourquoi, le présent travail a été entrepris afin de mettre en évidence les propriétés phytochimiques et thérapeutiques des GO en étudiant la caractérisation phytochimique afin de connaître les CP auxquelles on peut rattacher les propriétés métaboliques et anti-oxydantes attribuées à ce déchet, puis une réalisation de quelques tests biologiques in vitro ; et pour assurer l'innocuité du GO, on a étudié la toxicité aiguë et subaiguë par l'évaluation de la dose létale afin de chercher l'activité pharmacologique de notre extrait .

Le présent document est structuré en 4 chapitres :

- Le premier chapitre intitulé « *Étude phytochimique* » étudie la situation géographique de l'olivier dans la wilaya de Tlemcen, ainsi une synthèse bibliographique concernant les grignons d'olive, ces caractéristiques phytochimiques, qualitatifs et quantitatifs en utilisant

Introduction générale

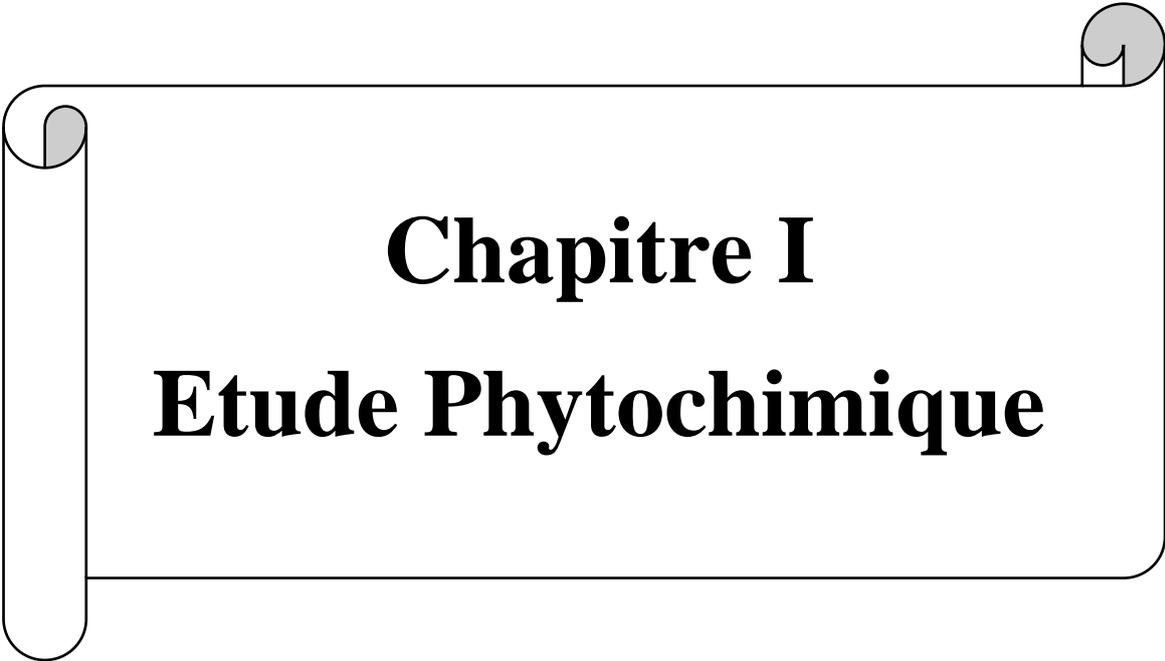
des méthodes spectrophotométriques et sa capacité antioxydante par le test de DPPH, FRAP et faire une comparaison de deux extraits délipidé et non délipidé des GO.

- Le second chapitre intitulé « *Étude in vivo : effet des grignons d'olive au cours d'obésité* » présente des généralités sur l'obésité et le stress oxydatif, et décrit la partie expérimentale in vivo par l'utilisation des rats Wistar obèses en utilisant un régime hypercalorique et hypergras nommé régime cafétéria. Ensuite, on a identifié les paramètres biochimiques, le statut Redox et une étude histologique.

- Le chapitre III intitulé « *Toxicité aiguë et sub-aiguë de l'extrait brut des grignons d'olive* » étudie l'effet de différentes doses de l'extrait brut des GO pour déterminer la dose qui présente des effets nocifs à différents niveaux (Paramètres biochimiques, paramètres de stress oxydatif et au niveau des 3 organes : le foie, rein et tissu adipeux) chez des rats Wistar sains.

.- Le chapitre IV intitulé « *Étude de quelques activités biologiques de l'extrait des grignons d'olive* » regroupe le test de cytotoxicité, activité anti-hémolytique et anti-inflammatoire in vitro de deux extraits : délipidé et non-délipidé du GO.

Enfin, la dernière section de ce mémoire intitulée « Conclusion » présente les conclusions générales de l'ensemble de ce mémoire. Et les perspectives de recherche sont également présentées.



Chapitre I
Etude Phytochimique

I-L'oléiculture à Tlemcen

L'Algérie fait partie des pays du pourtour méditerranéen dont le climat est le plus propice à la culture de l'olivier. L'oléiculture, première richesse arboricole de l'Algérie. L'oliveraie algérienne se répartit en trois zones oléicoles importantes. La zone de la région ouest représente 31 400 hectares répartis entre 5 wilayas : Tlemcen, Ain Témouchent, Sidi Bellabes, et Rélizane.

La zone du centre, de loin la plus importante, couvre une superficie de 110 200 hectares répartis entre les wilayas d'Ain Defla, Blida, Boumerdes, Tizi Ouzou, Bouira et Bejaia.

La zone de la région est représentée par des oliveraies de 49 900 hectares et répartis entre les wilayas de Jijel, Skikda, Mila et Guelma (**Hadjloune et al., 2021**).

La Wilaya de Tlemcen est localisée à l'extrême Nord-ouest de l'Algérie. Elle est ouverte au Nord par la mer méditerranée et limitée administrativement par les Wilayas d'Ain Témouchent au Nord-Est, de Sidi Bel Abbès à l'Est, de Naama au Sud et par la frontière Algéro-Marocaine à l'Ouest. Elle s'étend sur une superficie de 9 017.69 km² dont 35 900 ha (39 %) représentent une superficie agricole (**Bemoussat et al., 2019**).

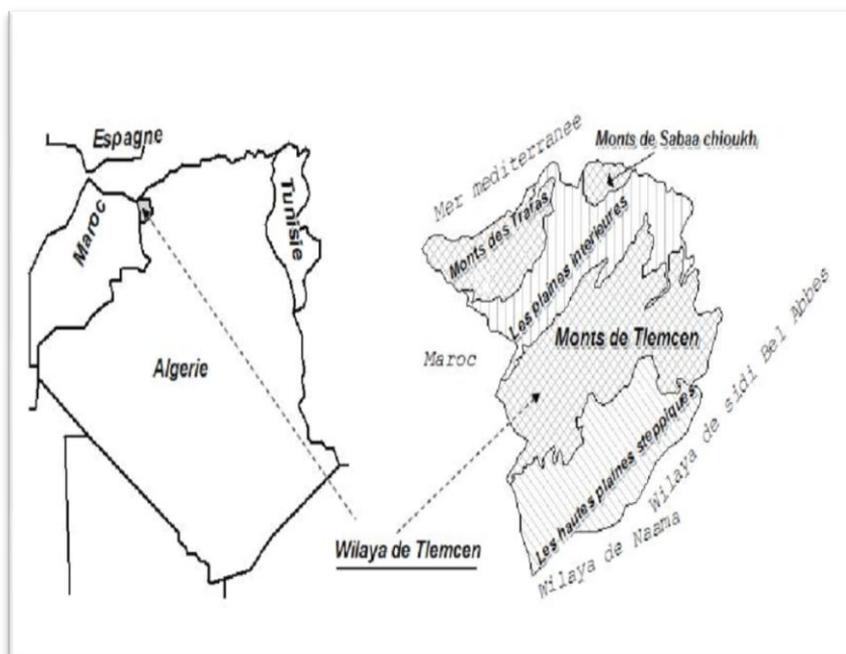


Figure 01 : Situation géographique de la Wilaya de Tlemcen
(ANAT de Tlemcen, 2000)

L'oléiculture dans la Wilaya de Tlemcen représente 36 % d'arboriculture totale dans la région de Tlemcen. Les variétés qui se trouvent à Tlemcen sont : Sigoise, Verdal, Cornicabra, Sévillane, Chemlal, Manzanille. L'oliviers pratiquement présent à travers tout le territoire de la wilaya, mais avec des densités variables. Elle est essentiellement concentrée à Maghnia, Sebra, Beni Snous et Amieur ayant une superficie supérieure à 200 ha. Elle est aussi bien présente à Ain-youcef, Ben Sakrane, Beni Mester et Ouled Mimoune. Dans ces localités, les oliviers occupent une superficie allant de 150 à 200 ha. Dans les autres endroits, les superficies sont réduites entre 100 et 150 ha, voire près de 50 ha surtout au sud de la wilaya soit dans les hautes plaines steppiques (**Siddhoum et Gaouar, 2017**).

La wilaya de Tlemcen compte 26 huileries, dont 9 traditionnelles avec une production de 750 000 quintaux d'olives était attendue pour la campagne de cueillette de la saison agricole lancée fin octobre 2019, selon la DSA. Cette campagne de cueillette portait sur une surface de plus de 15 000 ha avec un total de 305 648 oliviers avec des prévisions en termes de rendement moyen de 50 quintaux à l'hectare. Sur cette production, 300 000 quintaux seront destinés à la consommation et 450 000 quintaux consacrés à la transformation en huile d'olive. À Tlemcen, les variétés dominantes sont Chemlal à Beni Snous et Sigoise à Sebdou. Les olives proviennent de la région de Tlemcen située dans les flancs des monts Traras, réputée pour son climat tempéré et ensoleillé et pour ses oliveraies (**Cap, 2021**).

II-Procédés d'obtention l'huile d'olive

L'huile d'olive est une huile obtenue à partir du fruit de l'olivier. Pour produire une bonne qualité d'huile d'olive, il est nécessaire que les olives prêtes à l'extraction doivent avoir des qualités exigées : fruits sains, non écrasés, de couleur homogène, sans lésions, et cueillies au stade de maturité (**Bermudez et al., 2021**).

II-1-Procédé discontinu ou système à presse

Broyage : il est réalisé par des meules en pierre de granit. Elles tournent dans un bac dont le sol est également en pierre. Les meules utilisées pour le broyage sont légèrement décentrées par rapport à l'axe de rotation, ce qui accentue la possibilité d'écrasement des olives.

Malaxage: des raclettes ramènent en permanence la pâte sous les meules qui jouent alors le rôle de malaxeurs. La pâte est obtenue au bout d'une demi-heure environ.

Séparation des phases : la pâte est placée en couche de 2 cm d'épaisseur environ sur des disques en fibre de nylon (les scourtins), eux-mêmes empilés les uns sur les autres autour d'un pivot central (appelé aiguille) monté sur un petit chariot. L'ensemble est placé sur un piston de presse hydraulique qui permet de faire subir à la pâte une pression de l'ordre de 100 kg, cm².

La phase liquide s'écoule dans un bac. Le grignon reste sur les scourtins. Cette opération dure environ 45 minutes. Ensuite chaque scourtin est débarrassé de son grignon en le tapant comme un tapis.

Décantation : l'huile ayant une densité inférieure à celle de l'eau (0,920 g, litre) remonte à la surface. Il s'agit de la décantation naturelle. Cependant, cette méthode n'est presque plus utilisée, en raison de sa lenteur et de la difficulté pour bien séparer l'huile de l'eau dans la zone de limite entre les deux fluides. C'est des centrifugeuses verticales à assiettes qui permettent aujourd'hui de séparer l'huile d'olive des margines (**Ben Miled et al., 2000 ; Volpe et al., 2014 ; Bermúdez et al., 2021**).

II-2-Procédé continu ou système à centrifugation

Broyage : il est réalisé par des broyeurs mécaniques à disques ou à marteaux. Ces broyeurs peuvent travailler en continu, la pâte étant obtenue presque instantanément.

Malaxage : la pâte est versée dans un bac en inox, dans lequel tourne une spirale ou une vis sans fin, également en inox.

Séparation des phases : la pâte malaxée est injectée par une pompe dans une centrifugeuse dont l'axe est horizontal. Cet appareil est appelé décanteur horizontal.

Décantation : on utilise des centrifugeuses verticales à assiettes qui permettent de séparer l'huile d'olive des margines (**Uğurlu et Kula, 2007 ; Mouzoui et al., 2014 ; Bermúdez et al., 2021**).

II-3- Secteur oléicole : entre la production et les coproduits

En plus de l'huile d'olive, la production oléicole dégage également deux sous-produits : les margines (déchets liquides) et le grignon (déchets solides). Deux matières qui ne sont pas facilement dégradables (**Difonzo et al., 2020**). Un kilogramme d'olives peut générer entre de 1 à 1,5 litre de margines. Cela dépend du système d'extraction utilisé. Ces margines sont des eaux très polluantes, elles sont très nuisibles à la qualité de l'eau, du sol, et même de l'air à cause des mauvaises odeurs (**Benyahia et Zein, 2003**).

L'évaluation et la quantification des déchets solides générés par l'industrie oléicole en Algérie, ont été établies par le Réseau des Entreprises Maghrébines pour l'Environnement (REME) qui a déclaré que chaque année, la production des déchets oléicoles solides atteint plus de 30 % des déchets totaux. C'est une situation assez alarmante qui nécessite d'être prise en charge pour des solutions rapides et efficaces (**Khelfaoui et Hamidi, 2018**).

III-Les grignons d'olives : un déchet précieux

III-1-Généralités :

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 utilisé dans l'alimentation animale, engrais et la fabrication de savon, ou subir une extraction chimique afin de produire de l'huile de grignons d'olive (**Difonzo et al., 2020**).

Le grignon d'olive est un sous-produit riche en composés de haute valeur (les fibres alimentaires, les acides gras insaturés, les polyphénols...) largement explorés pour obtenir de nouveaux ingrédients alimentaires (**Ribeiro et al., 2020**).

Le grignon d'olive est très riche en phénols (98 g pour 100 g de la teneur totale de phénols qui se trouve dans le fruit d'olive) donc il pourrait être considéré comme une matière première de grand potentiel (**De Bruno et al., 2018**).

Il existe plusieurs types de grignon d'olive classés comme suit :

- **Grignon brut** : c'est le résidu de la première extraction de l'huile d'olive.
- **Grignon épuisé** : produit après une seconde extraction avec un solvant chimique tel que l'hexane. Il est caractérisé par une faible teneur en huile et une teneur en eau réduite du fait qu'il a été déshydraté pour permettre le processus de l'extraction.
- **Grignon d'olive partiellement dénoyauté** : produit après dénoyautage du grignon brut.
- **Grignon épuisé et partiellement dénoyauté** : constitués essentiellement par la pulpe et contiennent encore une petite proportion de coques qui ne peuvent pas être séparées complètement par les procédés de tamisage ou de ventilation (**Gómez-Cruz et al., 2021 ; Sahin Ozkan et al., 2019**).

III-2- La composition de grignon d'olive

III-2-1-Caractéristiques physiques

La composition physique des grignons dépend étroitement de la variété des olives, de leur degré de maturation et du système employé lors de l'extraction de l'huile (**Contreras et al., 2021**). Les grignons bruts renferment la coque du noyau réduite en morceaux, la peau et la pulpe broyée. Ils renferment aussi une certaine humidité et une quantité d'huile résiduelle (tableau 1). Tandis que les grignons épuisés diffèrent essentiellement par une plus faible teneur en huile et une teneur en eau réduite du fait qu'ils ont été déshydratés au cours du processus d'extraction teneur en huile et une teneur en eau réduite du fait qu'ils ont été déshydratés au cours du processus d'extraction (**Ying et al., 2017**).

Tableau1 : Composition physique des différents types de grignon (NEFZAOU, 1988)

Composition Produits	MS (%)	Pourcentage (%) en matière sèche			
		Matière grasse	Noyau sec	Amandon sec	Mésocarpe + épicarpe
Olive	51.4	27	14.1	1.3	9
Grignon brut	75.9	9.1	42.1	3	21.2
Grignon épuisé	72.3	4.2	-	5.6	39.3
Grignon tamisé	95.5	18.6	-	11.1	80.2

III-2-2-Caractéristiques chimiques

Les grignons d'olives sont des matériaux lignocellulosiques constitués de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine. Ils contiennent également des résidus d'huile d'olive, des protéines et divers autres composés.

Le type d'olives utilisées et leur maturité influent sur la composition chimique des grignons, mais le procédé d'extraction utilisé a également une influence (Ducum et al., 2019).

La composition chimique des différents types des grignons d'olive est donnée par le tableau 2.

Tableau 2 : Composition chimique des différents types des grignons (D.P.V, 2009)

Types des Grignons	Matière Sèches(%)	Matière Minérale(%)	Matière Azotée Totale(%)	Cellulose Brute(%)	Matière Grasse(%)
Grignon Brut	75-80	3-5	5-10	35-50	8-15
Grignon gras partiellement dénoyauté	80-95	6-7	9-12	20-30	15-30
Grignon épuisé	85-90	7-10	8-10	35-40	4-6
Grignon épuisé partiellement dénoyauté	85-90	6-8	9-14	15-35	4-6

Matériels et méthodes

Dans cette partie, nous sommes intéressés à la caractérisation chimique des extraits hydro-méthanolique de grignon d'olive brut et grignon d'olive délipidé.

Cette investigation phytochimique comporte :

- * L'extraction hydro-méthanolique de grignon d'olive brut et délipidé (après l'extraction d'huile de grignon).
- * Le criblage (screening) phytochimique, réalisé afin d'avoir une idée sur la nature des composés qui sont présents dans les extraits hydro-méthanoliques testés.
- * Etude de l'activité anti-oxydante de nos extraits (test de DPPH, FRAP).

I-Préparation du substrat végétal :

Le substrat végétal qui a fait l'objet de notre étude est le grignon d'olive brut récupéré d'une huilerie traditionnelle de la région d'Ouzidene, wilaya de Tlemcen, durant le mois de Novembre 2019. Cette huilerie applique l'extraction à système continu. Le séchage a été fait pendant un mois à l'air libre (dans un endroit sec, ventilé et ombragé), celui-ci a été broyé à l'aide d'un broyeur électrique (Moulinex) pour obtenir une poudre homogène puis tamisé avant son utilisation.

II- Extraction :

II-1-Extraction avec délipidation

L'extraction de la matière grasse a été réalisé par la méthode de SOXHLET. Cette méthode traditionnelle est la plus utilisée pour l'extraction des principes actifs à partir des plantes. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction des lipides, ou de divers autres catégories de molécules (Yue et al., 2018).

Protocole :

10 g de grignon d'olive sont dégraissées initialement avec 250 ml de n-hexane, placées dans un extracteur Soxhlet pendant 4 heures. À la fin de l'extraction, le surnageant réuni est marquée par l'évaporation à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (T= 40°C). Après dessiccation, le ballon a été pesé. Le pourcentage de la matière grasse (l'huile d'olives) est calculé par la formule suivante :

$$MG\% = \frac{p_2 - p_1}{P_0}$$

Avec : P_0 : poids de grignon utilisé.

P_1 : poids du ballon vide.

P_2 : poids du ballon avec la matière grasse

Le pourcentage de la matière grasse est calculé et le grignon délipidé séché a été utilisé pour les dosages quantitatifs des polyphénols, flavonoïdes et tanins et l'étude de l'activité anti-oxydante.

II-2- Préparation des extraits hydro-méthanoliques

Cette première étape d'extraction des substances naturels est de type solide-liquide, c'est-à-dire qu'un solide (grignon d'olive) est mélangé avec un liquide (le solvant d'extraction).

La meilleure méthode utilisée est la macération pour effectuer une extraction des produits naturels et des métabolites secondaires (**Gori et al., 2020**).

Les extraits hydro-méthanoliques brut et délipidé sont obtenus par macération à froid de 10 g de matériel végétal dans 200 mL de mélange méthanol-eau (80,20 %) pendant 48 heures sous agitation. Les macérats hydro-méthanoliques ainsi obtenus sont doublement filtrés sur papier Whatman N°01 et papier filtre, puis évaporés par un Rotavapor de type LABOROTA 4000 (Heidolph) sous pression à une température de 45°C. Les résidus secs obtenus sont récupérés dans de l'eau distillée pour les différents tests.

Détermination du rendement des extraits brut et délipidé

Le rendement des différents extraits obtenus est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue après évaporation et la masse initiale du matériel végétal utilisé. Il est exprimé en pourcentage et calculé par l'équation suivante :

$$\text{Rendement \%} = m_0/m_1 \times 100$$

m_0 : Masse en gramme du résidu sec évaporé ;

m_1 : Masse en gramme de la matière végétale sèche l'initiale.

II-3- Criblage phytochimique

L'extrait hydro-méthanolique de grignon d'olive brut obtenu a servi à la réalisation d'un screening phytochimique préliminaire, il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques. A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés. Nous nous sommes servis des techniques analytiques décrites dans les travaux de (**Trease et Evans, 1989 ; Harborne, 1998 ; Karumi et al., 2004**).

Cette première étape est préliminaire et essentielle, elle permet de connaître les différentes classes de métabolites secondaires contenues dans notre extrait.

► **Détection des flavonoïdes**

Traiter 5 ml d'extrait avec quelques gouttes de HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium (laisser agir). La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose, rouge ou jaune se développe après 3 min.

► **Détection des tanins**

Afin de déterminer la présence des tanins dans un extrait, on ajoute à un 1 ml de l'extrait, 2 mL d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de trichlorure de fer (FeCl_3) à 1%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration : bleu noir, verte ou bleu verte et un précipité qui témoignent respectivement de la présence des tanins.

► **Détection des saponines**

5 mL de l'extrait à tester sont bien mélangés avec 10 mL d'eau distillée pendant 2 min. Après 15 min l'apparition d'une mousse persistant indique une réaction positive (test de mousse).

► **Détection des quinones**

La présence de quinones libres est confirmée lorsque la phase aqueuse vire au jaune rouge ou violet après l'ajout de 1 mL de NaOH (10 %) à l'extrait étherique.

► **Détection des anthraquinones**

À l'extrait chloroformique, on ajoute le réactif KOH aqueux (10 %). Après agitation, la présence des Anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge.

► **Détection de stérols et triterpènes**

Évaporer à sec 10 mL de la solution à analyser, dissoudre le résidu dans 5 mL d'anhydride acétique puis 5 mL de chloroforme. À l'aide d'une pipette ajouter 1 mL de H_2SO_4 concentré au fond du tube sans agiter. Laisser reposer 30 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes.

► **Détection des composés réducteurs**

Dans un tube à essai, ajouter 1 mL de liqueur de Fehling (0,5 mL réactif A et 0,5 mL réactif B) à 1 mL d'extrait à analyser et incuber l'ensemble 08 min dans un bain-marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge-brique indique la présence des composés réducteurs.

III-Dosage phytochimique des extraits :

Des dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés, sont réalisés pour chaque extrait des grignons d'olive par des méthodes colorimétriques en utilisant un spectrophotomètre UV-visible.

III-1-Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits bruts et délipidés est estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu décrite par **Li et al. (2007)**.

Protocole :

Un volume de 200 μL de chaque extrait brut est mélangé avec 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué et 0,8 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 %.

L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765 nm.

Une courbe d'étalonnage d'acide gallique a été établie. Les teneurs en phénols totaux sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme du poids de la matière sèche (mg EAG, g MS).

III-2-Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont quantifiés dans les extraits bruts et délipidés des grignons d'olive selon la méthode du trichlorure d'aluminium décrite par **Turkoglu et al (2007)**.

Protocole :

Un volume de 500 μL de chaque extrait brut convenablement dilué est placé dans un tube à hémolyse en verre avec 1500 μL d'eau distillée. À temps zéro, 150 μL de nitrite de sodium NaNO_2 à 5 % est ajoutés au mélange. Après 5 min, 150 μL de trichlorure d'aluminium AlCl_3 à 10 % (m, v) sont rajoutées.

Après 6 min d'incubation à température ambiante, 500 μL d'hydroxyde de sodium NaOH à 1 M sont additionnés, le mélange est homogénéisé et l'absorbance est immédiatement lue à 510 nm contre le blanc.

Les teneurs en flavonoïdes des extraits bruts des sept parties étudiées sont exprimées en milligrammes équivalents de catéchine par gramme du poids de la matière sèche (mg EC, g MS).

III-3-Dosage des tanins

Les teneurs en tannins condensés sont estimées en utilisant la méthode de vanilline décrite par Heimler et al. (2006).

Protocole :

Un volume de 50 μL d'extrait brut est ajouté à 1500 μL d'une solution de vanilline, méthanol à 4 % (m, v). Ensuite, 750 μL d'acide chlorhydrique concentré HCl est additionné, le mélange est homogénéisé et incubé à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage de catéchine a été établie et les teneurs en tannins ont été estimées en milligrammes équivalents de catéchine par gramme du poids de la matière sèche (mg EC, gMS).

IV- L'activité anti-oxydante

IV-1- Piégeage des radicaux libres DPPH

Cette technique qui a été décrite par Sanchez-Moreno et al. (1998) est basée sur la réduction, par les antioxydants présents dans le milieu réactionnel, du radical 2,2- diphényl-1 picrylhydrazyl (DPPH) ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

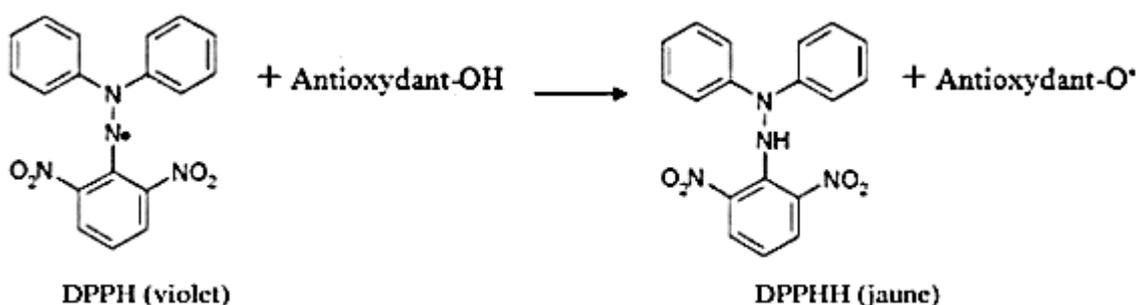


Figure02 : Réduction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle en diphényle picryl hydrazine

Protocole :

Un volume de 50 μL de différentes concentrations de chaque extrait exprimées en g,L est ajouté à 1,95 mL de la solution méthanolique du DPPH (0.025 g/L) fraîchement préparée. En

parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µL de méthanol avec 1,95 mL de la solution méthanolique de DPPH.

L'absorbance à 515 nm est lue après une incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Le BHA est utilisé comme référence. Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{Absc} - \text{Abse})}{\text{Abs c}} \times 100$$

Abse : absorbance du contrôle ;

Abse : absorbance de l'échantillon testé.

Pour chaque extrait, nous avons déterminé la valeur CI_{50} qui est la concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50 % la concentration initiale du radical DPPH (Samarth et al., 2008) et ce en traçant une courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations correspondantes.

IV-2- La réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power) :

Le pouvoir réducteur du fer des différents extraits est déterminé selon la méthode décrite par (Karagözler et al., 2001) baser sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} .

Protocole :

Dans un premier temps, une solution de tampon phosphate à 0,2 M et à un pH=6,6 est préparée. 1 mL de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 mL de la solution tampon et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1 % (m, v). L'ensemble est incubé au bain-marie à 50 °C pendant 20 minutes ensuite :

- 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction.
- Les tubes sont centrifugés à 3 000 rpm pendant 10 minutes.
- 2,5 mL du surnageant sont mélangés à 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1 %.

La lecture de l'absorbance est faite à 700 nm contre un blanc contenant de l'eau distillée à la place de l'extrait. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

V-Analyse les statistiques :

Les données expérimentales ont été exprimées par la moyenne \pm l'écart-type. Le traitement statistique des données a été effectué sur l'Excel 2007 et logiciel SPSS en utilisant test

ANOVA et test de Turkey .Une p-value inférieur à 0,05 a été considérée significative. Chaque manipulation a été répétée 3 fois.

Résultats et interprétations

I-1-Tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur l'extrait brut étudié sont regroupés dans le tableau 03.

L'analyse phytochimique a montré la présence des flavonoïdes, les tanins, les saponines, les tritérpènes hétérosidiques, les quinones, par contre, les tests de recherche des anthraquinones et composés réducteurs ont été négatives sur notre extrait.

Tableau 03 : Résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'extrait brut des grignons d'olive

Les composés chimiques	Présence+/Absence-
Flavonoides	+++
Tanins	++
Saponines	+++
Tritéropènes hétérosidiques	+
Quinones	+
Anthraquinones	-
Composés réducteurs	-

(-) : Absence (+) : Présence faible (++) : présence moyenne (+++) : présence plus forte

I-2-Rendements des extraits :

Les résultats des rendements d'extraction pour les deux extraits bruts et délipidés montrent que le rendement de l'extrait brut est de 9 % plus élevé que le rendement de l'extrait délipidé (8.2 %) (tableau 04).

Tableau 04 : Rendement des extractions

Extrait	Brut (non délipidé)	Délipidé
Rendement (%)	9	8,2

I-3-Rendement de l'extraction d'huile des grignons d'olive

Les résultats du rendement en huile extraite à l'aide d'un appareil *Soxhlet* sont résumés dans le tableau ci-dessous (tableau 05).

Tableau 05 : Rendement d'huile extraite

Masse des grignons d'olive tamisé (g)	10
Rendement d'huile extraite (%)	4.55

II-1- Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins :

Les analyses quantitatives en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins ont été faites par un spectrophotomètre UV-Visibles. Les phénols totaux ont été quantifiés suivant la méthode du Folin-Ciocalteu, les flavonoïdes par méthode de trichlorure d'aluminium, les tanins par méthode de la vanilline. Les densités optiques D.O. obtenues ont été projetées sur les courbes d'étalonnages appropriées (tableau 06).

Tableau 06 : Teneurs des phénols totaux, flavonoïdes et tanins dans les deux extraits

	Polyphénols (mg/g)	Flavonoïdes (mg/g)	Tanins (mg/g)
Extrait Brut (non délipidé)	8.48 ± 0.50	2.33 ± 0.03	0.61 ± 0.01
Extrait Délipidé	10.36 ± 0.76	3.17 ± 0.36	0.34 ± 0.03

II-2-Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux

Cette courbe a été établie en utilisant, comme référence, l'acide gallique. La formule de régression linéaire de cette courbe est de $y = 2.916x$, avec un coefficient de détermination ($R^2 = 0.9978$) (figure 3).

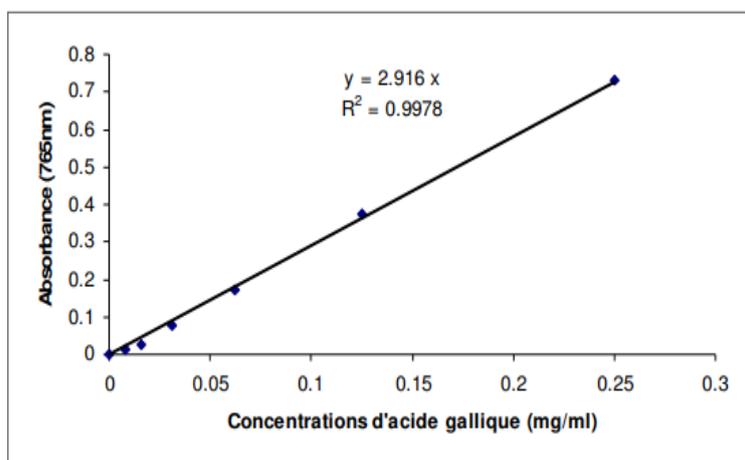


Figure03 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

II-3-Dosage des polyphénols totaux dans l'extrait délipidé et non délipidé

Selon les résultats obtenus dans le tableau 05 et la figure 4, les teneurs en phénols totaux une valeur supérieur dans l'extrait délipidé (10.36 ± 0.76) comparé à l'extrait non délipidé (8.48 ± 0.50).

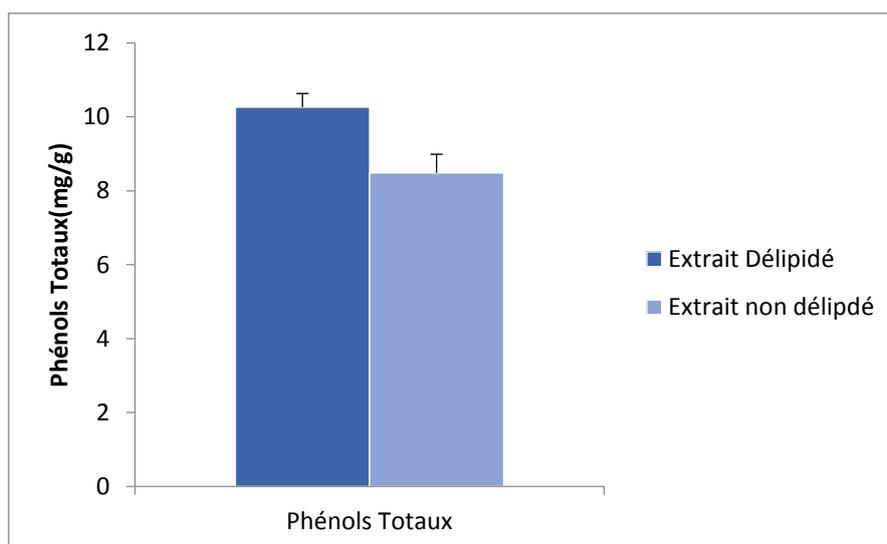


Figure 04 :Teneurs en phénols totaux

II-4-Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

La catéchine a été utilisée comme référence pour tracer cette courbe d'étalonnage qu'on a utilisé pour le dosage des flavonoïdes. La formule de régression linéaire de cette courbe est de $y = 0.1161x$, avec un coefficient de détermination ($R^2 = 0.9968$) (figure 05).

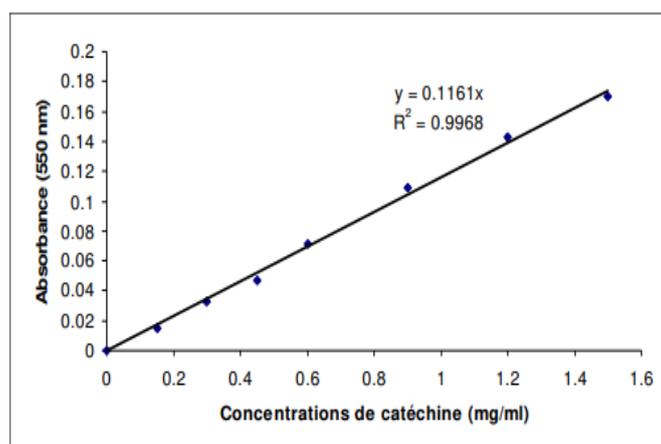


Figure 05 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

II-5-Dosage des flavonoïdes :

Concernant les flavonoïdes, les teneurs les plus élevées sont celles de l'extrait délipidé avec une valeur de 3.17 ± 0.36 mg, g comparé à l'extrait non délipidé (2.33 ± 0.03 mg, g) (tableau 05 et figure 06).

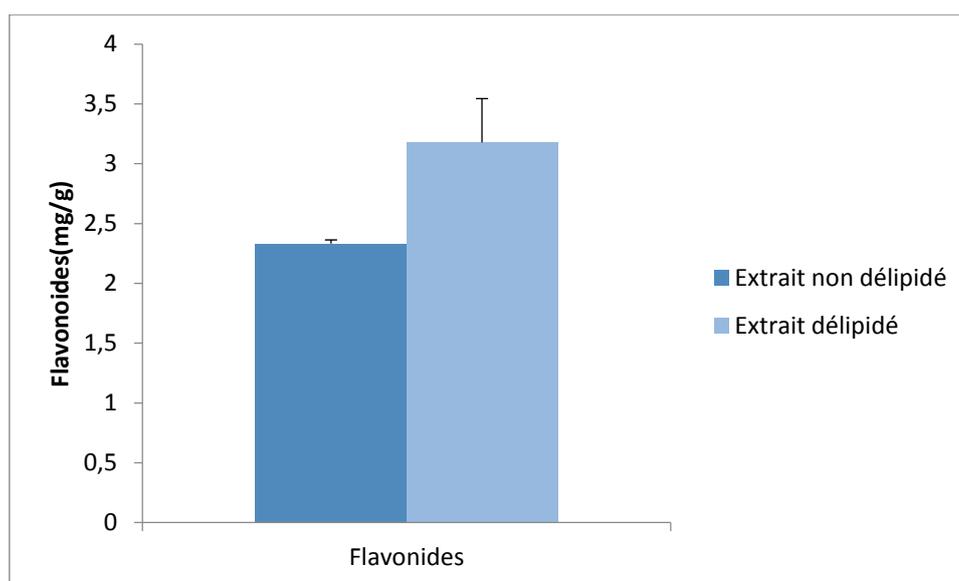


Figure 06 : Teneurs en flavonoïdes

II-6- Dosage des tanins :

Afin de tracer cette courbe d'étalonnage, on a choisi la catéchine comme référence.

La formule de régression linéaire de cette courbe est de $y = 0.1161x$, avec un coefficient de détermination ($R^2 = 0.9968$) (figure 7).

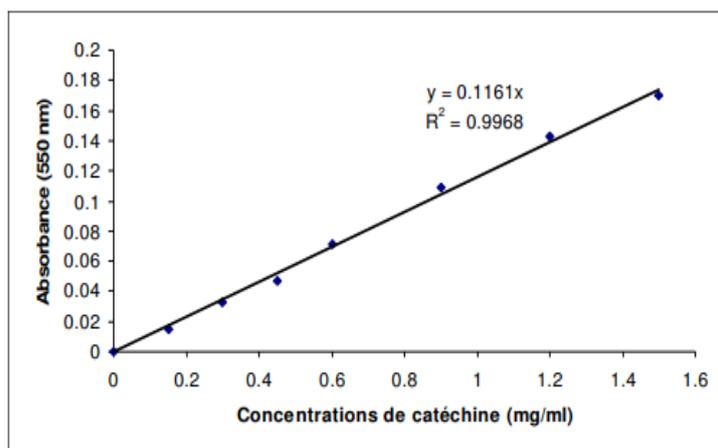


Figure 07 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

II-7-Dosage des tanins condensés :

Les teneurs en tanins condensés représentés dans le tableau 05 et la figure montrent une valeur supérieure avec 0.61 ± 0.01 mg, g dans l'extrait brut (non délipidé) comparé aux teneurs de l'extrait délipidé (0.34 ± 0.03 mg, g).

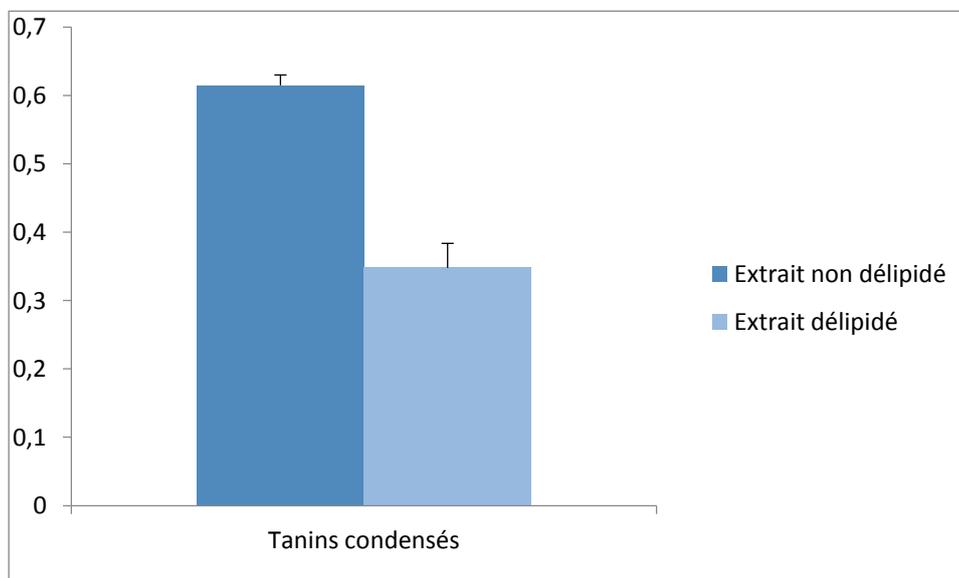


Figure 08 : Teneurs en tanins condensés (mg/g)

III-Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits :

III-1-Le piégeage du radical libre DPPH :

La capacité anti-oxydante de nos extraits est déterminée à partir des IC_{50} . C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Les valeurs des IC_{50} trouvées pour nos extraits testés sont représentées dans le tableau 06.

La gamme des concentrations utilisée est de 0.0625 à 2 mg, mL. Les densités optiques enregistrées montrent une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction concentrations utilisées. Les résultats montrent que l'extrait non délipidé des grignons d'olive a le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH avec un pourcentage d'inhibition a atteint plus de 94% à une concentration de 2 mg, mL et 12% à la concentration 0.0625 mg, mL comparé à l'extrait délipidé avec un pourcentage de 93% à la concentration 2 mg, ml et 7% à la concentration 0.0625 mg, mL (figure 09).

Tableau 07 : Résultats du piégeage du radical DPPH des extraits non délipidé et délipidé exprimés en mg/mL

Extrait	Non délipidé (brut)	Dé lipide
IC₅₀ (mg/ml)	0.28 ± 0.003	0.30 ± 0.008

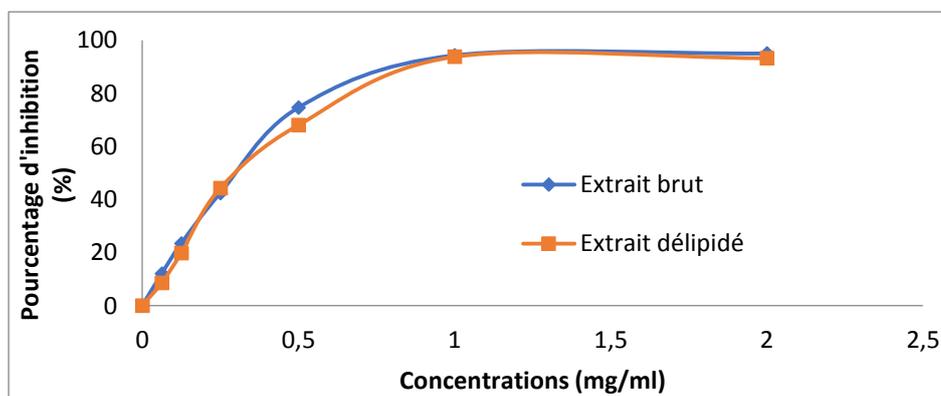


Figure 09 : Pourcentage d'inhibition % de DPPH en fonction des concentrations (mg, mL) de l'extrait non délipidé et délipidé des grignons d'olives.

III-2-La réduction du fer (FRAP) :

La réduction du complexe de cyanure ferrique à la forme ferreux en donnant un électron, a été indiqué par l'apparition d'une couleur bleue à la fin de la réaction. La quantité de Fe^{2+} augmente avec l'augmentation de la concentration à 700 nm.

Dans notre travail, nous avons testé les deux extraits de grignons d'olives brut et délipidé à des concentrations allant entre 0.0625 et 2 mg, mL. Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer des courbes à allures linéaires de la D.O. à 700 nm en fonction des concentrations mg, mL. Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer des courbes à allures linéaires et avec R^2 entre 0.90 et 0.99. Les résultats obtenus montrent que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons.

La capacité réductrice des différents extraits est exprimée en EC_{50} qui représente la concentration efficace qui correspond à une absorbance égale à 0.5. Les résultats obtenus montrent que la capacité réductrice de l'extrait délipidé est supérieur de celle d'extrait non délipidé soit respectivement ; 1.69 et 1.39 à la concentration 0.5 mg/mL.

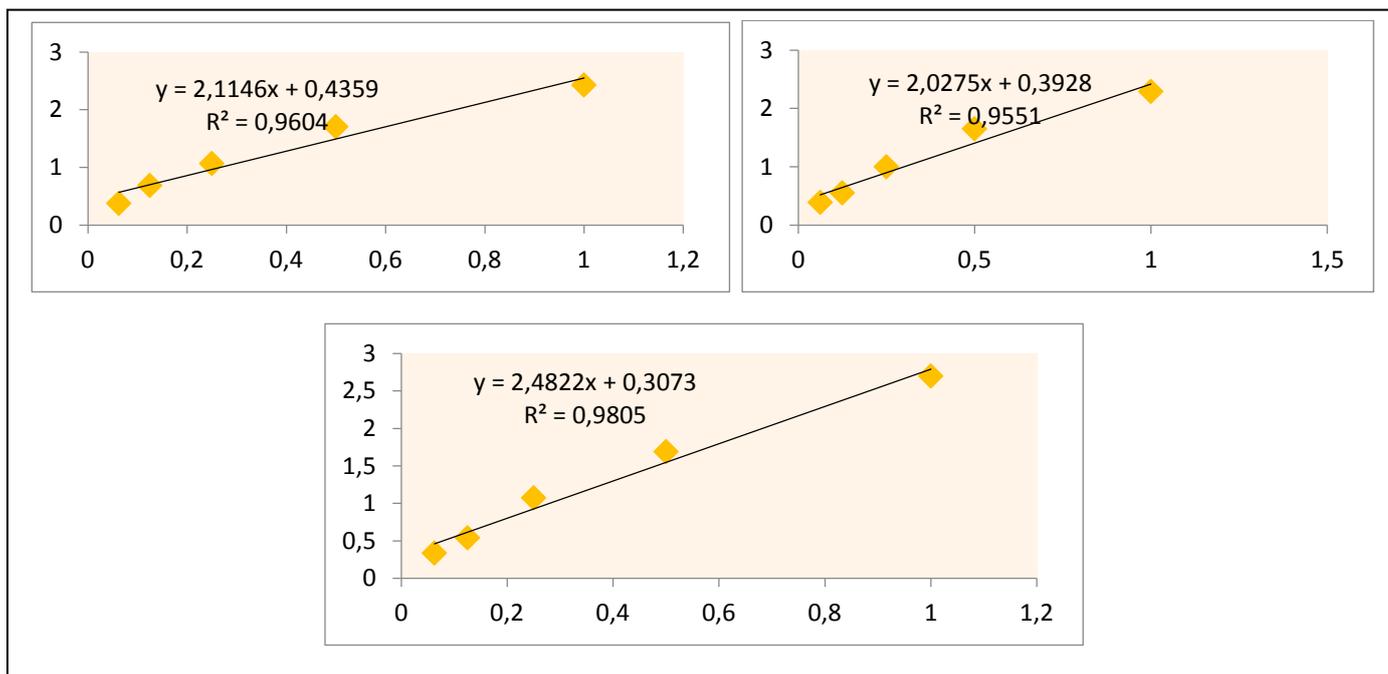


Figure 10 : Tracés de calibration de l'inhibition de l'activité (FRAP) en différentes concentrations (Extrait non délipidé)

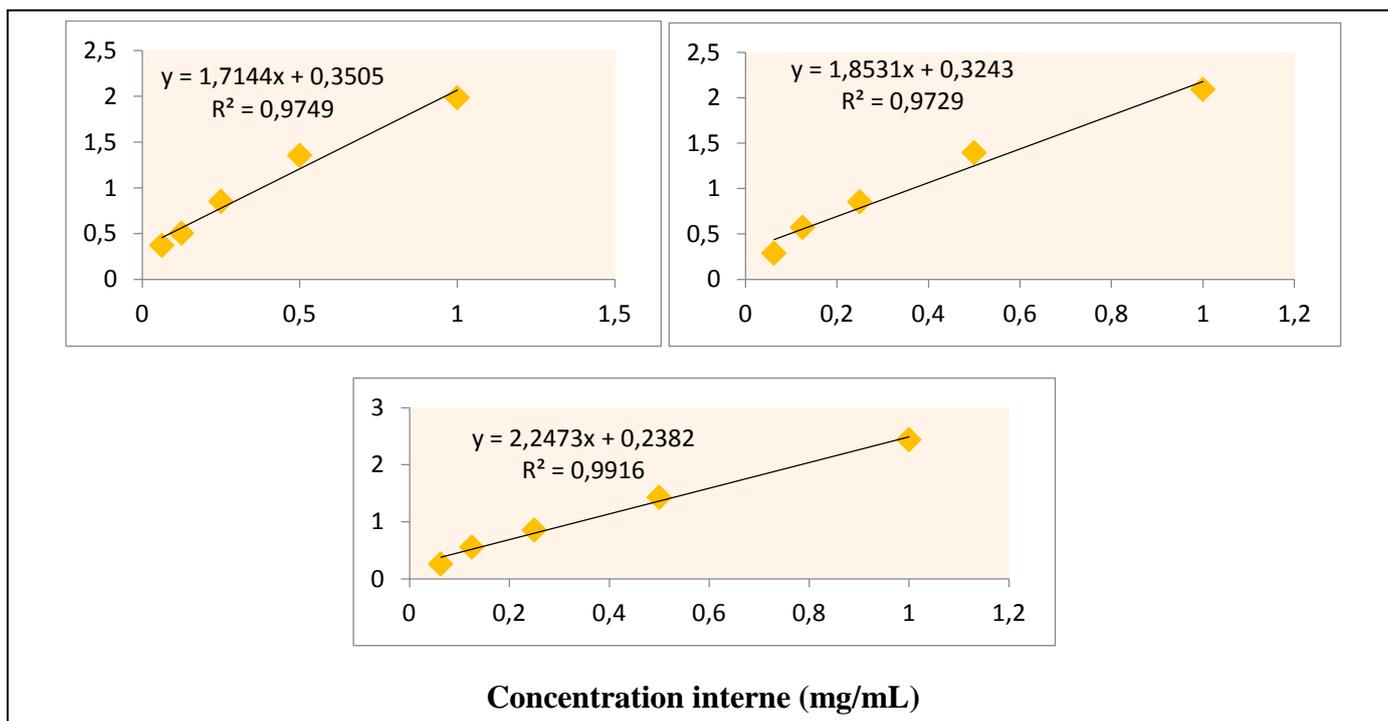


Figure 11 : Tracés de calibration de l'inhibition de l'activité (FRAP) en différentes concentrations (Extrait délipidé)

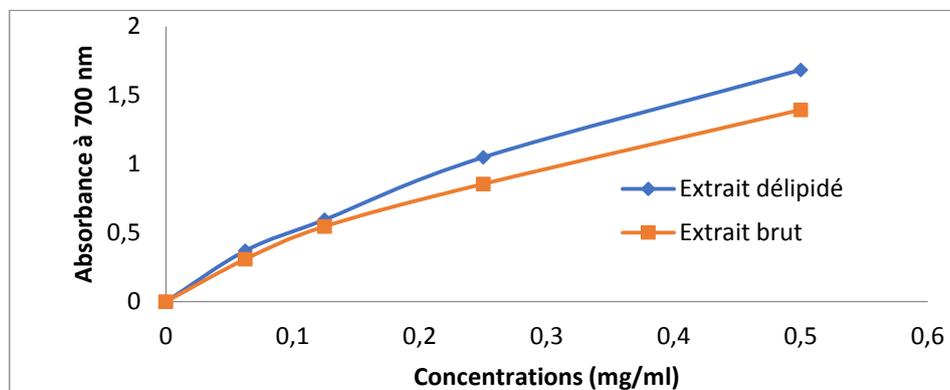


Figure 12 : L'activité réductrice de fer de l'extrait non délipidé (brut) et l'extrait délipidé des grignons d'olives

Discussion

Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants contribuent de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouvelles méthodologies de synthèse et la préparation de molécules à usage thérapeutique constituent un objectif majeur et une préoccupation permanente pour de nombreux chercheurs (**Bentabet N. et al., 2014 ; Belmamoun et al., 2023**).

Dans notre travail, on a choisi un déchet précieux très riche en antioxydants. Le grignon d'olive est le déchet principal de la production d'huile d'olive, il est considéré comme un phyto-toxique en raison de sa forte teneur en composés phénoliques (**Nunes et al., 2018**).

On a choisi pour l'extraction des composés phénolique de nos extraits un mélange méthanol, eau comme un solvant d'extraction par macération qu'elle semble être la meilleure méthode d'extraction des polyphénols totaux et la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles (**Mahmoudi et al., 2013**).

Selon les résultats obtenus, nous observons une nette différence entre les deux rendements d'extraction des grignons d'olive. Le meilleur rendement est enregistré pour l'extrait brut hydro-méthanolique avec 9% et 8.2 % pour l'extrait hydro-méthanolique délipidé. Cette différence de rendement est due à l'extraction d'une quantité considérable d'huiles des grignons d'olive (4.55 %). Ce rendement en huile est en relation avec le procédé d'extraction employé ; c'est-à-dire les grignons bruts n'ont subi aucun traitement de séparation des phases ce qui signifie la teneur élevée en gras (**Verge-Mèrida et al., 2022**). Le rendement massique en polyphénols totaux est proche des résultats de **Zhao et al. (2022)** indiquant que le méthanol et l'eau donne un rendement de 41 % pour 1 kg des grignons d'olive. Toutefois, il est difficile de comparer nos résultats concernant l'extrait délipidé avec ceux de la bibliographie, car d'après notre recherche aucun travail n'a été effectué sur cet extrait. Aussi, il est difficile de comparer strictement nos résultats même pour l'extrait brut puisque le rendement n'est que relatif et dépend de l'espèce végétale étudiée, le type des grignons, les conditions de séchage et d'entreposage, le contenu de chaque espèce en métabolites secondaires, la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement, polarité ainsi que la méthode d'extraction elle-même.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la richesse des grignons d'olive en diverses classes de métabolites secondaires (tableau 01) ce qui est confirmé par plusieurs

chercheurs (Aliakbarian et al., 2012, Mouzoui et al., 2014 ; De Bruno et al., 2018 ; Ribeiro et al., 2020).

D'après nos résultats notés dans le tableau 05 sur la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins montrent une différence significative ($p \leq 0.05$) entre les deux extraits. Alors on remarque des valeurs élevées en polyphénols totaux et flavonoïdes ; c'est due à l'étape de délipidation ou l'extraction de Soxhlet est effectuée afin d'éliminer les lipides qui peuvent gêner l'extraction des polyphénols en utilisant un solvant apolaire qui est l'hexane. Ce solvant capte les lipides dans la phase organique tandis que les polyphénols restent dans la phase aqueuse. C'est une technique classique qui permet d'avoir un bon rendement (**Seddiki et al., 2017**). Les concentrations en polyphénols dans l'extrait délipidé et non délipidé sont 10.36 ± 0.76 mgGAE, g et 8.48 ± 0.5 mgGAE, g respectivement, ce qui est proche des résultats de **Mouzoui et al. (2014)** (10.8mg, g). En outre **Zhao et al. (2023)** trouvent des teneurs importants des PT (69 mgGAE, g) en utilisant 20 g des GO dans 100 mL (70 éthanol, 30mL eau). En effet, la variabilité de la teneur en PT est largement dépendante de plusieurs facteurs : cultivar, degré de maturation, des conditions climatiques, géographiques, de l'état physiologique et l'âge de la plante aussi la nature du matériel de départ, conditions de conservation et la méthode d'extraction adoptée (**Nunes M et al., 2020**).

Plusieurs travaux antérieurs ont confirmé le puissant pouvoir antioxydant de l'extrait des grignons d'olive (**Liu J et al., 2011 ; Aliakbarian et al., 2012 ; ; Cepo et al., 2018 ; Cherad et Bouderbala , 2019 ; Mateos et al., 2020**).

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité. Le radical DPPH a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure – activité antioxydante des composés phénoliques (**Bentabet et al., 2014**). Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du DPPH montrent que l'extrait hydro-méthanolique délipidé présente une activité de piégeage du radical libre DPPH plus importante que celle de l'extrait non délipidé avec une $CI_{50} = 0.30 \pm 0.008$ mg, mL et 0.28 ± 0.003 mg, mL respectivement. Les deux extraits ont montré un effet antiradicalaire meilleur que celui de l'antioxydant de référence BHT = 0.090 mg, mL. Cette activité antioxydante marquée peut être expliquée par la présence des groupements hydroxyles des composés phénoliques comme *l'oleuropéine*,

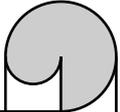
l'hydroxytyrosol contenus dans l'extrait de GO est cela est confirmé par **Hayes et al. (2011)**, et due à l'épuisement des teneurs des composés phénoliques responsables de l'activité antioxydante surtout l'hydroxytyrosol le composé phénolique le plus représentatif dans les grignons d'olive allant de 10 à 238 mg, 100g (**Nunes et al., 2020**).

Le pouvoir réducteur de fer a été confirmé dans plusieurs travaux (**Nunes et al., 2020 ; Gómez-Cruz et al., 2021 ; Tapia-Quirós et al., 2022**). Les résultats montrent que ED a un pouvoir réducteur plus important que EB avec des $CE_{50}=0.09 \pm 0.01$ et 0.06 ± 0.01 ces résultats est expliqués par la présence des polyphénols et flavonoïdes dans nos extraits qui donne un pouvoir réducteur ferrique. Les résultats rapportés par des travaux antérieurs sur l'activité antioxydante et FRAP montrent des résultats déférents. **Vidal et al. (2022)** présentent une valeur de 0.37 mg,ml pour le pouvoir réducteur de fer et 0.58 mg, mL pour l'activité antioxydante (DPPH). **Martínez et al. (2023)** ont montré aussi une CI_{50} (0.66 ± 0.03) mg, mL avec un pouvoir réducteur est égale à 0.71 mg, mL. Cette différence des résultats est en relation avec le solvant utilisé s'expliquerait par le fait que la fixation des composés chimiques de la plante par un solvant donné, plus le type de la méthode d'extraction et de l'organe végétale considéré (**Zhao et al., 2023**).

Conclusion

Dans ce chapitre, et selon les résultats obtenus, on peut conclure que les grignons d'olives sont une source naturelle importante des polyphénols, et qui sont caractérisés par une activité antioxydante déterminée et confirmée par la méthode de DPPH et FRAP.

Alors, il serait intéressant de chercher des moyens de valorisation des grignons d'olives et de les transformer d'un produit polluant à un complément naturel dans la prévention des maladies. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés dans la suite du travail d'étudier l'activité antioxydante et l'effet métabolique de cet extrait *in vivo*.



Chapitre II

**Effet métabolique et
l'activité anti-oxydante de
l'extrait du grignon d'olive
au cours d'obésité**

I- L'obésité : maladie du siècle

La prévalence du surpoids et de l'obésité est en augmentation dans le monde depuis plusieurs décennies chez les hommes comme chez les femmes (**Lauby-Secretan et al., 2019**).

I-1 Généralité

L'obésité est une maladie chronique qui représente aujourd'hui l'un des problèmes de santé publique les plus importants. Définie par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg,m² (**Montana et al., 2022**). C'est un état physiopathologique qui résulte d'un déséquilibre entre l'apport calorique et les dépenses énergétiques. Elle est caractérisée par une accumulation de masse adipeuse, répartie de façon généralisée dans diverses zones de l'organisme (**Mayoral et al., 2020**).

Trois niveaux de sévérité d'obésité sont distingués : obésité de classe I ($30,0 \leq \text{IMC} \leq 34,9$), obésité de classe II ou sévère ($35,0 \leq \text{IMC} \leq 39,9$), et obésité de classe III ou morbide ($\text{IMC} \geq 40$). Il est montré en effet que plus l'IMC augmente, plus la morbi-mortalité s'élève. Mais cette classification ne permet pas d'apprécier la répartition de la masse grasse. Cependant, la distribution de la graisse corporelle jouant un rôle dans les risques de pathologies associées, d'autres mesures anthropométriques sont aussi utilisées pour définir l'obésité, en faisant intervenir d'autres facteurs que le poids et la taille des individus : le tour de taille (en centimètres), le tour de hanches (en centimètres) ou encore le rapport taille-hanche sont souvent utilisés dans les études épidémiologiques comme mesures indirectes de l'obésité abdominale ou centrale (**Laury-Secretan et al., 2019 ; Faucher et Poitou, 2016**).

Pour beaucoup d'individus, « aujourd'hui, le mot qui fait peur est l'obésité ». Cette peur paraît d'autant plus insidieuse, car une partie du danger peut se cacher au cœur de ce qui alimente la vie : la nourriture. En même temps, cette peur transcende les questions sanitaires, la condition que l'on appelle obésité étant souvent perçue plutôt comme un problème moral et esthétique (**Sagni, 2019**).

I-2- Les différents stades d'obésité

L'obésité résulte de l'interaction complexe de nombreux facteurs génétiques, métaboliques, comportementaux et environnementaux, et ces derniers seraient la cause la plus probable de l'accroissement substantiel de sa prévalence (**CMAG, 2020**). Caractérisée par une évolution chronique avec différentes phases successives : constitution, entretien de l'excès de poids et fluctuations pondérales. Chaque phase correspond à des situations physiopathologiques, cliniques, thérapeutiques radicalement différentes (**Bates et al., 2020**).

Avant même l'initiation de la prise de poids, il existe une phase préclinique allant de la période intra-utérine aux premiers signes de modification de la corpulence. Les facteurs biologiques (épigénétiques, génétiques, développement de la masse grasse) sont ici importants. Le stade initial de constitution, plus ou moins précoce selon les individus est caractérisé par un déséquilibre énergétique avec des entrées supérieures aux sorties d'énergie. Cliniquement, il y a une augmentation du stock adipeux et une augmentation adaptative de la masse maigre. Il est commun de penser que le développement de la masse grasse est secondaire à un déséquilibre de la balance énergétique (**Dargent, 2020**).

La phase de maintien résulte d'un nouvel équilibre énergétique et de modifications des capacités de stockage.

Une phase d'aggravation de la maladie aboutit au stade d'obésité constituée caractérisée par l'apparition de comorbidités à la fois métaboliques (diabète de type 2, hypertension, dyslipidémie, NASH) et mécaniques (apnées du sommeil, atteintes rhumatologiques, insuffisance veineuse, lymphœdème). Cette phase est aussi marquée par des fluctuations pondérales en lien avec des tentatives répétées de perte de poids très souvent suivies de rebonds pondéraux. Ces épisodes de « yo-yo » pondéral ont des conséquences psychologiques (troubles de l'estime de soi, troubles du comportement alimentaire) et physiques indéniables (diminution de la masse maigre, modifications du métabolisme énergétique) et aboutissent in fine à une aggravation du poids (**Piché et al., 2020 ; Faucher et al., 2016**).

I-3- Les types d'obésité

Deux phénotypes d'obésité ont été mis en évidence selon la répartition régionale de tissu adipeux : obésité gynoïde et androïde.

- **L'obésité androïde (abdominale) :** la masse grasse se répartit à la région abdominale, au niveau du haut du corps (ventre, cou, poitrine). Elle est fortement corrélée à l'insulinorésistance, au diabète de type 2, à l'hypertension et à la dyslipidémie, indépendamment de l'obésité globale (**Kim et Shin, 2020**).

L'obésité centrale ou abdominale est contenue dans des compartiments séparés. La couche de graisse sous-cutanée est parfois considérable dans la région abdominale. La graisse viscérale intra-abdominale s'accumule dans l'épiploon, le mésentère, le foie et le pancréas. Cette graisse viscérale se retrouve aussi hors de l'abdomen, comme dans le péricarde, le myocarde et les muscles squelettiques (**Bosomworth, 2019**).

- **L'obésité gynoïde** (Excès de tissu adipeux localisé essentiellement sur la partie inférieure du corps : cuisses et fesses) est plus rarement associée à ces désordres métaboliques.

En effet, les dépôts adipeux du haut du corps, caractéristiques de l'obésité androïde, ont une activité lipolytique plus importante que les dépôts adipeux inférieurs, caractéristiques de l'obésité gynoïde (**Kim et Shin, 2020**).

I-4- Les causes et les facteurs de risque de l'obésité

Selon le modèle proposé par **The Obesity Society (2015)**, des facteurs associés aux comportements de l'individu ainsi que d'autres externes à l'individu jouent un rôle important dans le déséquilibre énergétique ou interne (psychologique ou biologique). En effet, des facteurs en lien avec l'environnement, les habitudes de vie et les comportements de l'individu influencent directement ou indirectement la dépense énergétique (comportements sédentaires et niveau d'activité physique) et les apports énergétiques (habitudes alimentaires : quantité et qualité des aliments) favorisant ainsi un déséquilibre énergétique positif menant à long terme au développement de l'obésité (**Talimila et al., 2019 ; Fruh, 2017**).

Les facteurs sociodémographiques, le sexe, l'âge et le statut matrimonial étaient significativement associés à l'obésité. Les femmes étaient 2,5 fois plus à risque de devenir obèse que les hommes (**Talimila et al., 2019**).

Cependant, tous ces facteurs, entraînant une balance énergétique positive ne suffisent pas pour expliquer l'augmentation de la fréquence de l'obésité, ni « l'inégalité » des individus vis-à-vis de la prise de poids : certaines personnes prennent en effet plus de poids que d'autres, alors qu'elles ont les mêmes modes de vie (**Faucher et al., 2016**). La prédisposition génétique pourrait provenir de mécanismes épigénétiques qui correspondent à l'empreinte laissée par les conditions intra-utérines ou post-natales (dénutrition, obésité, diabète) sur le système de régulation énergétique alors la génétique joue un rôle important dans le développement de l'obésité (**Jarosz et al., 2022**).



Figure 13 : Facteurs favorisant le surpoids (obésité) (Safaei et al., 2021)

I-5- Physiopathologie de l'obésité

L'obésité est une maladie chronique complexe, multifactorielle, caractérisée par une hétérogénéité importante des situations cliniques rencontrées et des trajectoires d'évolution pondérale (Seravalle et Grassi, 2017).

Le développement de l'obésité suppose une régulation anormale de la balance énergétique et, ou de celle des macronutriments. Lorsque les apports énergétiques sont supérieurs aux dépenses, l'excès des calories est stocké sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Le cerveau joue un rôle central dans l'homéostasie de l'énergie en régulant l'apport alimentaire et la dépense énergétique. Les lipides ont un rôle clef par rapport aux glucides ou aux protéines, car leur densité énergétique élevée et leur palatabilité sont associées à un effet satiétogène relativement faible. De plus, l'oxydation de ces nutriments n'augmente pas quand les apports sont plus importants que les besoins (CMAJ, 2020 ; Catalano et al., 2017).

I-5-1- Le tissu adipeux

Le tissu graisseux ou tissu adipeux (TA) est le principal réservoir d'énergie mobilisable de l'organisme. Classiquement, le tissu adipeux répond aux besoins énergétiques en période de stress (jeun, agression) en libérant des acides gras via la lipolyse et stocke les acides gras en phase d'apport énergétique. Il possède de multiples fonctions, c'est un site de stockage et de production de diverses substances à activité autocrine, paracrine et endocrine qui influencent les comportements, la régulation énergétique, l'oxydation des lipides, la fonction immune, les

fonctions vasculaires, la situation hormonale ainsi que son propre métabolisme et sa cellularité (**Jackson et al., 2018**).

Le concept définissant le TA comme étant principalement un organe de stockage a été complètement révisé après la découverte de la leptine, en 1994. La leptine, sécrétée par les adipocytes, occupe un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie énergétique, par ses effets anorexigéniques via son action principalement au niveau du système nerveux central. Elle exerce des effets insulino-sensibilisateurs en stimulant, notamment, l'oxydation des lipides et les réponses anti-inflammatoires des tissus périphériques (**Marcelin et Clément, 2018**).

I-5-2- Obésité et Tissu adipeux

Dans l'obésité, l'accroissement de la masse adipeuse repose sur une hypertrophie (augmentation de la taille) et une hyperplasie (augmentation du nombre) des adipocytes. Ces mécanismes sont modulés par des facteurs environnementaux et génétiques, mais les voies moléculaires favorisant l'un ou l'autre mode d'expansion demeurent largement méconnue.

(**Kawai et al., 2021**). Lorsque les capacités de stockage du tissu adipeux sous-cutané sont dépassées, il existe une accumulation ectopique du tissu adipeux au niveau viscéral, mais également au niveau d'organes multiples tels que le muscle, le cœur (épicaarde), le pancréas, les vaisseaux, et le foie (stéatose hépatique). Ces dépôts ectopiques de tissu adipeux sont responsables de morbidité de l'obésité (**Milic et al., 2014**).

Le tissu adipeux blanc comporte en réalité une grande diversité cellulaire. La fraction cellulaire non adipocytaire ou stromale est composée de cellules endothéliales, de fibroblastes et de préadipocytes, mais également de cellules du système immunitaire inné, principalement des macrophages, et de cellules du système immunitaire adaptatif, principalement des lymphocytes T, des cellules NK (natural killer) et des mastocytes (**Clément, 2011**).

Les adipocytes eux-mêmes sont capables de produire de nombreuses biomolécules pro- ou anti-inflammatoires. L'accroissement de la taille des adipocytes, qui caractérise l'état obèse, altère leur profil de sécrétion et induit un statut pro-inflammatoire, alors que les signaux impliqués ne sont pas clairement définis. La répartition caractéristique des macrophages en couronne autour d'adipocytes présentant des signes de mort cellulaire suggère l'intervention de facteurs attractants spécifique (**Kawai et al., 2021**). Dans le tissu adipeux, des signaux exogènes comme les acides gras ou les lipopolysaccharides (LPS) d'origine bactérienne induisent une réponse inflammatoire en activant le récepteur TLR4 (toll like receptor 4) et les

voies de signalisation intracellulaires associées, principalement la voie NFκB. Localement, les adipocytes inflammatoires, dont l'activité lipolytique est élevée, libèrent des acides gras qui stimulent la voie TLR4/NFκB dans les macrophages, contribuant ainsi à une boucle paracrine délétère entre les deux types cellulaires (Clément, 2011). L'existence d'un état inflammatoire chronique de bas niveau dans l'obésité pouvant intervenir dans la physiopathologie de la maladie.

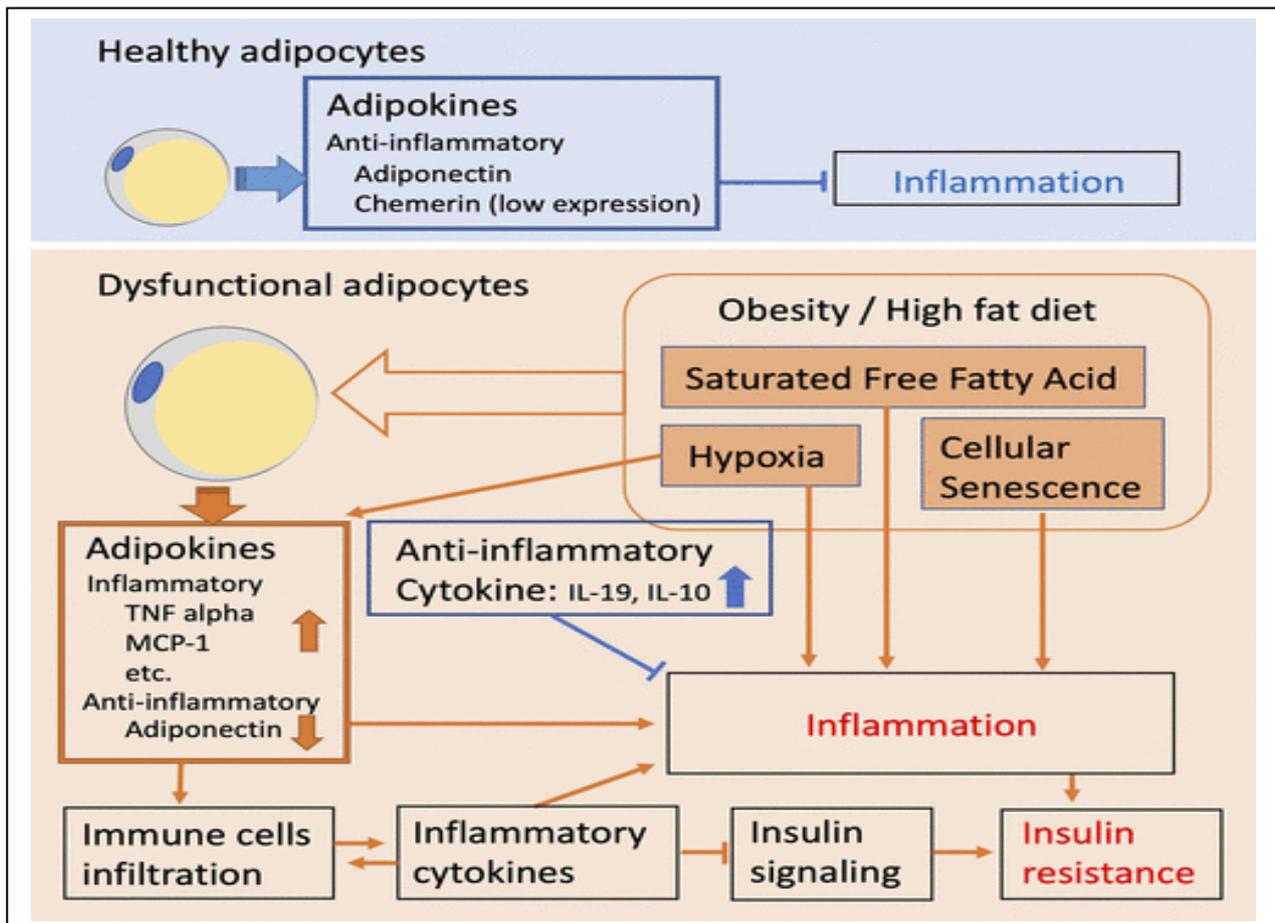


Figure 14 : Inflammation des adipocytes au cours d'obésité (Kawai et al., 2021)

I-6- Les complications liées à l'obésité

Reconnue par l'OMS comme une maladie « chronique » grave à l'origine de complications sévères parfois mortelles. Elle est définie par une adiposité accrue, mais s'accompagne d'un syndrome d'insulinorésistance ou syndrome métabolique. En outre, plus la quantité de graisses dans le corps est importante, plus l'organisme devient résistant à l'effet de l'insuline.

Lorsque la production d'insuline ne suffit plus à compenser la résistance périphérique à l'insuline, notamment au niveau du muscle, c'est le diabète : une personne obèse a trois fois plus de risque d'être diabétique qu'une personne non-obèse (Piché et al., 2020).

D'autres pathologies sont associées au développement de l'obésité et de l'insulinorésistance : l'hypertension artérielle (HTA), l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les artériopathies diffusent et autres complications propres à ces états pathologiques.

Les dyslipidémies, associées au syndrome métabolique en lien avec un dysfonctionnement hépatique, renforcent le risque vasculaire.

Les problèmes respiratoires liés à l'obésité sont avant tout les problèmes d'hypoventilation alvéolaire et les apnées du sommeil (l'apnée est définie par une interruption du débit aérien de plus de 10 secondes). Ces apnées du sommeil affectent 20 à 30 % des sujets obèses.

Les problèmes rhumatologiques sont aussi fréquents, responsables d'arthralgies invalidantes provoquées par des lésions d'arthrose des hanches, genoux et vertèbres, induisant une consommation importante d'antalgiques voire d'antidépresseurs (**Apovian et al., 2013 ; Marcelin et al., 2019**). Au niveau des membres inférieurs, l'obésité est aussi l'origine de jambes lourdes, de varices et de phlébites limitant la qualité de vie.

Il existe également une relation entre excès de poids et certains cancers. Ainsi, chez l'homme, les incidences des cancers gastriques, prostatiques et rénaux sont majorées chez l'obèse tandis que chez la femme, le même phénomène est observé pour les cancers mammaires et utérins (**Weihrauch-Blüher et al., 2019**).

Tableau 08 : Proposition de classification des conséquences de l'obésité (Basdevant et al., 2014)

<i>Métabolique</i>	Insulinorésistance – Diabète - Dyslipidémies Hyperuricémie - Hypoxie - Hypercapnie
<i>Cardiovasculaires</i>	HTA- Insuffisance cardiaque- Troubles du rythme – Athérosclérose - Maladie thromboembolique – Lymphœdème -AVC
<i>Respiratoires</i>	Hypoxémie- Hypoxémie et hypercapnie - SAS -OHS –Asthme
<i>*Articulaires</i> <i>*Mécaniques</i>	Arthrose du genou ou de la hanche Inflammatoires - Goutte
<i>Digestives</i>	Stéatose - NASH - Fibrose.
<i>Autres complications mécaniques</i>	Reflux gastro-oesophagien Incontinence urinaire - HTIC.
<i>Endocrines</i>	SOPK – Hypofertilité- Hyperandrogénie Hypogonadisme
<i>*Complications inflammatoires systémiques</i> <i>*Complications cutanées</i> <i>*Complications oncologiques</i> <i>*Handicap physique</i>	
<i>Complications psychologiques</i>	Dépression
<i>Retentissement social</i>	Isolement social Harcèlement
<i>Discrimination – Diététique - Sarcopénie</i> <i>Médicamenteuse – Valvulopathie -</i>	Iatrogénie

<i>Chirurgicale Interventionnelle.</i>	
<p>HTA : hypertension artérielle ; AVC : accident vasculaire cérébral ; SAS : syndrome d'apnée du sommeil ; HOS : obesity hypoventilation syndrome ; NASH : non alcoholic steato-hepatitis ;</p> <p>HTIC : hypertension intracrânienne ; SOPK : syndrome des ovaires polykystiques.</p>	

I-7- La prise en charge de l'obésité : lutte contre le poids enjeux médicaux et sociaux

Véritable fléau du monde contemporain, l'obésité concerne selon les dernières estimations de l'OMS 1,4 milliard de personnes de 20 ans et plus dans le monde. D'ici 2030, le nombre de personnes en surpoids devrait atteindre 3,3 milliards (**Wharton et al., 2020**).

Comme *Georges Vigarello* le montre dans son *Histoire de l'obésité*, « la lutte contre le poids n'est pas une invention contemporaine » (**Sagni, 2019**). On reconnaît que la gestion de l'obésité devrait viser une amélioration de l'état de santé et du bien-être, et non seulement la perte de poids (**Wharton et al., 2020**). Les traitements actuels ne se focalisent plus sur la seule perte de poids, mais sur une approche thérapeutique multidisciplinaire intégrant médecins nutritionnistes, psychiatres, endocrinologues, gastro-entérologues et chirurgiens afin d'établir des stratégies thérapeutiques adaptées à chaque patient (**Haywood et Sumithran, 2019**).

La prescription d'un régime alimentaire ou d'une médication à une personne obèse n'a que peu de sens. Des patients peuvent ne pas être intéressés ou motivés par la perte de poids, car ils n'ont pas conscience que leur poids est un problème, ou ils ne sont pas intéressés à changer, ou ils sont conscients du problème, mais ils ont juste commencé à penser à modifier leur poids (phase de contemplation). Au cours des premières phases, il ne s'agit pas d'aider le patient à modifier ses habitudes alimentaires ou de le faire maigrir, mais bien de l'aider à développer une meilleure motivation (**Jebai et al., 2019**).

On distingue deux phases thérapeutiques différentes :

Une phase de réduction pondérale : une perte de poids est obtenue lorsque le bilan d'énergie est négatif pendant une durée suffisante, ce qui implique la diminution des apports énergétiques et, ou l'augmentation des dépenses (**Haywood et Sumithran, 2019**).

Une phase de stabilisation pondérale : quelle que soit la stratégie, choisie, la courbe de poids finit par décrire un plateau. Le bilan énergétique est équilibré (entrées = sorties). Le sujet

consomme autant de calories qu'il peut en dépenser en fonction de sa masse maigre et de son activité physique.

Selon les recommandations européennes, les objectifs de la prise en charge de l'obésité ne se limitent pas à la perte de poids, ils comprennent aussi la réduction des risques pour la santé et l'amélioration de l'état de santé.

Les objectifs de perte de poids doivent être réalistes, individualisés et à long terme (**Clément, 2011 ; Faucher et al., 2016**).

Tableau 09 : Objectifs appropriés pour la prise en charge de l'obésité et des *cormobidités* d'après la WHO, 2000

Obésité ou <i>cormobidité</i>	Objectifs appropriés
Adiposité	Réduire de 5 à 15 % du poids corporel (une perte de poids inférieure est également acceptable si la perte de graisse abdominale est suffisante pour procurer un bénéfice métabolique).
Graisse Abdominale	Réduire le tour de taille
Diabète insulino-dépendant ou intolérance au glucose.	Améliorer le contrôle glycémique, c'est-à-dire faire baisser la glycémie à jeun et les concentrations d'hémoglobine glycosylée, et réduire le recours aux hypoglycémifiants par voie orale et/ou à l'insuline.
Hypertension	Faire baisser la tension artérielle et avoir moins recours aux antihypertenseurs.
Dyslipidémie	Obtenir des améliorations sensibles du LDL-cholestérol, des triglycérides à jeun, du HDL-cholestérol.
Apnée du sommeil	Réduire les apnées du sommeil, améliorer la fonction pulmonaire.
Arthrose et dorsalgie	Diminuer la douleur, augmenter la mobilité,

	réduire le recours aux médicaments
Dysfonction reproductive	Améliorer la fonction de reproduction. Restaurer des menstruations régulières.
Difficultés psychologiques et sociales	Améliorer la qualité de vie, réduire l'anxiété, réduire la dépression, améliorer les interactions sociales.
Fatigue, sueurs profuses, essoufflement	Améliorer ou réduire la sévérité.
Intolérance à l'exercice	Améliorer la tolérance à l'activité physique, diminuer l'essoufflement.

« L'augmentation de la masse grasse serait le prix à payer pour rétablir l'équilibre énergétique face à la pression de l'environnement et aux évolutions des modes de vie ». *Arnaud Basdevant.*

II- Stress Oxydatif

II-1- Définition

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants – antioxydants » en faveur des oxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec une perturbation des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (**Touyz et al., 2020**).

II-2- Les radicaux libres

Le terme radical a été introduit pour la première fois en 1786 par Guyton de Morveau (**Di Meo et Venditti, 2020**). Un radical libre est une molécule instable très réactive qui présente un électron non apparié, et qui n'a de cesse de vouloir arracher un électron à la molécule voisine. Des ERO importants sont l'anion superoxide ($\bullet\text{O}_2^-$), le peroxyde d'hydrogène, les radicaux hydroxyles et certains enzymes (xanthine oxydase, NADPH oxydase) (**Geny et al., 2019**). Ces molécules sont rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés dans l'orbitale la plus externe. L'équilibre est rétabli soit par oxydation (perte de cet électron libre) ou par réduction (gain d'un autre électron). Le caractère

radicalaire de la molécule ne disparaît pas, l'électron libre peut passer sur d'autres molécules, c'est le phénomène d'oxydation en chaîne (**Bensakhria, 2018**).

La mitochondrie est la source principale de ROS. En effet, si 98 % de l'oxygène utilisé par la mitochondrie lui permet de générer l'indispensable ATP, les 2 % restants favorisent la production de RO. En faible quantité, ces radicaux libres ne sont pas délétères. Par contre, en quantité importante et, ou si l'exposition est prolongée, ces ERO entraînent des altérations majeures incluant peroxydation lipidique, carboxylation protéique et, ou fragmentation de l'ADN, voire mort cellulaire par apoptose secondaire à l'ouverture du pore de transition mitochondrial (**Alkadi, 2020**). Cependant, ces espèces réactives sont également des produits essentiels au fonctionnement cellulaire ; elles seraient impliquées dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée et agiraient comme second messager (**Di Meo et Venditti, 2020**).

Les radicaux libres peuvent être d'origine exogène (rayons X et lumière UV), polluants de l'air, solvants organiques, xénobiotiques, anesthésique, drogue et hyperoxie ; ou d'origine endogène au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies (**Sharma et al., 2018**).

II-3- Les antioxydants

Afin de se protéger contre l'effet délétère des espèces réactives de l'oxygène (ERO), notre organisme possède un système antioxydant de protection composé d'enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase), de molécules de petite taille (vitamines A, C, E, glutathion, ubiquinone, acide urique, etc.) et d'oligoéléments (sélénium, zinc) (**Alkadi, 2020**). Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en polyphénols et flavonoïdes (quercétine, rutine, resvératrol, pycnogénol) qui se retrouvent en grande quantité dans les produits végétaux (**Ticinesi et al., 2023**). Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases et ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (**Hennebelle et al., 2004**). On distingue deux catégories de système de défense : le système endogène est constitué d'enzymes ou d'agents réducteurs (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, complexe enzymatique de la thiorédoxine) dont l'action est de neutraliser les ERO par leur transformation en molécules stables et non réactives. L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le

rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire. Parmi ceux-ci, on retrouve certaines vitamines : la vitamine E (α tocophérol), la vitamine C (ascorbate), les caroténoïdes (vitamine A et β -carotène, les flavonoïdes...) (Ali et al., 2020).

II-3-1- Les antioxydants enzymatiques

Pour lutter contre l'excès de production des ERO, l'organisme dispose d'un arsenal important d'enzymes antioxydantes ubiquitaires : les superoxydes dismutases (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase.

► *Superoxyde dismutase (SOD)*

L'enzyme superoxyde dismutase (SOD) est impliquée dans la neutralisation de l' $O_2^{\bullet-}$ en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), évitant ainsi la formation de dérivés plus toxiques comme la peroxynitrite ($ONOO^-$) ou le radical hydroxyle (HO^{\bullet}). L'activité SOD constitue un élément essentiel dans le système cellulaire antioxydant pour protéger la matrice extracellulaire ainsi que les cellules des effets délétères de l' $O_2^{\bullet-}$ et de ces dérivés.

La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en dioxygène et H_2O_2 . Et le H_2O_2 est métabolisé par la GPx ou la catalase (une synergie d'action complexe) (Ighodaro et Akinloye, 2018).

► *Glutathion peroxydase (Gpx)*

La glutathion peroxydase est une sélénoprotéine ayant fonction d'enzyme, elle a besoin de sélénium pour fonctionner (cofacteur) d'où les propriétés anti-oxydantes de cet élément. On trouve des GPX dans le cytosol, le plasma et les membranes cellulaires. Elle est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Elle lutte contre la formation d' H_2O_2 très corrosive. Les plus dangereux sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion peroxynitrite et les peroxydes organiques. La fonction de cette enzyme ne se limite pas à éliminer l'eau oxygénée puisqu'elle élimine aussi les produits toxiques issus de l'oxydation des acides gras à longue chaînes ou du cholestérol.

Cet enzyme joue un rôle très complexe dans la régulation de l'apoptose, aussi dans la transcription de gènes pro- et anti-inflammatoires ou de gènes codant pour l'expression d'enzymes anti-oxydantes. La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Moreti et al., 2017).

► *Catalase*

La fonction de la catalase est l'élimination du peroxyde d'hydrogène produit chez les organismes aérobies. . Le rôle de la catalase est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier. Son activité est particulièrement abondante dans les globules rouges, le foie et les reins. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (**Blackman et Hardham, 2008**).

Tableau 10 : Variation des enzymes anti-oxydantes (Baudin, 2020)

Enzymes	Diminution	Augmentation
SOD	<ul style="list-style-type: none"> - Vieillessement - Déficit héréditaire (SLA) - Maladies inflammatoires ou auto-immunes - Cancers - Déficit en cuivre 	<ul style="list-style-type: none"> - Ischémie coronarienne - Syndrome de détresse respiratoire aiguë - Anémie, thalassémies - Chimiothérapies pro-oxydantes - Hépatites - Insuffisance rénale - Trisomie 21 et schizophrénie
Gpx	<ul style="list-style-type: none"> - Vieillessement - Déficit en sélénium (malnutrition, Sida) - Alcoolisme - Maladie de Parkinson - Mucoviscidose - Phénylcétonurie - Arthrite rhumatoïde 	<ul style="list-style-type: none"> - Tabagisme - Exercice physique - Anémies hémolytiques - Trisomie 21 - Maladie d'Alzheimer
Catalase	<ul style="list-style-type: none"> - Vieillessement 	<ul style="list-style-type: none"> - Maladies inflammatoires et infectieuses (pancréatites)
Myéloperoxydase		<ul style="list-style-type: none"> - Maladies artérielles athéromateuses - Diabète, affections hépatiques et rénales

II-3-2 -Les antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non-enzymatiques prennent également une part importante dans la destruction des radicaux libres présents dans l'organisme. Ils se présentent sous différentes formes : les oligoéléments, les vitamines, les polyphénols, etc.

► Les vitamines

La vitamine C ou l'acide ascorbique est un nutriment essentiel pour l'homme, hydrosoluble, elle exerce diverses activités biologiques notamment comme co-substrat de plusieurs oxygénases et d'oxydases. Aussi, elle est un important antioxydant capable d'interagir avec les dérivés oxygénés. Cette vitamine est capable de réagir directement avec les radicaux : superoxyde, hydroxyle et l'oxygène singlet ou comme un cofacteur de plusieurs enzymes (**Padayatty et al., 2003**).

La vitamine E est l'antioxydant liposoluble qui a la plus grande concentration molaire cellulaire, elle permet de diminuer la peroxydation lipidique qui touche les acides gras insaturés dans la membrane cellulaire et au sein des LDL. Cette vitamine est capable d'arrêter les chaînes radicalaires (chain-breaking antioxidant) en faisant réagir le groupement phénol qu'elle porte avec des radicaux des chaînes de peroxydation lipidiques (L-OO), intermédiaires radicalaires des chaînes de peroxydation pour les transformer en hydroperoxydes lipidiques, tout en donnant naissance à un radical tocophéryle (**Mustacich et al., 2007 ; Miyazawa et al., 2019**).

La vitamine A est un antioxydant liposoluble, capable aussi d'arrêter les chaînes de peroxydation en se combinant avec les radicaux peroxydes. Elle semble même plus efficace que la vitamine E dans certains systèmes où l'agent initiant les dommages radicalaires est présenté à l'intérieur de la bicouche lipidique (**Blaner et al., 2021**).

► Les oligoéléments

Les oligoéléments jouent un rôle primordial comme cofacteur des enzymes anti-oxydantes: les superoxydes dismutases (SOD) et les glutathions peroxydases (GPx).

Le Sélénium est un élément minéral principal composant des sélénoprotéines, intervient au niveau des fonctions enzymatiques et préserve la qualité des membranes cellulaires. Tout comme le Zinc, il nous protège des inflammations et booste nos fonctions immunitaires (**Baudin, 2020**).

Le Cuivre et le Manganèse, eux aussi, sont des cofacteurs de superoxyde dismutase qui permet à notre organisme d'éliminer les radicaux libres et d'éviter leur prolifération. Ces différents oligoéléments très importants pour l'équilibre de notre santé limitent la propagation des lésions oxydatives responsables du vieillissement prématuré (**Park et Lim, 2009**).

► Les polyphénols

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Les représentants les plus nombreux (plus de 5 000 molécules isolées) et les plus connus en sont les « flavonoïdes » (Tsao, 2010 ; Luca et al., 2020).

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présente dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1 g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales, ce sont d'excellents piègeurs des ERO et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre. Ils donnent un électron aux radicaux qui deviennent stables grâce à leurs électrons appariés, et aident à prévenir les dommages cellulaires et tissulaires liés au stress oxydant. Parmi les flavonoïdes, appartenant à la famille des polyphénols, les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles naturels présents dans certains fruits et plantes. Les anthocyanes sont de puissants antioxydants ; ils possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, neuroprotectrices et cardioprotectrices (Hussain et al., 2016 ; Shen et al., 2020).

Le glutathion aussi présente un antioxydant non-enzymatique joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. C'est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH, GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer. Les autres propriétés anti-oxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C (Averill-Bates, 2023).

II-4- Le stress oxydatif et l'obésité

Un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses (Sies, 2015).

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. La multiplicité des conséquences médicales de

ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (**Hybertson et al., 2011 ; Van der Pol et al., 2019**).

Le stress oxydant sera aussi un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires, cancers, cataracte, maladies auto-immunes... (**Sies, 2015**).

Au cours d'obésité, un état de stress oxydant a été mis en évidence. Il est caractérisé par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et le niveau des systèmes de défense anti-oxydants de la cellule (**Jabri et al., 2017**). Cette attaque radicalaire a pour conséquence des dommages oxydatifs au niveau des lipides, des protéines, des acides nucléiques, pouvant notamment conduire à un dysfonctionnement endothélial et des processus inflammatoires (**Bonnefont- Rousselot, 2014**). Ainsi, plusieurs protéines impliquées dans la réponse au stress cellulaire, à la lipotoxicité, à la signalisation de l'insuline, ont subi une carbonylation, processus directement lié à l'oxydation, témoignant ainsi de la présence d'un stress oxydant (**Hybertson et al., 2011**).

Le stress oxydant peut ainsi stimuler la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. Au cours de l'obésité, l'accumulation excessive de lipides stimule le développement du tissu adipeux en activant la prolifération des pré-adipocytes, leur différenciation en adipocytes et en augmentant la taille des adipocytes. Or, il a été montré que le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène favorise la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes, en régulant positivement des activateurs transcriptionnels tels que le « CCAAT, Enhancer Binding Protein- β » (C, EBP- β) et le « Peroxisomal Proliferator Activated Receptor- γ » (PPAR- γ), intervenant dans le programme de différenciation adipocytaire (**Grasemann et Holguin, 2021**).

L'obésité est également caractérisée par une biodisponibilité insuffisante en NO suite à une atteinte de l'eNOS et de sa neutralisation en réagissant avec les ERO et principalement l'O²⁻.

De plus, l'obésité s'accompagne de l'installation d'une inflammation suite à la hausse des acides gras non estérifiés (AGNE) et de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α résultant de l'activation de la voie NF- κ B au niveau des macrophages (**Ouchi et al., 2011**).

La libération des cytokines pro-inflammatoires, suite à la stimulation de la voie NF-kB et la présence des acides gras libres dans la circulation, favorise une forte activation de l'enzyme JNK-1, caractéristique de l'obésité. Sa présence augmente l'adiposité, le taux d'AGNE et favorise le développement d'une insulino-résistance. L'augmentation des acides gras libres circulants entraîne des phénomènes de lipotoxicité au niveau musculaire et hépatique. En plus, un stress oxydant entraîne une dérégulation des cytokines pro-inflammatoires telles que le « Tumor necrosis factor α » (TNF- α), et un état d'insulinorésistance, qui peut participer à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires et du diabète associés à l'obésité (**Grasemann et Holguin, 2021**). Il a pu être démontré que le stress oxydant joue un rôle important dans l'obésité. Ainsi, des patients atteints d'un syndrome métabolique ont montré une augmentation des marqueurs plasmatiques inflammatoires comme IL-6 et CRP, corrélée à une diminution de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx). Ces données ont permis d'en déduire le rôle important du stress oxydant associé à l'inflammation et à un excès de masse grasse (**Mayer, 2019**).

III- Valorisation des grignons d'olive

La gestion et la valorisation des déchets solides ont obéi à plusieurs principes qui sont retenus dans le cadre de précaution et de responsabilité du producteur. Il s'agit en premier lieu de prévenir la production des déchets, de favoriser le réemploi et la réutilisation des objets ou des substances, de recycler les matières, de valoriser les déchets, et en dernier recours, de les éliminer surtout dans l'industrie alimentaire (**Ribeiro et al., 2020**).

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. D'autre part, ces déchets peuvent générer des impacts négatifs sur l'environnement, car ces déchets sont toxiques et peuvent contaminer les sols, les nappes phréatiques et les cours d'eau (**Ducom et al., 2019 ; Foti et al., 2022**).

Le grignon d'olive est considéré comme un sous-produit alimentaire (**Contreras et al., 2021**). Ce terme « Sous Produit Alimentaire » a été introduit par la Commission européenne pour indiquer « un gaspillage alimentaire » ça veut dire une perte de biomasse précieuse et des éléments nutritifs (**Ribeiro et al., 2020**).

Les champs de valorisation et d'utilisation des grignons d'olive sont nombreux et variés :

- L'incorporation des grignons d'olive dans l'alimentation des animaux (aliments lignocellulosiques grossiers) (**Foti et al., 2022**).
- Les grignons contiennent des pentoses qui se transforment en furfural après une hydrolyse suivie d'une déshydratation. Le furfural est un composé hétérocyclique destiné plus particulièrement à la fabrication d'huiles lubrifiantes lors du raffinage des distillats d'huiles pétrolières.
- La préparation du charbon actif à partir des grignons d'olive par procédé chimique d'activation en utilisant des agents chimiques comme H_3PO_4 et KOH (**Eliche-Quesada et Leite-Costa, 2016**).
- La neutralisation d'huile des grignons d'olive en présence d'agent neutralisant pour une réaction de saponification (**Gorassini et al., 2019**).
- Dans le domaine agricole, les grignons d'olives peuvent être employés comme fertilisant, après avoir subi une pré-décomposition ou un compostage pour faciliter sa dégradation et éliminer ses effets phytotoxiques (**Ribeiro et al., 2020**).
- Utilisation des grignons d'olive dans différents domaines thérapeutiques. On cite l'utilisation de ces résidus dans la production des produits pharmaceutiques ophtalmiques par sa richesse en l'hydroxytyrosol et l'euloropéine (**Katsinas et al., 2021**) ; dans la prévention des maladies cardiovasculaires (riche en acide oléique) (**Mateos R. et al., 2019 ; Sanchez-Quesada et al., 2020**). Aussi, l'huile des grignons exerce un effet anti-hypertenseur (**Valero-Muñoz et al., 2014**), et un effet hypolipidémiant (**Liu et al., 2011**).
- Les grignons d'olive induit une diminution de la glycémie et stimule la défense anti-oxydante tissulaire, en augmentant l'activité enzymatique endogène en particulier, de la SOD, CAT et GPX et non-enzymatique tel que l'acide urique et la vitamine C (**Cherrad et Bouderbala, 2019 ; Vergani et al., 2018**). L'activité anti-oxydante des GO diminue la peroxydation lipidique par une réduction des teneurs en TBARS et de LOOH en cas des maladies métaboliques (**Yahiaoui et al., 2019**). Cette activité anti-oxydante est due à la présence d'hydroxytyrosol et de l'euloropéine qui sont des inhibiteurs excellents de l'oxydation par piégeage des radicaux libres, dotés des propriétés hypoglycémique, antivirale, anticancéreuse, et anti-inflammatoires (**Mouzaoui et al., 2014**).
- Les grignons peuvent servir de milieu de fermentation, pour produire une biomasse probiotique (activité antimicrobienne) (**Gómez-Cruz et al., 2020**).

- L'élaboration de mélanges à matrice polymère ou l'utilisation des grignons d'olive comme biosorbants pour l'adsorption de métaux lourds ou de colorants des effluents industriels **(Ducom et al., 2019)**.

- La production du méthanol à partir de gaz de synthèse obtenu par gazéification des grignons d'olive **(Puig-Gomero et al., 2021)**.

- La conversion thermochimique des grignons d'olives et les transformer à un gaz de synthèse **(Ducom et al., 2019)**.

Malheureusement ; malgré les différentes voies de valorisations existantes, ces déchets sont, soit brûlés, soit rejetés dans l'environnement, sans traitement préalable réel.

Matériels et méthodes

Ce chapitre a pour but la valorisation des grignons d'olive, en étudiant l'effet de l'extrait méthanolique des grignons chez les rats rendu obèses.

Pour cela, les étapes suivantes ont été réalisées :

- Préparation de l'extrait brut polyphénolique par macération hydro-méthanolique.
- Préparation de la solution du gavage.
- Étude de l'effet des grignons d'olive sur les paramètres biochimique au niveau plasmatique, et sur le statut Redox au niveau érythrocytaire et tissulaire (homogénats).
- Étude histologique du foie, rein et tissu adipeux chez les rats obèses gavés au grignon d'olive.

I- Matériel Végétal

Le matériel végétal qui a fait l'objet de notre étude est le grignon d'olive récupéré d'une huilerie traditionnelle de la région Ouzidain, wilaya de Tlemcen, durant le mois de novembre 2019. Cette huilerie applique l'extraction à système discontinu. Le séchage a été fait pendant un mois à l'air libre. Le grignon a été broyé puis tamisé avant son utilisation.

I-1- Préparation de l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive

Des pesées de 50 g de poudre des grignons d'olive sont mises à une macération dans 1000 mL du mélange méthanol, eau (80:20 V,V) sous agitation pendant 48 h à l'ombre et à température ambiante. Après filtration, les filtrats sont évaporés sous pression réduite à 45 °C dans un rotavapeur de type LABOROTA 4000 (Heidolph) pour obtenir des poudres brunes qui seront conservées à -4 °C jusqu'à leur utilisation.

I-2- Préparation de la solution du gavage

Les résidus secs de l'extrait brut hydro-méthanolique des grignons d'olive obtenus après évaporation sont solubilisés dans le DMSO (5 %), l'huile de tournesol et on ajoute l'eau physiologique ; après cette solution est administrée aux rats par gavage (1 mL) avec une dose de 200 mg, kg de poids corporel.

II- Matériel Animal

Les rats Albinos de souche Wistar, mâles (âgés 4 semaines) ont été élevés à l'animalerie de l'université de Tlemcen (département de Biologie) où la température moyenne varie entre 25-30°C, avec un cycle photopériodique de 12 heures de lumière, obscurité. La litière utilisée est la sciure, renouvelée deux fois par semaine pour assurer le bon état hygiénique des animaux.

Les rats sont logés dans des cages en plastique (5 rats par cage) et ont été nourris avec un régime standard (ONAB) et l'eau potable à satiété (rats témoins).

Les rats obèses reçoivent le régime cafeteria composée d'un mélange biscuit, pâté, chocolat, fromage, chips, ONAB, pendant 8 semaines. Le régime la cafeteria riche en calories, induit une augmentation rapide de poids, il permet le développement d'obésité nutritionnelle en déclenchant une hyperphagie avec accumulation de tissu adipeux chez le rat, suite à un hyperinsulinisme (Lalanza J.F., 2021). Les rats sont marqués pour permettre une identification individuelle.

Les différents lots des rats sont répartis comme suit :

- ↳ **Lot 1** : 5 rats sans aucun traitement recevant l'eau physiologique (groupe témoin).
- ↳ **Lot 2** : 5 rats témoins recevant par gavage la solution préparée de l'extrait brut des grignons d'olive avec une dose de 200 mg, kg pendant un mois
- ↳ **Lot 3** : 5 rats témoins recevant par gavage l'huile de tournesol+DMSO (5 %) (2 mL par rat de 200 g) pendant un mois (groupe contrôle)
- ↳ **Lot 4** : 5 rats recevant un régime cafétéria pendant 8 semaines (groupe obèses).
- ↳ **Lot 5** : 5 rats obèses recevant par gavage la solution préparée de l'extrait brut des grignons d'olive avec une dose de 200 mg, kg pendant un mois.

Les gavages sont réalisés un jour sur deux afin d'éviter le stress des animaux avec un volume de 2 mL pour un rat de 200 g de poids corporel pendant un mois. Le poids corporel et la nourriture ingérée sont notés quotidiennement.

À la de l'expérimentation, les rats sont pesés puis anesthésiés au chloral à 10 % (0.3 mL par 300 g de poids corporel) après 12 heures de jeune. Le sang est prélevé par ponction dans

l'aorte abdominale. Une quantité de sang prélevée est récupérée dans des tubes EDTA, ce dernier est centrifugé à 3000 trs, min pendant 15 min ; le plasma est obtenu en vue du dosage des différents paramètres biochimiques, et le lysat pour les marqueurs de statut Redox. Les organes (foie, rein, rate, tissu adipeux, intestin et muscle) sont soigneusement prélevés, rincés avec NaCl à 9 % ensuite pesés. Les homogénats sont préparés par broyage des organes dans le tampon PBS (pH=7.4) et passage aux ultrasons.

Une partie de foie, rein et tissu adipeux a été conservé dans des tubes contenant le formol à 10 % afin d'éviter sa dessiccation pour faire l'étude histologique.

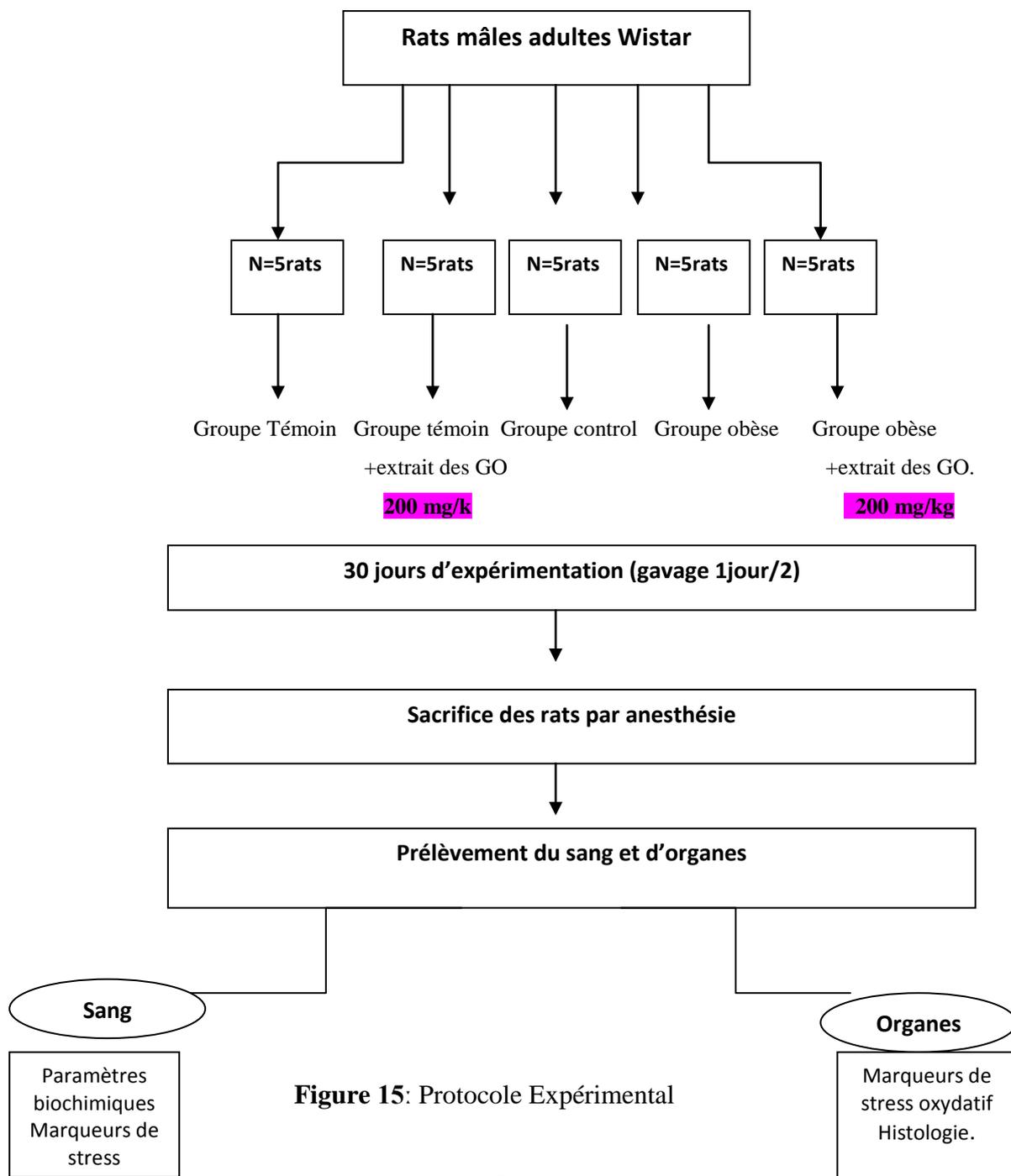


Figure 15: Protocole Expérimental

II 1- Dosage des paramètres biochimiques

Détermination des teneurs en glucose (Kit Spinreact)

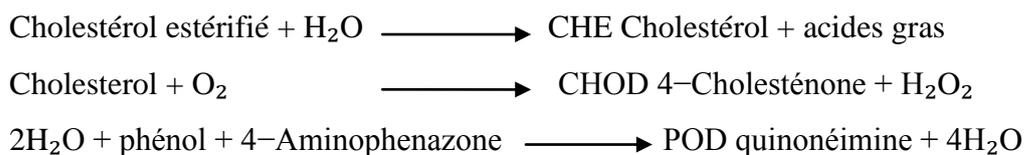
Le glucose plasmatique est déterminé par la méthode enzymatique et colorimétrique en présence du glucose oxydase (GOD). Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase et de phénol, oxyde un chromogène (le 4-amino-antipyrine) incolore en couleur rouge à structure quinonéimine. La coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en glucose présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde égale à $\lambda=505$ nm.

Détermination des teneurs en triglycérides (kit Spinreact)

Le dosage des triglycérides sériques se fait par l'action d'une lipase selon la méthode colorimétrique enzymatique. Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et en acides gras grâce à des lipases. Une suite de réactions aboutit à la formation du peroxyde d'hydrogène qui en présence de la peroxydase et d'un chromogène donne un composé coloré, la quinonéimine. La concentration en quinonéimine est proportionnelle à la concentration totale en triglycérides présents dans l'échantillon. La concentration en TG est déterminée à une longueur d'onde égale à $\lambda=500$ nm.

Détermination des teneurs en cholestérol total (kit Spinreact)

Le dosage du cholestérol total est réalisé par méthode enzymatique et colorimétrique dans le plasma des rats. Le cholestérol présent dans l'échantillon produit un composé coloré selon la réaction suivante :



La réaction consiste à libérer le cholestérol de la liaison ester par la cholestérol-estérase (CHE), et d'oxyder le cholestérol libre non estérifié par le cholestérol oxydase (CHOD).

L'indicateur est une quinonéimine formé à partir de peroxyde d'hydrogène, de la 4-aminophénazone, sous l'action catalytique de la peroxydase (POD). La concentration en quinonéimine colorée est mesurée à une longueur d'onde égale à $\lambda=505$ nm. Elle est proportionnelle à la concentration en cholestérol total dans l'échantillon.

Détermination des teneurs en HDL cholestérol (kit Spinreact)

Les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) contenus dans l'échantillon (sérum) sont précipités par addition d'acide phosphotungstique en présence d'ions magnésium. Le surnageant obtenu après centrifugation contient les lipoprotéines de haute densité (HDL) dont le cholestérol est dosé par le réactif cholestérol enzymatique. La mesure des densités optiques (DO) est effectuée au spectrophotomètre à 505 nm.

Détermination des teneurs en transaminases (TGO-TGP) : (Kit SPINREACT):

Les transaminases permettent le transfert du groupement aminé d'un acide aminé sur un acide α cétonique. L'acide aminé est alors transformé en acide cétonique correspondant et l'acide α cétonique en acide aminé. Les deux principales réactions de transamination sont catalysées par les transaminases glutamo-oxaloacétique (TGO) et glutamo-pyruvique (TGP). La détermination des activités enzymatiques des transaminases se fait au niveau du plasma et permet d'apprécier l'atteinte tissulaire et la cytolyse surtout hépatique.

L'enzyme transaminase catalyse le transfert du groupe amine de l'aspartate (pour la TGO) ou de l'alanine (pour la TGP) vers l'oxaloglutarate avec formation de glutamate et d'oxaloacétate (pour la TGO) ou du pyruvate (pour la TGP).

Les mesures sont effectuées à l'aide de réactions couplées pour permettre l'utilisation du coenzyme NADH, H^+ dont on mesure la diminution d'absorbance. Ainsi, l'oxaloacétate est réduit en malate ou le pyruvate en lactate grâce à des déshydrogénases (MDH ou LDH) couplées à NADH, H^+ . La vitesse d'oxydation du NADH est proportionnelle à l'activité enzymatique des transaminases. Elle est déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

Détermination des teneurs en urée (kit Spinreact)

L'urée plasmatique est dosée par méthode enzymatique colorimétrique, l'urée dans l'échantillon est hydrolysée par voie enzymatique en ion d'ammoniac (NH_4^+) et en dioxyde de carbone (CO_2), puis ces deux derniers réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite en présence de l'enzyme nitroprussiate pour former l'indophénol vert. L'intensité de la couleur obtenue est proportionnelle à la quantité d'urée présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 580 nm.

Détermination des teneurs en créatinine (Kit Spinreact) :

La créatinine est dosée par une méthode colorimétrique cinétique, le test de la créatinine est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium. La créatinine réagit avec le picrate alcalin en formant un complexe de couleur rouge. L'intensité de la couleur ainsi formée est mesurée à une longueur d'onde de 592 nm.

Détermination des teneurs en protéines totales (Kit Spinreact) :

Les protéines totales sont dosées par la méthode colorimétrique de Biuret sur le plasma des rats témoins et expérimentales. Les protéines donnent un complexe bleu violet intensif avec des sels de cuivre dans un milieu alcalin. L'intensité de la couleur obtenue est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon, mesurée à une longueur d'onde de 540 nm.

II-2- Détermination des paramètres de statut oxydant, antioxydant

Les dosages des paramètres de stress oxydatif sont effectués au niveau érythrocytaire et tissulaire (homogénats tissulaire des organes suivants : foie, rein, rate, intestin, muscle et tissu adipeux sont préparé à partir de 100 mg de tissu broyé dans 3 ml de tampon Phosphate-EDTA ; pH=7.2).

Dosage de la vitamine C

La vitamine C plasmatique est dosée selon la méthode de **Jagota et Dani (1982)** utilisant le réactif de Folin et une gamme d'acide ascorbique. Après précipitation des protéines plasmatiques par l'acide trichloroacétique (10 %) et centrifugation, le réactif de Folin est ajouté au surnageant. La vitamine C présente dans surnageant réduit le réactif de Folin donnant une coloration jaune. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en vitamine C à une longueur d'onde de 769 nm présente dans l'échantillon. La concentration est déterminée à partir de courbe étalon obtenu grâce à une solution d'acide ascorbique.

Détermination du malondialdéhyde

Le malondialdéhyde (MDA) plasmatique et érythrocytaire est mesuré selon la méthode de **Draper et Hadley (1996)**. Il représente le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Après traitement par l'acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA. L'absorption intense de ce chromogène se fait à une longueur d'onde de 532 nm. La

concentration du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 532 nm).

Détermination des protéines carbonylées

Les protéines carbonylées du plasma et du lysat érythrocytaire (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine, selon **Levine et al., (1990)**. La réaction aboutit à la formation de la dinitrophénylhydrazone colorée. Les concentrations des groupements carbonylés sont déterminées par lectures à 350 et 375 nm et calculées selon un coefficient d'extinction ($\epsilon = 21,5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Détermination de l'activité enzymatique antioxydante de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6)

Le taux de l'activité de la catalase est mesuré au niveau du plasma et du lysat érythrocytaire. Cette activité enzymatique est mesurée par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène selon la méthode d'Aebi (1974). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H_2O_2 en fonction du temps. Le milieu réactionnel contient la source enzymatique (plasma ou lysat), le H_2O_2 , et le tampon phosphate (50 mmol, L, pH 7,0). Après incubation de 5 min, le réactif Titanium oxyde sulfate (TiOSO_4) est ajouté. La lecture se fait à 420 nm. Les concentrations du H_2O_2 restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de H_2O_2 à des concentrations de 0,5 à 2 mmol, L.

Le calcul d'une unité d'activité enzymatique est : $A = \log A_1 - \log A_2$.

- A_1 est la concentration de H_2O_2 de départ.
- A_2 est la concentration de H_2O_2 après incubation. (au bout de 5 min)

L'activité spécifique est exprimée en U, min, mL de lysat érythrocytaire.

Dosage du glutathion réduit

Le dosage du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire est réalisé par la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) (**Ellman, 1959**). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB). Le thionitrobenzoïque (TNB) à pH (8-9) alcalin présente c avec un coefficient d'extinction égal à $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$.

Dosage de l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)

L'activité de cette enzyme est mesurée selon la méthode de Elstner et al.,(1985). Le principe est basé sur la capacité de l'inhibition de l'auto-oxydation du phénol par le superoxyde dismutase (SOD).L'absorbance est lue à 270 nm.

Cette activité est exprimée en mM/min/mL avec $\epsilon=1310 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$

II-3- Étude Histologique

Cette étude a été réalisée sur le foie, les reins et tissu adipeux des rats des différents lots expérimentaux pour savoir l'effet de l'extrait brut des grignons d'olive au niveau tissulaire.

Prélèvement

Le prélèvement doit se faire délicatement afin de ne pas dégrader l'organisation cellulaire et tissulaire. Une fois obtenu, ce prélèvement doit immédiatement être immergé dans un grand volume de liquide fixateur.

Fixation

La fixation a pour but la conservation des structures dans un état aussi proche que possible de leur état vivant, avec arrêt de toute activité mitotique et enzymatique. Ainsi que le durcissement de la pièce anatomique. Les liquides fixateurs les plus utilisés en pratique courante sont le formol ou le liquide de Bouin (mélange d'eau 5 %, acide acétique 10 %, formol 25 % et d'acide picrique 75 %). La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements.

Déshydratation

Le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire. Ceci par passage du prélèvement dans des 3 bains successifs d'éthanol absolue, ensuite 3 bains d'acétone et à la fin 2 bains de toluène (30 min pour chacun). Les échantillons sont immergés dans le toluène, car la paraffine utilisée est de nature hydrophobe, non-miscible à l'alcool, mais miscible dans le toluène.

Inclusion: enrobage

Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines (d'une épaisseur de 2 à 5 μm) et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine (résine blanche opaque). Le prélèvement baigne dans deux bains de paraffine fondue (chauffée à 70 °C pendant 2 h dans une étuve) et qui infiltre alors toutes les cellules.

Mise en bloc

Après 2 heures d'inclusion, la paraffine liquide est coulée dans un petit moule en métal.

« Barres de Leuckart ». Après refroidissement (dans un congélateur pendant toute une nuit), on se trouve alors en présence d'un bloc de paraffine dur, à l'intérieur duquel la pièce

prélevée est rigide en présence de paraffine solide dans l'espace intracellulaire de chaque cellule composant le tissu.

Confection des coupes histologiques

Le passage du bloc de paraffine dans un microtome permet de réaliser des sections de 2 à 5 μm disposées en séries régulières sous forme d'un ruban. Les segments de ruban de paraffine sont étalés sur des lames de verre contenant un liquide d'étalement tel que l'eau albumineuse. Ces lames sont placées sur une plaque chauffante (37 °C), ensuite placées dans une étuve à 100 °C, pendant 15 min.

Déparaffinage et hydratation

Le déparaffinage consiste, comme son nom l'indique, à éliminer la paraffine, c'est-à-dire le milieu d'inclusion. Les lames sont placées dans 2 bains successifs de xylène puis dans 2 bains successifs d'éthanol (5 min pour chacun). Le rinçage se fait à l'eau de robinet.

Coloration

Le but de la coloration est d'accentuer les contrastes afin de différencier les différents constituants tissulaires (noyau, membrane plasmique et cytoplasme) en utilisant une coloration hématoxyline, éosine :

Hématoxyline met en évidence les structures nucléaires et les protéines basophiles par un colorant bleu, et l'éosine est un colorant acide permet de colorer le cytoplasme avec une coloration rouge et le collagène en rose.

Déshydratation

Après la coloration, les coupes sont trempées dans 2 bains successifs d'éthanol suivi de 2 bains de xylène (5 min pour chacun).

Montage et observation microscopique

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique 'Baume de Canada' dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre. On obtient, ainsi, une préparation histologique prête à être observée au microscope optique.

III-Analyse statistique

Les variables étudiées ont été exprimées par moyenne \pm écart-type. Les comparaisons des moyennes entre les différents groupes in vivo traités et non traités sont effectuées par le test ANOVA à un facteur en utilisant le logiciel Minitab (18) complété par un test de Tutkey. Une p-value inférieur à 0,05 a été considérée significative et les différences significatives entre les lots sont marqués par les lettres différentes (a, b, c...).

Résultats et interprétations

I-Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction de l'extrait brut hydro-méthanolique des grignons d'olive est de 9 % (tableau 10).

Tableau 11 : Le rendement d'extrait brut hydro-méthanolique

Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
Hydro-méthanolique de GO	10	9

II- Effet de l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive sur l'obésité

II-1- Effet de l'extrait des GO sur le poids corporel des rats

Le suivi de la variation du poids corporel des animaux au cours de l'expérience a démontré une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du poids surtout chez les rats obèses recevant un régime cafétéria et les groupes obèses traités avec l'extrait des GO comparant avec les autres groupes (figure16).

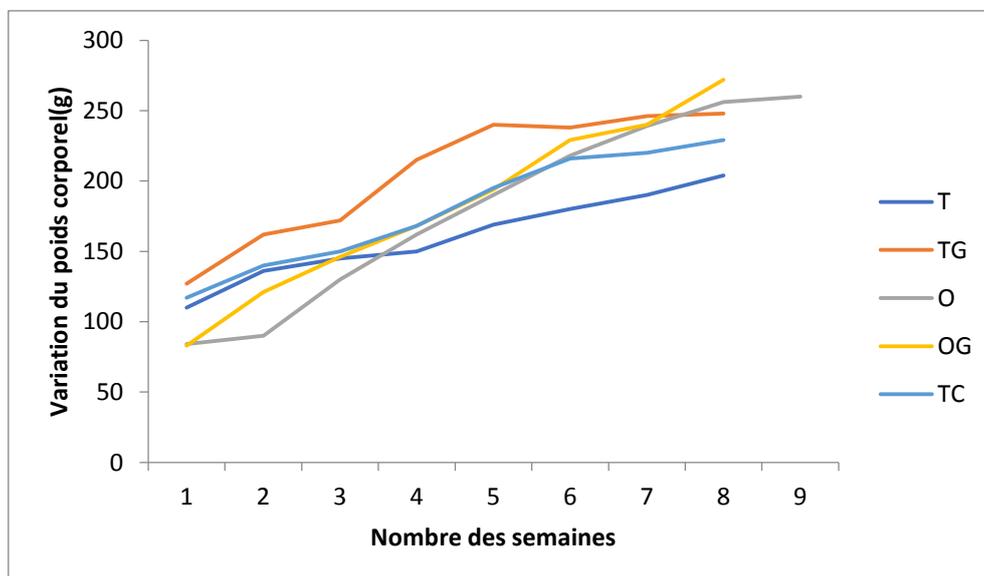


Figure 16 : Évaluation du PC des rats durant 8 semaines d'expérimentation

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. T : rats témoins ; TG : rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg, Kg ; O : rats obèses ; OG : rats obèses traités par l'EMB à 200 mg, Kg ; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des

variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. Afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs sont significativement différentes à $P < 0,05$.

II-2- Effet de l'extrait des GO sur les paramètres biochimiques

II-2-1- Teneurs plasmatiques en glucose chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 17)

Les teneurs plasmatiques en glucose chez les rats varient significativement entre les différents lots comparés aux témoins. On remarque une augmentation de taux du glucose chez les obèses et une diminution significative de la glycémie chez les groupes traités par l'extrait des GO comparées aux valeurs obtenues chez leurs rats témoins.

II-2-2- Teneurs plasmatiques en protéines totales chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 17)

Les teneurs en protéines totales augmentent significativement chez les rats obèses comparés aux rats témoins. Par ailleurs, ces teneurs ne varient pas chez les autres lots.

II-2-3- Teneurs plasmatiques en cholestérol, en triglycérides et en HDLc chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 18)

Les teneurs en cholestérol des rats obèses sont significativement augmentés comparés aux témoins ; par contre, l'administration de l'extrait hydro-méthanolique des GO chez les rats obèses entraîne une chute significative des teneurs de cholestérol.

Les teneurs plasmatiques en triglycérides varient significativement entre les différents groupes. Les rats témoins et les rats obèses traités par la dose 200 mg, kg d'extrait des GO montrent une diminution significative de triglycérides par rapport aux leurs rats témoins.

Cependant, la dose 200 mg, kg d'extrait de GO entraîne une augmentation significative des teneurs en HDLc chez les rats obèses traités comparés aux rats obèses non traités.

II-2-4- Teneurs plasmatiques en transaminases chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 19)

Les teneurs plasmatiques en TGO et TGP montrent une augmentation significative chez les obèses par rapport aux témoins ; par contre, les teneurs plasmatiques en TGP et TGO chez les

rats obèses recevant l'extrait de GO présentent une diminution très significative comparée aux rats obèses non traités.

II-2-5- Teneurs plasmatiques en urée et en créatinine chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 20)

Les teneurs plasmatiques en urée et en créatinine chez les rats obèses sont significativement augmentées par rapport à leurs rats témoins. Cependant, la dose 200 mg, kg de l'extrait des GO entraîne une diminution significative des teneurs en urée et en créatinine chez les rats obèses traités.

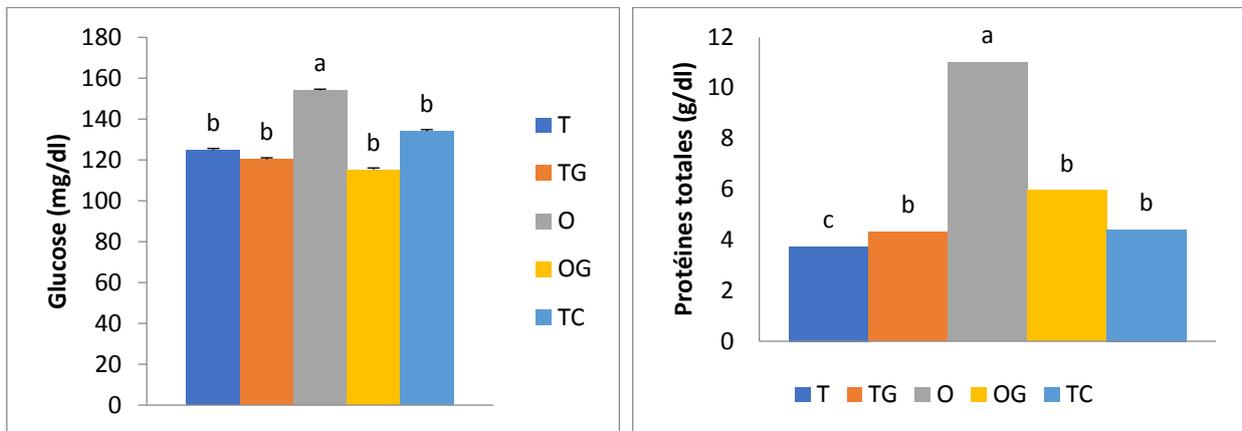


Figure17 : Teneur plasmatique en glucose et en protéines totales

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. T : rats témoins ; TG : rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg, Kg; O : rats obèses ; OG : rats obèses traités par l'EMB à 200 mg, Kg ; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à $P < 0,05$.

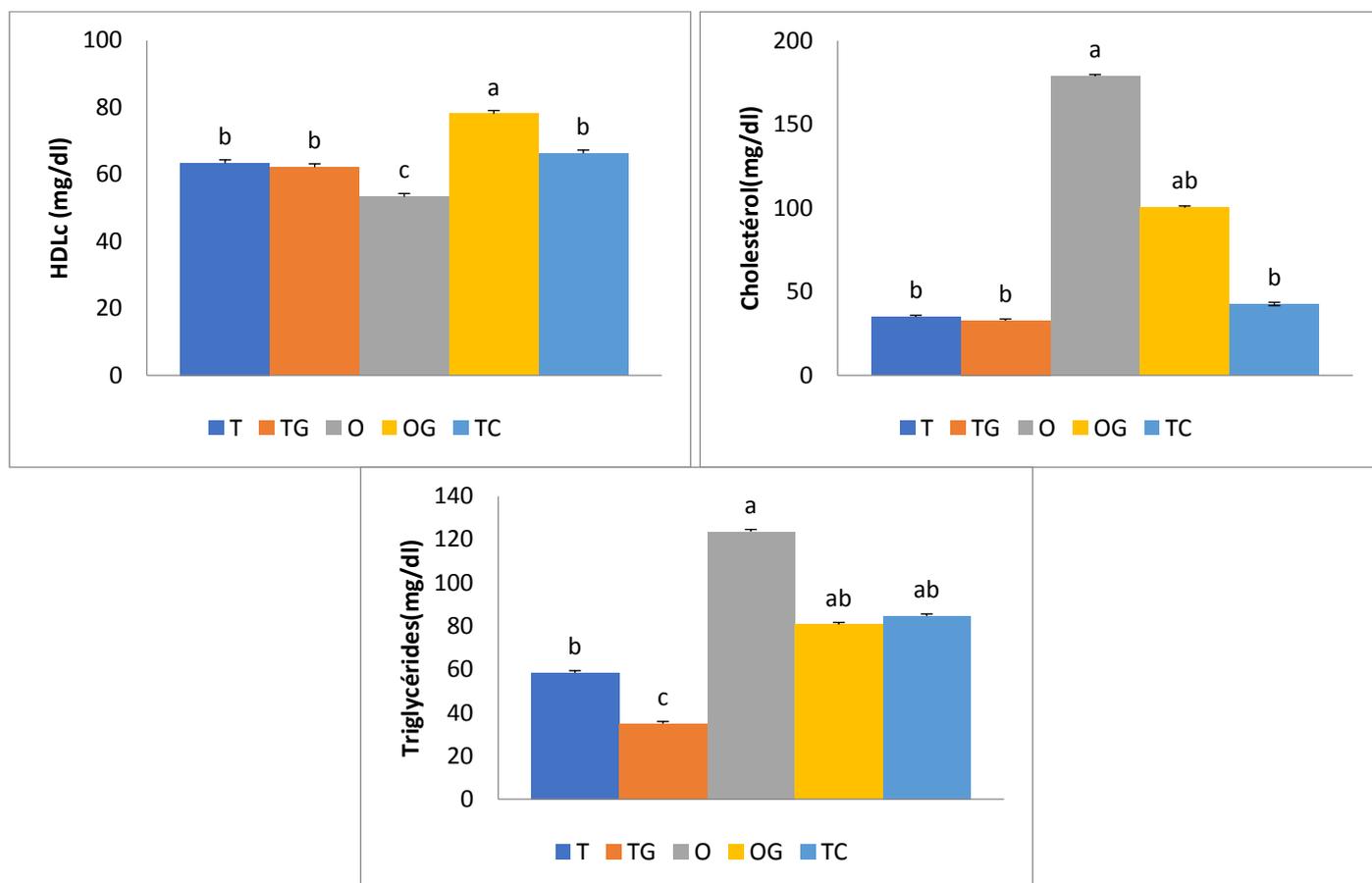


Figure18: Teneurs plasmatique en paramètres lipidiques

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. T : rats témoins ; TG : rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg, Kg ; O : rats obèses ; OG : rats obèses traités par l'EMB à 200 mg, Kg ; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à $P < 0,05$.

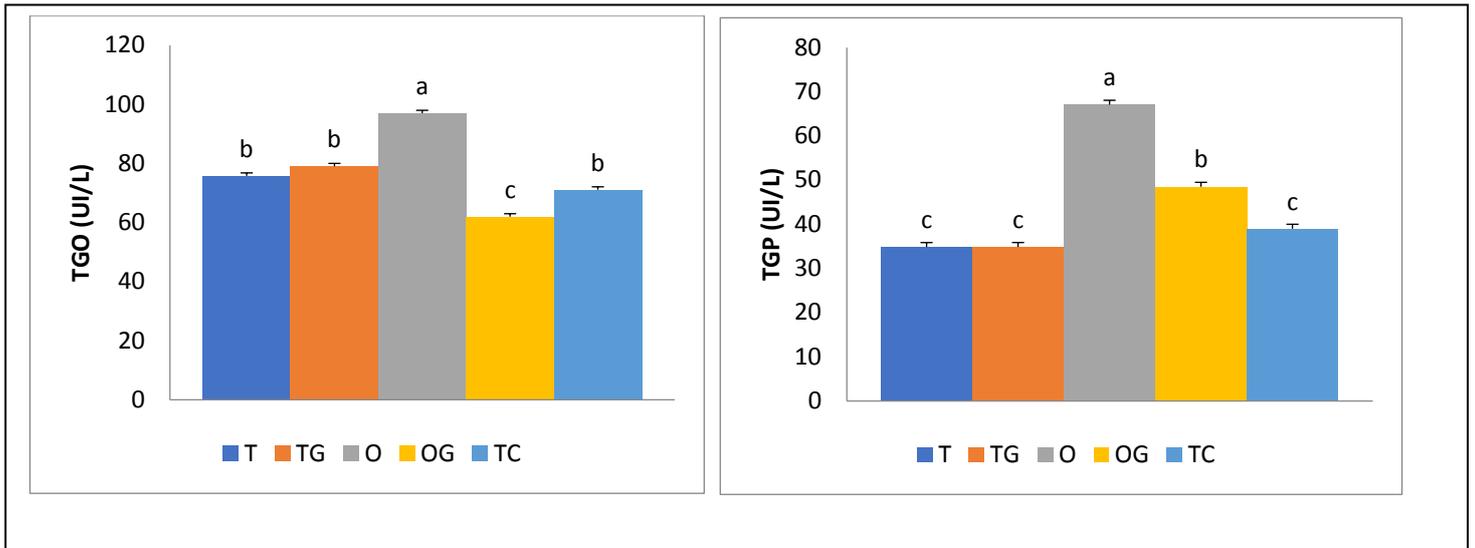


Figure19: Teneurs plasmatiques en transaminases

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. T : rats témoins ; TG: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg, Kg ; O : rats obèses ; OG : rats obèses traités par l'EMB à 200 mg, Kg ; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à $P < 0,05$.

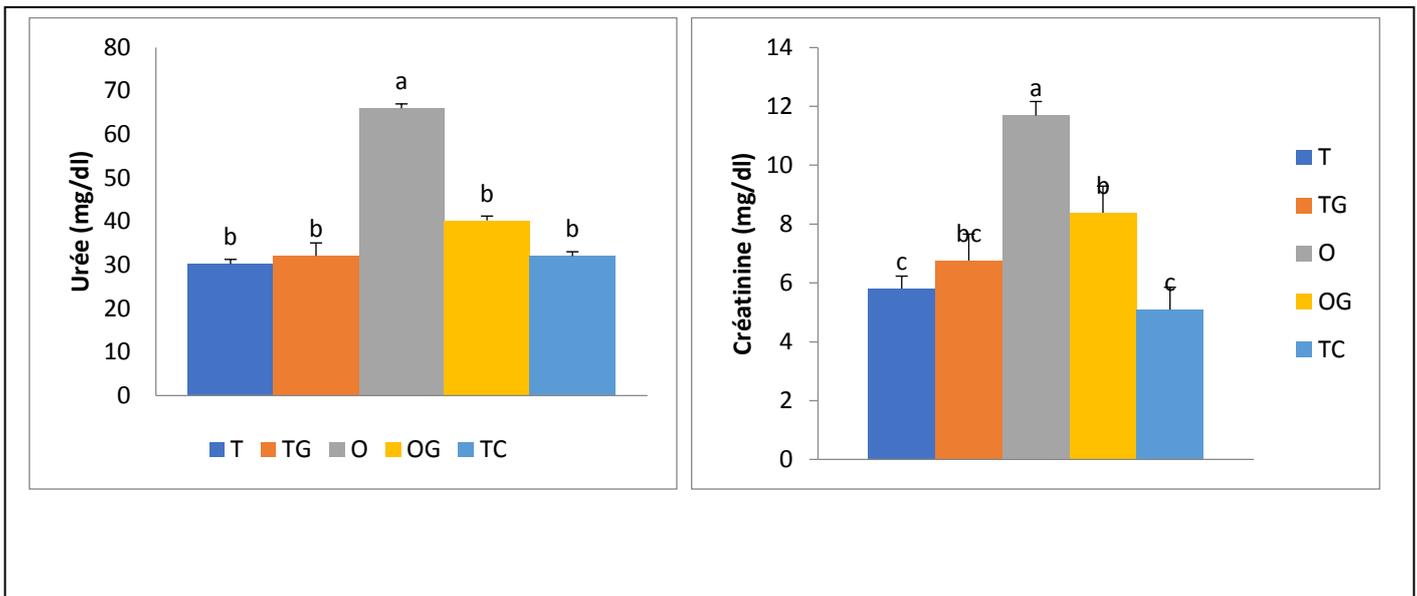


Figure 20 : Teneur plasmatique en Urée et Créatinine

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. T : rats témoins ; TG : rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg, Kg ; O : rats obèses ; OG: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg, Kg ; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à $P < 0,05$.

II-3- Effet de l'extrait des GO sur les paramètres de stress oxydatif (tableau 10)

II-3-1- Teneur plasmatique en vitamine C

Les teneurs plasmatiques en vitamine C ne présentent aucune variation chez les groupes traités par rapport aux témoins.

II-3-2- Détermination de l'activité érythrocytaire de la superoxyde dismutase, de la Catalase et de Glutathion réduit chez les rats témoins et les rats expérimentaux

L'activité érythrocytaire de la catalase, la SOD et GSH montrent une diminution significative chez les rats obèses comparés aux rats témoins ; par ailleurs la dose 200 mg, kg de l'extrait hydro-méthanolique des GO entraîne une augmentation de ces enzymes chez les rats obèses traités.

II-3-3- Teneurs érythrocytaires en malondialdéhyde (MDA) et en protéines carbonylés chez les rats témoins et les rats expérimentaux

Les teneurs érythrocytaires en protéines carbonylés ne présentent aucune variation significative entre les différents lots.

Chez les rats obèses non traités, on remarque une augmentation significative du MDA ; par contre la dose 200 mg, kg de l'extrait des GO entraîne une diminution du MDA chez les groupes des rats traités par rapport à leurs rats témoins.

Tableau 12 : Paramètres pro-oxydant/ antioxydant au niveau érythrocytaire chez les rats

Paramètre/Lot	Témoin	Témoins + GO	Obèse	Obèse+GO	TC
Vit c (µg/mL) (plasmatique)	33.34 ± 0.91	34.02 ± 0.20	32.36 ± 0.28	33.92 ± 1.74	29.35 ± 1.02
MDA (µmol/L)	0.70 ± 0.09	0.69 ± 0.07	1.05 ± 0.05	0.97 ± 0.12	0.66 ± 0.04
SOD (mM/min/mL)	377.37 ± 0.71	398.82 ± 1.27	345.64 ± 0.56	345.46 ± 3.71	378.32 ± 4.49
GSH (µmol/L)	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.90	0.14 ± 0.09	0.18 ± 0.17	0.19 ± 1.02
Protéines carbonylés (µmol/L)	0.30 ± 0.07	0.29 ± 0.08	0.38 ± 0.09	0.32 ± 0.17	0.28 ± 0.03
Catalase (U/min/ mL)	253.2 ± 3.25	253.02 ± 1.12	232.20 ± 1.25	238.23 ± 2.23	254.02 ± 0.20

II-4- Effet de l'extrait des GO sur les organes

II-4-1- Variation des poids des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux

L'administration orale d'extrait n'a entraîné aucune modification significative du poids relatif des organes (foie, reins, rate, tissu adipeux, intestin, muscle) chez les rats traités par rapport aux rats témoins (tableau 11). Par contre, on note une augmentation significative du foie, reins, muscle, intestin et tissu adipeux chez les obèses. Cette augmentation est diminuée après l'administration de l'extrait des GO.

Tableau 13 : Poids relatif des organes chez les rats

Lot/poids d'organe (g)	Foie	Rein	Rate	Intestin	Muscle	TA
T	4.5 ± 0.07	1.07 ± 0.10	0.46 ± 0.03	4.14 ± 0.33	3.45 ± 0.02	3.68 ± 0.11
TG	4.58 ± 0.28	0.95 ± 0.18	0.48 ± 0.25	4.05 ± 0.64	3.54 ± 0.4	3.51 ± 0.14
O	6.55 ± 0.14	2.55 ± 0.01	0.55 ± 0.03	6.23 ± 0.84	4.54 ± 0.33	7.42 ± 0.14
OG	5.12 ± 0.23	1.23 ± 0.05	0.52 ± 0.06	4.12 ± 0.35	4.05 ± 0.54	5.45 ± 0.03
TC	4.39 ± 0.12	1.06 ± 0.03	0.50 ± 0.33	4.35 ± 1.2	3.66 ± 0.48	3.57 ± 0.21

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. T : rats témoins ; TG : rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg, Kg ; O : rats obèses ; OG : rats obèses traités par l'EMB à 200 mg, Kg ; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à $P < 0,05$.

II-4-2- Teneurs en cholestérol des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 21)

Les teneurs en cholestérol au niveau des organes montrent une augmentation significative chez les rats obèses surtout au niveau de foie, reins, intestin, tissu adipeux et muscle. Par contre la dose 200 mg, kg d'extrait des GO entraîne une diminution significative du cholestérol au niveau de ses organes chez les rats obèses traités.

II-4-3- Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 22)

Les teneurs en triglycérides au niveau des organes montrent une augmentation significative chez les rats obèses au niveau de foie, reins, intestin, rate, tissu adipeux et muscle. Par contre la dose 200 mg, kg d'extrait des GO entraîne une diminution significative du cholestérol au niveau de ses organes chez les rats obèses traités.

II-4-4- Teneurs en protéines totales (mg,g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 23)

Les teneurs en protéines totales au niveau des organes sont significativement variables entre les différents lots. Ces teneurs sont augmentés chez les rats obèses au niveau du foie, reins, tissu adipeux et muscle ; par ailleurs l'extrait hydro-méthanolique des GO entraîne une définition au niveau du foie, muscle et tissu adipeux, mais aucune modification au niveau rénal.

II-4-5- Teneurs en malondialdéhyde (MDA) au niveau des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 24)

Les teneurs en malondialdéhyde chez les rats obèses sont significativement augmentées au niveau de tous les organes étudiés comparés aux témoins. La dose 200 mg, kg n'entraîne aucune variation de MDA chez les rats obèses traités au niveau de ses organes.

II-4-6- Teneurs en Glutathion (GSH) au niveau des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 25)

Les teneurs en GSH montrent une diminution significative au niveau de tous les organes chez les rats obèses. L'administration d'extrait des GO entraîne une augmentation de ces teneurs chez les rats normaux traités surtout au niveau hépatique et intestinal. Le glutathion est augmenté aussi chez les rats obèses traités avec l'extrait des GO au niveau musculaire ; par contre aucune modification a été notée au niveau des autres organes des rats obèses.

II-4-7- Teneurs en Catalase au niveau des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 26)

L'activité de la catalase au niveau des reins, intestin, rate et muscle n'a subi aucun changement chez les groupes traités par rapport aux valeurs obtenus chez les témoins.

Au niveau hépatique et adipocytaire, on note une diminution de l'activité de catalase chez les obèses traités et non traités.

II-4-8- Teneurs en superoxyde dismutase (SOD) au niveau des organes chez les rats témoins et les rats expérimentaux (figure 27)

L'activité de la SOD n'a subi aucune modification significative chez les rats expérimentaux comparés aux témoins au niveau du foie, rate, muscle, et tissu adipeux. Par ailleurs, cette activité est diminuée au niveau rénal et intestinal chez les obèses ; cet effet est accentué après l'administration de l'extrait des GO chez les rats obèses traités.

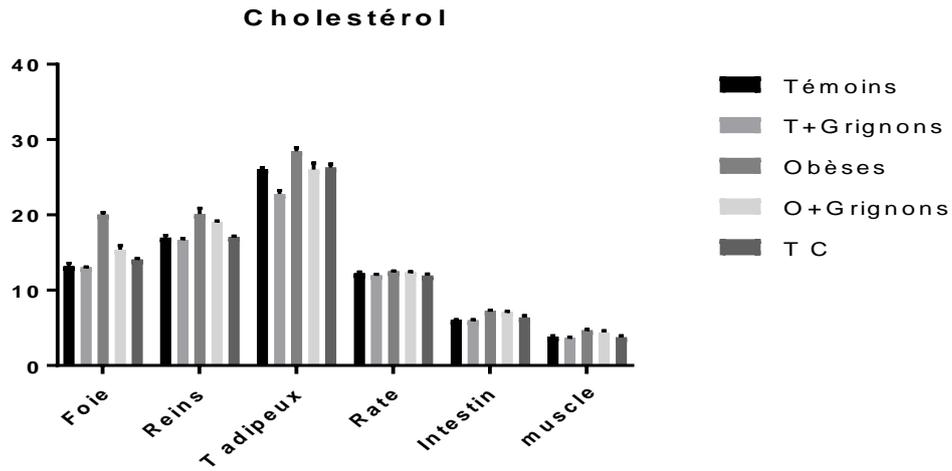


Figure 21 : Teneur de cholestérol (mg/g) des différents organes chez les rats

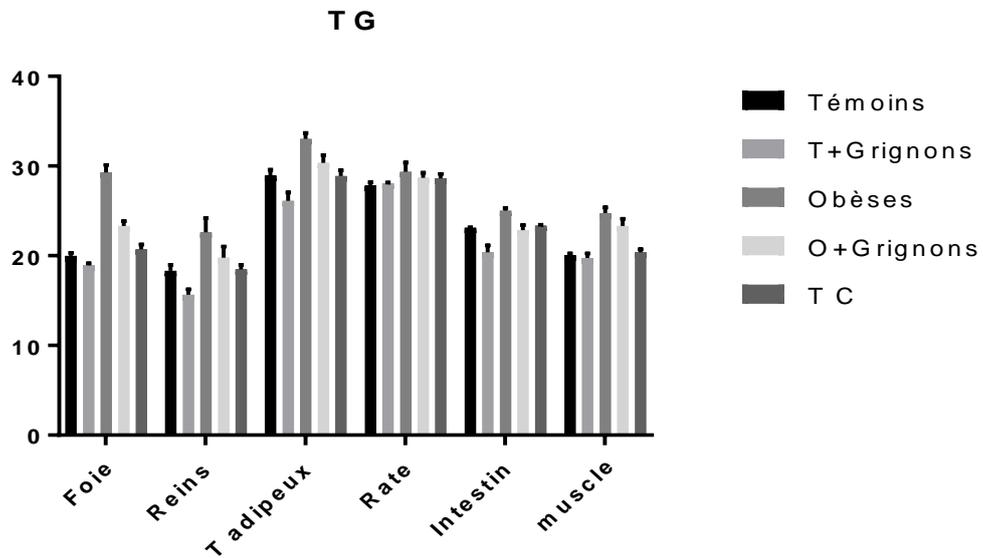


Figure 22: Teneur de triglycérides (mg/g) des différents organes chez les rats

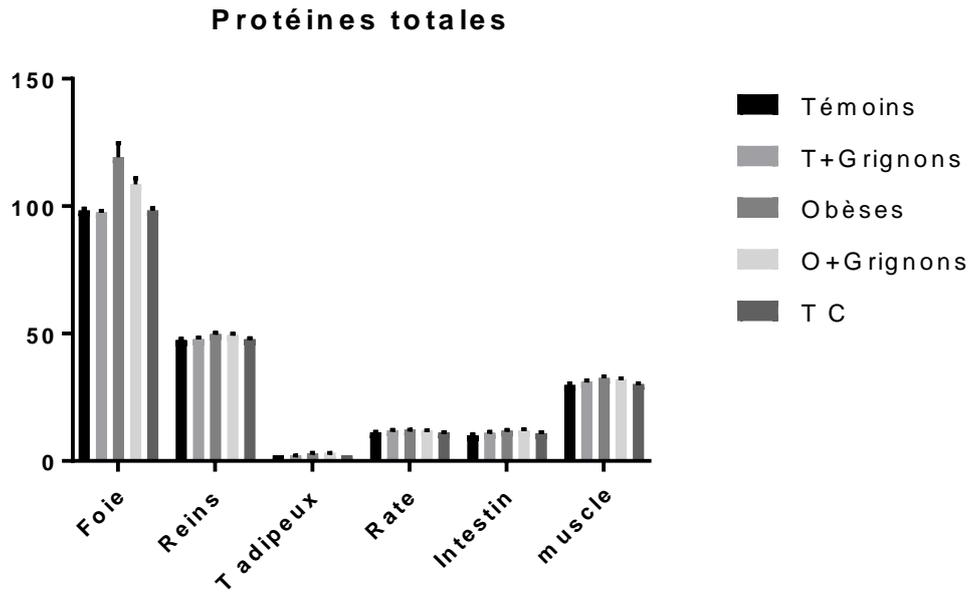


Figure 23 : Teneur en protéines totales (mg/g) des différents organes chez les rats

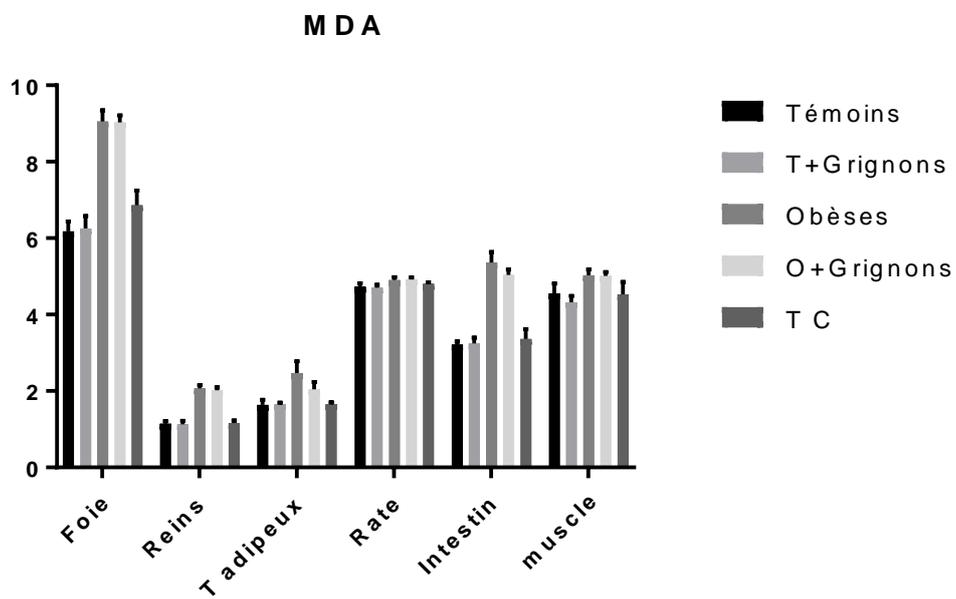


Figure 24 : Teneur en MDA (µmol/g) au niveau des organes chez les rats

Protéines carbonylées

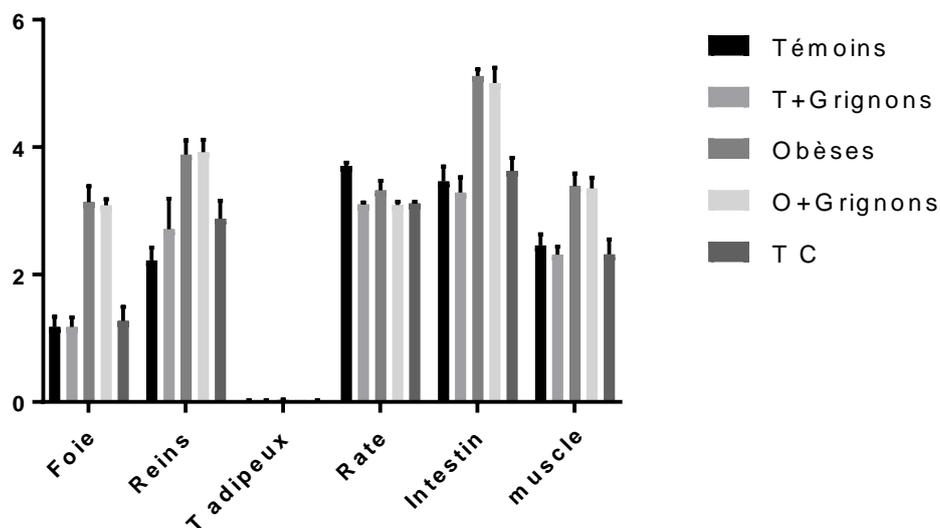


Figure 25 : Teneur en protéines carbonylés (µmol/g) au niveau des organes chez les rats

GSH

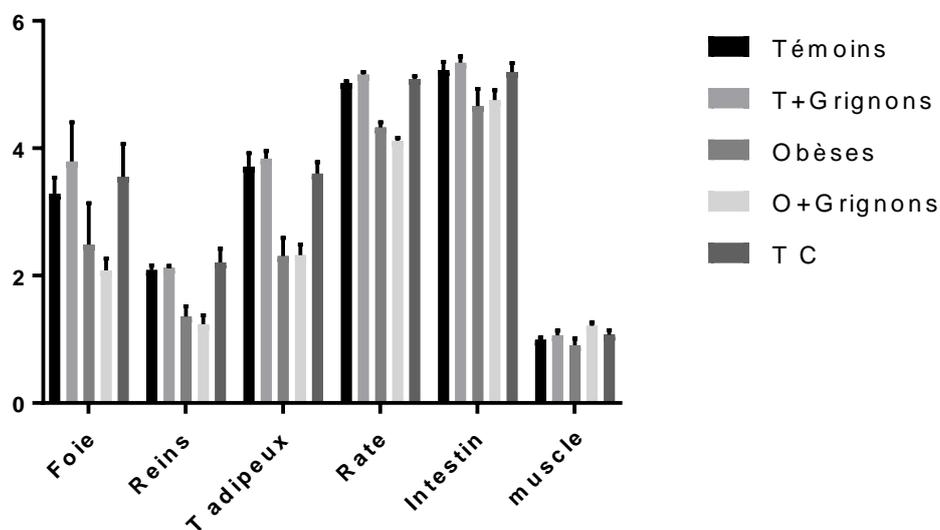


Figure 26 : Teneur en GSH (µmol/g) au niveau des organes

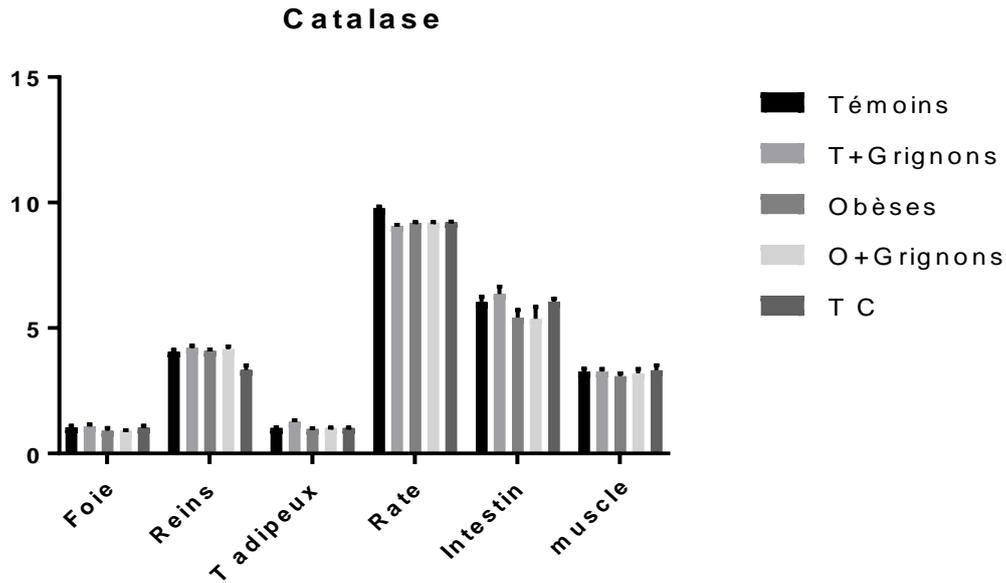


Figure 27 : Activité de catalase (U/min/g) au niveau des organes

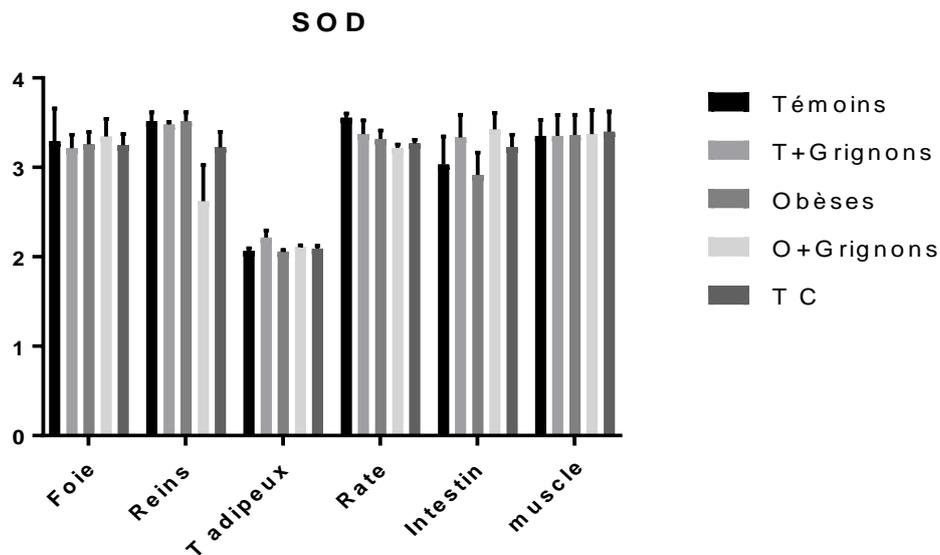


Figure 28: Activité de la SOD (U/g) au niveau des organes

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. T : rats témoins ; TG : rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg,Kg ; O : rats obèses ; OG : rats obèses traités par l'EMB à 200 mg, Kg ; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. Afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs sont significativement différentes à $P < 0,05$.

II-4- Effet d'extrait hydro-méthanolique des GO au niveau tissulaire

II-4-1- Influence d'extrait des GO sur l'histologie du foie (figure 29)

Les coupes histologiques du foie des rats des groupes témoins, contrôle, et les rats normaux traités ont montré une architecture typique des hépatocytes, de forme polygonale avec des sinusoides normale et une veine centrale. Un noyau de forme normale avec une distribution cellulaire typique. En outre, l'histologie du foie des rats obèses nous montre une turgescence des sinusoides marquées au tour de la veine centro-lobulaire, associé à une désorganisation de l'architecture trabéculaire des hépatocytes. Par ailleurs, on note des améliorations au niveau de l'histoarchitecture du foie chez les rats traités par l'extrait hydro-méthanolique des GO.

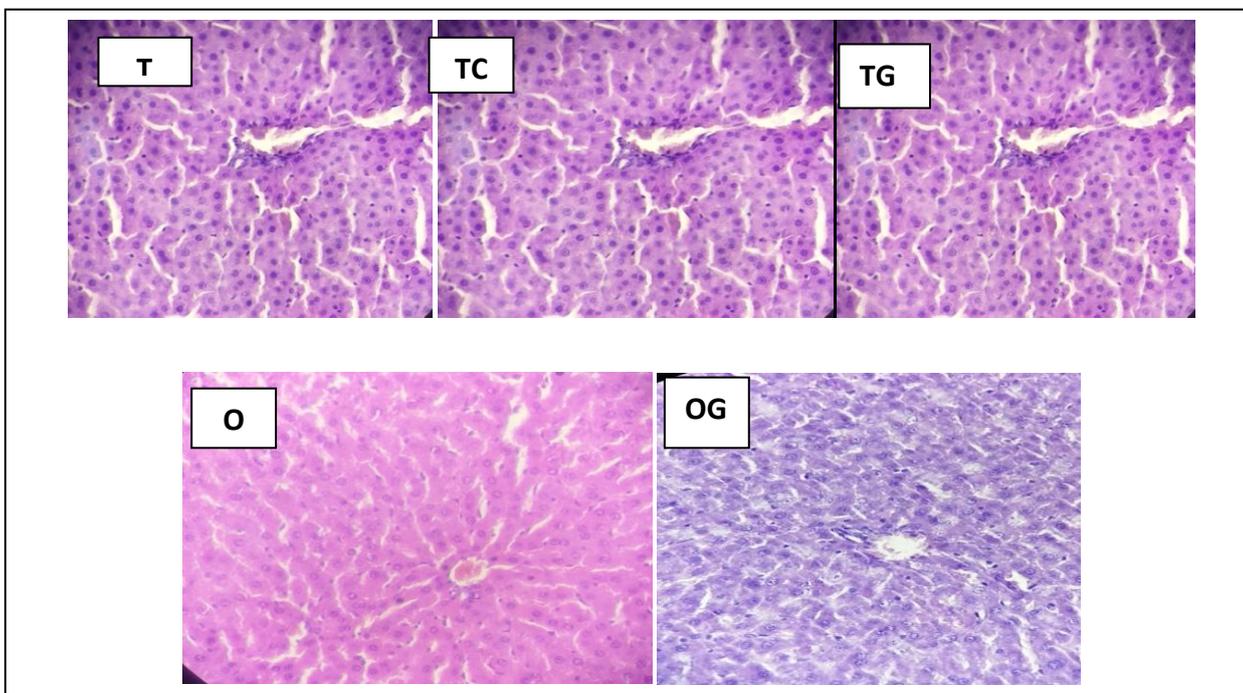


Figure 29: Coupes histologiques du foie des rats expérimentaux (×40)

T : groupe témoins ; TC : groupe contrôle ; TG : groupes témoins traités par 200 mg/kg d'extrait des GO ; O : rats obèses ; OG : rats obèses traités par 200 mg/kg d'extrait des GO.

II-4-2- Influence d'extrait des GO sur l'histologie des reins (figure 30)

Les résultats des coupes histologiques des reins des rats des groupes contrôle et traités, ont montré majoritairement une architecture normale avec des glomérules et des tubules de taille normale comparés aux cellules rénales des rats témoins. Par contre, chez les obèses, on remarque une inflammation au niveau médullaire plus une infiltration des macrophages dans les glomérules. Cette inflammation est diminuée chez les rats obèses recevant 200 mg, kg d'extrait des GO.

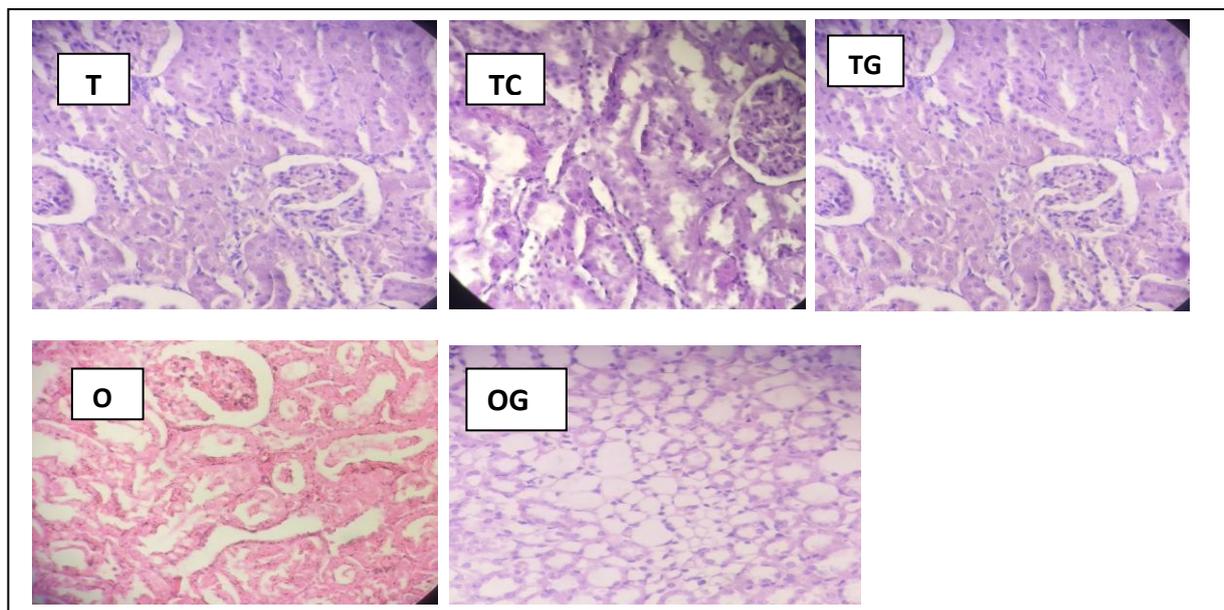


Figure 30 : Coupes histologiques du rein des rats expérimentaux (×40)

T : groupe témoins ; TC : groupe contrôle ; TG : groupes témoins traités par 200 mg/kg d'extrait des GO ; O : rats obèses ; OG : rats obèses traités par 200 mg/kg d'extrait des GO.

II-4-3- Influence d'extrait des GO sur l'histologie du tissu adipeux (figure 31)

Les résultats microscopiques des coupes histologiques du tissu adipeux montrent des cellules adipeuses normales avec une forme polygonal et un noyau excentrique refoulé par la vacuole lipidique à l'extrémité de la cellule on remarque aussi les travées de tissu conjonctif dense délimitent les lobules avec une vascularisation modérée chez tous les groupes à part les rats obèses, on remarque une inflammation chronique avec une infiltration lymphocytaire, des cellules éclatées, déchiquetées, avec la présence de fibrose et de vascularisation donc

l'architecture du tissu n'est pas respectée. Après l'administration de l'extrait des GO, on remarque une réduction de l'inflammation avec une légère infiltration des lymphocytes.

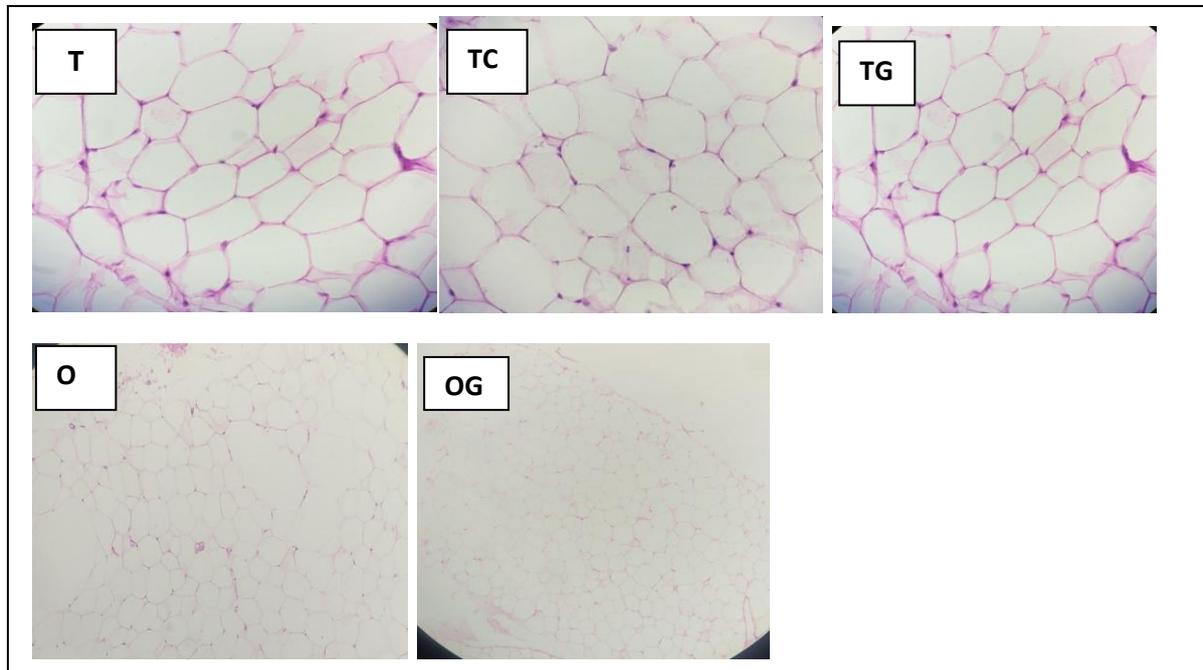


Figure 31 : Coupes histologiques du TA des rats expérimentaux ($\times 40$)

T : groupe témoins ; TC : groupe contrôle ; TG : groupes témoins traités par 200 mg/kg d'extrait des GO ; O : rats obèses ; OG : rats obèses traités par 200 mg/kg d'extrait des GO.

Discussion

Selon l'Organisation mondiale de la santé, le surpoids et l'obésité se définissent comme une « accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Ces tendances à l'augmentation sont constatées dans les pays en développement comme dans les pays développés, faisant ainsi de l'obésité une menace de santé publique d'envergure internationale (**Lauby-Secretan et al., 2019**).

D'un point de vue physiologique, il n'existe que deux moyens de lutter contre l'obésité et le surpoids : diminuer les apports et, ou augmenter la dépense. En-dehors des méthodes chirurgicales comme la diminution du volume de l'estomac, il existe quelques médicaments diminuant l'absorption des lipides (inhibiteur des lipases) ou des glucides (inhibiteurs des alpha-glucosidases) qui ont un effet réel bien que modeste et qui s'accompagnent d'effets secondaires (stéatorrhées, déficit d'absorption des vitamines liposolubles, fermentation caecale) (**Lin et Li, 2021**). Actuellement, les polyphénols d'origine végétale attirent l'intérêt de nombreuses interventions diététiques et plusieurs études expérimentales *in vivo* et *in vitro* montrent l'effet bénéfique des polyphénols dans les complications et les pathologies liées à l'obésité (**Liu et al., 2020**). Dans notre étude, nous avons étudié l'effet de l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive sur des rats obèses recevant un régime cafétéria entraînant en effet le développement d'une obésité chez les rats, due à une augmentation de la prise calorique pendant 8 semaines. Les résultats montrent un gain du poids corporel même après l'administration d'extrait des GO chez les rats traités. Ces résultats ne sont pas en accord avec celles de **Mikami et al. (2021)** qui ont montrés que l'acide oléanolique trouvé dans les feuilles d'olivier entraîne une diminution de la masse grasse et le poids corporel chez des souris nourries avec un régime hyper-gras. **Bouderballa S. et al. (2014)** ont montré aussi une diminution des poids corporel chez des rats recevant un régime riche en cholestérol et supplémenté avec des GO pendant 28 jours.

Sur le plan biochimique, la diminution du glucose chez les groupes obèses et non-obèses traités avec l'extrait des GO ; cette diminution est due à la présence d'acide oléanolique qui joue un rôle important dans l'homéostasie du glucose dans le sang (**Acar-Tek et Ağagündüz, 2020**). Ces résultats sont en accord avec **Cherad H. et Bouderbala S. (2019)** qui ont conclu que chez les rats rendus diabétiques, la consommation d'un régime supplémenté des GO induit la diminution de la glycémie. Nos résultats montrent une augmentation significative des protéines totales plasmatiques ; cette augmentation est la cause de l'augmentation de la bêta-oxydation des acides gras absorbés qui favorise l'abondance de l'acétyl-coA responsable de

l'acétylation des protéines au cours d'obésité avec une activation de la transcription des gènes (**Romanick et al., 2018**).

L'obésité est associée à une élévation des triglycérides, cholestérol, parfois du LDL-cholestérol, et une diminution du HDL-cholestérol. Cette dyslipidémie est retrouvée dans 30-60 % des cas de surcharge pondérale ou d'obésité selon les études, expliquant en partie l'augmentation du risque de complications métaboliques dans l'obésité, combinée à un état inflammatoire (**Ilunga et al., 2018**). Nos résultats montrent une augmentation significative de cholestérol et triglycérides avec une diminution de HDL-c. Cette augmentation est corrigée après l'administration de l'extrait hydro-méthanolique des GO. Plusieurs auteurs ont montré cet effet bénéfique d'extrait des GO sur les paramètres lipidique (**Tsantila et al., 2007 ; Liu et al., 2011 ; Sanchez-Quesada et al., 2013 ; Bouderballa et al., 2014 ; Bouderballa et al., 2015 ; Conterno et al., 2019 ; Claro-Cala et al., 2020**). L'augmentation des transaminases chez les rats obèses est un signe des troubles hépatiques causés par l'accumulation des acides gras libre au niveau hypatoctaire (**Brissot et Buffet, 2023**). Après l'administration de 200 mg, kg de l'extrait des GO, on a noté une diminution de la TGO et TGP ; ces résultats sont confirmés par **Liu et al. (2011)** après l'administration d'extrait des GO chez des rats recevant un régime hyperlipidique. **Ma et al. (2023)** aussi montrent aussi l'effet de l'huile d'olive et huile des GO dans la diminution des transaminases.

Les changements liés à l'obésité au niveau rénal se caractérisent par un débit de filtration glomérulaire élevé avec une augmentation de taux de la créatinine et l'urée dans le plasma (**Suneja et Kumar, 2014**) ; les résultats trouvés montrent l'augmentation de ces paramètres chez les rats obèses. Par contre la dose 200 mg, kg d'extrait entraîne une diminution de l'urée et la créatinine chez les groupes traités. Cette activité est due à la présence des composés bioactives dans les grignons d'olive tels que le resvératrol (**Tsoupras et al., 2007**). Ces résultats sont similaires de celles d'**Abu Bakar Sajak et al. (2017)** qui trouvent une diminution de la créatinine et l'urée chez des rats mâle obèses et diabétiques après l'administration d'extrait éthanolique des épinards aquatiques.

Les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle important dans le développement de l'obésité et ses complications métaboliques en favorisant l'adipogenèse et lipogenèse, et stimulent la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures (**Pérez-Torres et al., 2021**).

Les résultats montrent une augmentation de taux de MDA et protéines carbonylés avec une diminution des teneurs en vitamine C plasmatique, Catalase et GSH chez les rats obèses

recevant un régime cafétéria. Cette augmentation des paramètres pro-oxydants est le résultat d'une repense inflammatoire au niveau des adipocytes plus une accumulation des molécules oxydatives avec une suppression de système de régulation des anti-oxydants chez les obèses (Li et al., 2023). Ce déséquilibre est corrigé après l'administration de 200 mg, kg d'extrait hydro-méthanolique des GO grâce à la richesse des GO en polyphénols surtout le resvératrol avec ses propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires, en modulant l'expression des gènes sensibles au statut Redox dans le sang et améliore l'activité mitochondrial ; plus une complémentation avec le resvératrol augmente le taux l'activité de la catalase, GSH et la SOD (Pérez-Torres et al., 2021 ; Mallamaci et al., 2021). En plus les dosages de l'activité anti-oxydante DPPH et le pouvoir réducteur montre que notre extrait brut du GO possède une activité anti-oxydante importante avec un pouvoir réducteur puissant qui reflète son potentiel anti-oxydant.

Plusieurs études ont confirmé ces résultats en étudiant l'effet de l'extrait polyphénolique des GO *in vitro* et *in vivo* sur les paramètres du stress oxydatif (Palmieri et al., 2012 ; Vergani et al., 2018 ; Panic et al., 2019 ; Cherrad et al., 2019 ; Samba Garba et al., 2022).

L'obésité s'accompagne également d'une augmentation du volume sanguin et de la taille des principaux organes qui peut être à l'origine d'une augmentation du volume du compartiment central. Chez les obèses, l'augmentation des volumes de distribution à l'équilibre d'un composé donné dépend de l'affinité relative du composé pour les différents tissus. La distribution des agents hydrosolubles, dont les volumes de distribution sont souvent moins importants que ceux des agents liposolubles (Yu et al., 2018). Rospond et al. (2022) ont montré que le régime riche en gras et en sucre entraîne l'augmentation du poids relatif des organes (foie, rate, reins et pancréas).

Nos résultats présentent une élévation du poids des organes chez les rats obèses. En outre l'administration de 200 mg, kg d'extrait hydro-méthanolique des GO entraîne une diminution du poids de foie, rein, intestin, muscle et tissu adipeux chez les obèses traités. Cette réduction du poids des organes est due aux CP présentés dans notre extrait qui diminuent l'expression de l'ARNm responsable de la synthèse des acides gras et réduit le dépôt des graisses au niveau des organes (Da Silva et al., 2018). Tsai et al. (2022) ont trouvé une réduction du poids de foie et tissu adipeux chez des rats obèses traités par l'extrait éthanolique des algues. Kumur et al. (2021) aussi, ils ont trouvés une diminution de poids du foie, muscle, tissu adipeux et reins chez les obèses traités par l'extrait méthanolique de *piper sarmentosum*.

L'obésité est actuellement la première cause de maladie hépatique dans les pays occidentaux. Les lésions hépatiques observées au cours de l'obésité s'étendent de la stéatose isolée, réversible et bénigne à l'inflammation hépatique ou stéatohépatite, puis à la fibrose, la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (**Cassard-Doulier et Perlemuter, 2011**). L'étude histologique du foie des rats obèses montre une turgescence des sinusoides marquées au tour de la veine centro-lobulaire, associé à une désorganisation de l'architecture trabéculaire des hépatocytes, c'est dû à l'installation de l'obésité (**Cassard-Doulier et Perlemuter, 2011**).

Après un mois de gavage, on note une amélioration dans la structure des hépatocytes avec des sinusoides normales ; les composés bioactifs présentés dans les grignons d'olive ont un effet hépato-protecteur grâce à la présence des triterpènes et le resvératrol ceux qui est confirmés par **Contreras et al. (2022)** et **Papadaki et Tsimidou (2022)**.

Au niveau du foie, les dosages montrent une augmentation des paramètres lipidiques, car l'obésité conduit à la formation des gouttelettes lipidiques au niveau des cellules hépatiques alors une augmentation du cholestérol et TG au niveau du foie (**Lee et al., 2020**). Aussi, la dyslipidémie au cours d'obésité est conditionnée par une augmentation de la production des VLDL qui favorise une élévation des triglycérides et cholestérol circulants due à l'afflux important des acides gras vers le foie (**Berberich et Hegele, 2022**). Cette augmentation des paramètres lipidiques est diminuée après l'administration orale de 200 mg, kg d'extrait des GO. En plus, on remarque une augmentation des paramètres de statut antioxydant (catalase, SOD et GSH) au niveau du foie. **Cherrad et Bouderballa (2019)** ont confirmé ces résultats après l'administration de 7.5 % des GO à des rats mâles rendus diabétiques par injection à la streptozotocine.

La dyslipidémie est souvent associée à un développement des dépôts lipidiques glomérulaires et la formation des cellules spumeuses plus une protéinurie au niveau rénal au cours d'obésité (**Kovesdy et al., 2017**). L'examen microscopique des reins des rats obèses montre une inflammation au niveau médullaire avec une infiltration des macrophages. Les dosages biochimiques et les paramètres du stress oxydatif confirment ces altérations au niveau rénal. Ces lésions rénales sont dues à des mécanismes hémodynamiques tels que l'hyperactivité du système nerveux sympathique, l'augmentation de la rétention du sodium et l'hyper-filtration glomérulaire (**Mirabelli et al., 2020**). Après l'administration de la dose 200 mg, kg d'extrait des GO, on remarque une diminution de l'inflammation, les cellules tubulaires rénales étaient presque normales. L'organisation tubulaire et la basophilie cytoplasmique étaient également à peu près les mêmes que dans le groupe témoin, avec une lumière clairement visible dans la

plupart des tubules corticaux. Ces résultats sont dus aux flavonoïdes trouvés dans notre extrait phénolique qu'ils ont une activité anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion des cytokines et des chimiokines. En plus au niveau des reins, les flavonoïdes diminuent le taux de MDA et augmentent les teneurs de GSH et SOD plus l'activité du catalase alors une activité anti-oxydante importante (Cao et al., 2022).

La dyslipidémie de l'obésité est conditionnée par un état pro-inflammatoire favorisé par les macrophages du tissu adipeux. La production des VLDL est augmentée conditionnant l'élévation des triglycérides circulants (Berberich et Hegele, 2022). L'étude histologique montre une inflammation chronique avec une infiltration des macrophages. Des études montrent que le tissu adipeux blanc des sujets obèses est la cible d'une infiltration macrophagique et que cette infiltration est liée à l'index de masse corporelle (IMC) et à l'hypertrophie adipocytaire. Des ressemblances dans les profils d'expression génique entre macrophages et adipocytes ont aussi été rapportées. Les adipocytes peuvent exercer des propriétés macrophagiques dans un environnement inflammatoire, témoignant ainsi de la flexibilité de leur phénotype. En plus le tissu adipeux exprime également de nombreux facteurs pro et anti-inflammatoires et contribue vraisemblablement à l'augmentation de leurs taux circulants chez l'obèse et produit des cytokines inflammatoires (TNF α , TGF β , interféron γ , IL1, IL6, IL10 et IL8), des facteurs du complément, des chimiokines (MIP1 α , MCP1) et diverses autres biomolécules, comme le PAI-1 (Poitou C et Clément K, 2007 ; Faucher et Poitou, 2016). L'extrait hydro-méthanolique des GO entraîne une diminution des macrophages et montre un effet anti-inflammatoire. Cet effet bénéfique est dû à l'acide oléanolique qui réduit les marqueurs de différenciation des adipocytes et les triterpènes en régulant l'adipogenèse et la lipolyse (Claro-Cala et al., 2020). En outre, on remarque une diminution de cholestérol et triglycérides chez les rats obèses traités avec une augmentation de GSH. Cette diminution des paramètres lipidiques est la cause de la diminution des gouttelettes lipidiques formées au cours d'obésité, ainsi l'augmentation de GSH sont dues à les effets anti-oxydantes et anti-inflammatoires de l'acide anionique et maslinique trouvés dans l'huile des grignons d'olive (Sanchez-Quesada et al., 2013). Aussi, les flavonoïdes ont la capacité d'empêcher la peroxydation lipidique au niveau du tissu adipeux (Pérez-Torres et al., 2021). Claro-Cala et al. (2020) ont confirmé ces résultats, après l'administration d'huile des GO chez des souris obèses pendant 10 semaines.

La rate est le plus grand organe lymphoïde du corps, qui joue un rôle important dans la fonction immunitaire via l'élimination des érythrocytes endommagés. En cas d'obésité,

l'expression des gènes spléniques de cytokines pro-inflammatoire telles que TNF α et IL-6 sont diminués en favorisant l'augmentation du stress oxydatif et l'apoptose des lymphocytes B au niveau de la rate (**Gotoh et al., 2017**). Nos données montrent une augmentation des paramètres de stress oxydatif (MDA et protéines carbonylés) et les paramètres lipidiques avec une diminution des enzymes antioxydants chez les rats obèses comparés aux témoins. La dose 200 mg, kg d'extrait des GO entraîne une faible amélioration de ces paramètres dans la rate. Une étude a été faite sur le stress oxydatif au niveau de la rate chez les moutons recevant l'huile des GO a montré une augmentation des enzymes antioxydants (GSH et SOD) après 72 jours (**Kerasioti et al., 2017**).

Chez les rongeurs rendus obèses par un régime hyperlipidique, un changement du microbiote est associé à une altération de la perméabilité intestinale, augmentant le passage d'antigènes alimentaires ou bactériens et contribuant à une inflammation chronique de bas grade et une insulino-résistance (**Genser et al., 2016**). Les résultats montrent une augmentation de cholestérol et TG chez les rats obèses. Les études montrent chez le rat, un régime hyper gras cause la formation des acides biliaires dans le gros intestin avec des perturbations des paramètres lipidiques avec une génération des espèces réactives de l'oxygène (**Weiss et Hennet, 2017**). Après l'administration d'extrait hydro-méthanolique des GO, on remarque une diminution des paramètres lipidiques chez les groupes traités. Les polyphénols contribuent à faciliter la digestion au niveau intestinal en stimulant la production de la bile qui permet de digérer les graisses et de diminuer le taux de cholestérol et TG (**Ben Salem et al., 2015**). Au cours d'obésité, la muqueuse intestinale est endommagée, les bactéries intestinales sont transférées vers le système porte et les cellules hépatiques de Kupffer sont activées en libérant une série des facteurs inflammatoires telles que les cytokines plus une surproduction des ROS d'où la perturbation de barrière intestinale (**Yang et al., 2019 ; Zhuang et al., 2019**). Ceux qui sont confirmés chez les rats obèses. Après l'administration d'extrait phénolique des GO, on note une diminution de MDA et protéines carbonylés chez les groupes traités avec une augmentation de GSH ; c'est dû à l'effet des polyphénols trouvés dans notre extrait. Une étude faite sur le rôle de resvératrol (polyphénols) *in vitro* par une induction d'un stress oxydatif sur des cellules intestinales montre une augmentation de la viabilité cellulaire avec une élimination des radicaux libres et des propriétés anti-oxydantes. Ce polyphénol, présenté dans notre extrait, est absorbé et métabolisé principalement dans l'intestin d'où son effet bénéfique (**Zhuang et al., 2019**). **Elmaksoud et al. (2021)** montrent aussi *in vitro* l'effet d'hydroxytyrosol, un composé phénolique important dans l'olive, dans le traitement de

l'ulcère colique ; ces résultats suggèrent l'effet anti-inflammatoire, anti-apoptotique et antioxydant avec une réduction significative de MDA et l'élévation de GSH, SOD et l'activité du catalase.

Le muscle est un organe majeur dans le maintien de l'équilibre métabolique chez l'homme en raison de sa capacité à oxyder les acides gras et du fait de sa participation à la locomotion.

En outre, le muscle du sujet obèse est caractérisé par des modifications de la typologie musculaire en faveur d'une augmentation des fibres glycolytiques de type 2 et d'une réduction des fibres de type oxydatif (**Boirie et al., 2016**). Il est, par ailleurs, important de noter que l'augmentation de la masse maigre ne signifie pas toujours une augmentation significative de la masse musculaire, car il existe au cours de l'obésité une augmentation principalement de la masse maigre non-musculaire liée à la masse viscérale accrue (foie, cœur, rein, intestin). Cette augmentation de la masse maigre non-musculaire n'est pas associée à une augmentation de la masse maigre musculaire qui peut dans ce contexte se trouver relativement réduite face à un accroissement plus ou moins fort du tissu adipeux (**De Saint-Pol et al., 2014**). L'étude présente montre une élévation de cholestérol, TG et les protéines totales chez les rats obèses.

En cas d'obésité, le rapport muscle, grasse est essentiel pour prévenir les maladies métaboliques liées à l'obésité et généralement, on note une augmentation des paramètres lipidiques musculaires (**Yu et al., 2022**). En outre, chez les obèses, une altération des effets de l'insuline sur des tissus cible cause inhibe la dégradation des protéines par le muscle squelettique et atteint les voies métaboliques des lipides (**Barazzoni et al., 2018**). Notre extrait montre aussi une élévation des paramètres pro-oxydants chez les rats obèses non traités par rapport aux témoins plus une diminution de l'activité du catalase, SOD et GSH. Une régulation cellulaire négative en cas d'obésité peut conduire une altération mitochondriale du muscle donc une production excessive des ROS avec une insuffisance de défense anti-oxydante (**Banse et al., 2015**). Le stress oxydatif provoque l'apoptose des cellules musculaires et la dégradation des fibres musculaires (**Ou et al., 2022**). Après un mois d'administration d'extrait hydro-méthanolique des GO, on note une diminution de cholestérol et TG. Une étude similaire sur l'effet de l'extrait de fleur Chrysanthème d'automne sur des rats obèses montre une diminution des paramètres lipidiques et une amélioration de l'activité mitochondriale au niveau musculaire (**Lee et al., 2021**). La réduction de MDA et protéines carbonylés et l'augmentation des enzymes anti-oxydantes chez les obèses traités sont dus aux propriétés anti-oxydantes des polyphénols présentés dans notre extrait en particulier

l'hydroxytyrosol qui peut neutraliser les radicaux libres (Petrella et al., 2021). Rossi M. et al, 2017 montrent l'effet des polyphénols présentés dans l'huile d'olive *in vitro* et *in vivo*, en favorisant la protection des cellules musculaires contre le stress oxydatif. Une autre étude *in vivo* sur le stress oxydatif au niveau musculaire réalisée sur l'extrait de thé vert présente une réduction de MDA et protéines carbonylés et une augmentation de GSH chez les rats (Da Silva W et al., 2018).

Conclusion

Actuellement, les GO sont partiellement au totalement perdus pour beaucoup de pays, alors leur possibilité de l'emploi son nombreux. D'autre part, la valorisation de sous-produit de l'oléiculture permet de résoudre une grande partie des problèmes posés les effluents de l'oléiculture qu'ont un pouvoir polluant très élevé.

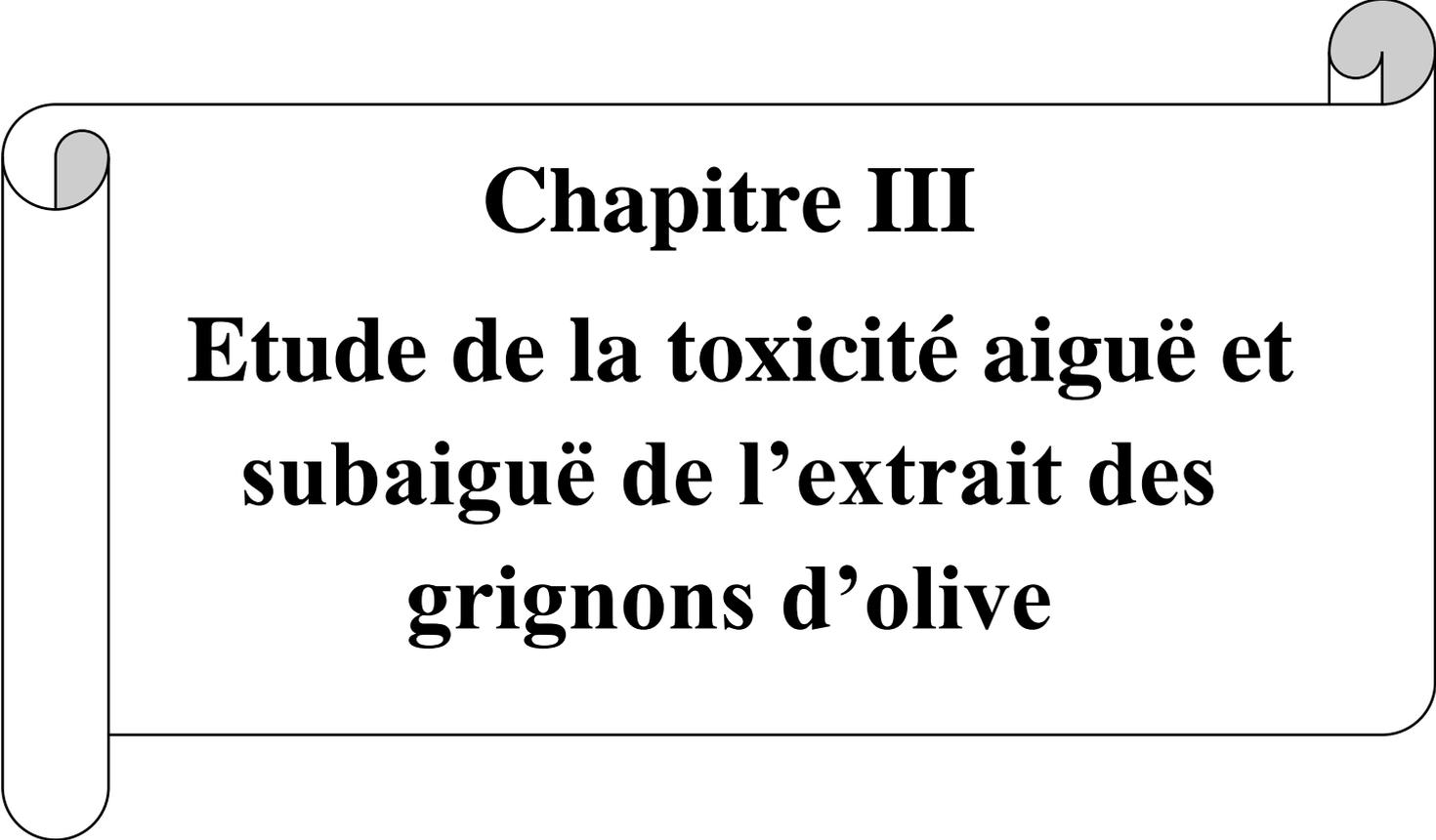
L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'effet métabolique et l'activité anti-oxydante de l'extrait phénolique brut sur l'obésité en utilisant des rats Wistar. Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydro-méthanolique des GO à la dose 200 mg, kg présente des effets importants sur le plan biochimique, érythrocytaires, et même au niveau tissulaire.

Plusieurs études ont souligné l'effet bénéfique des polyphénols trouvés dans les GO. Nos résultats montrent des améliorations positives sur les paramètres biochimiques, la réduction du développement de l'obésité et corrigent la balance redox chez les rats obèses traités.

L'extrait des GO a des effets thérapeutiques au cours d'obésité. Son intégration dans le traitement des complications d'obésité peut participer à améliorer le profil métabolique et à réduire l'incidence de l'obésité et ses complications à long terme.

Cette étude et ces résultats nous poussent à travailler au futur sur les points suivants :

- Purifier et d'identifier les principes actifs responsables de ces activités biologiques par des techniques plus performantes telles que HPLC, GC-MS et RMN.
- Faire des études *in vivo* en focalisant sur la molécule purifiée pour savoir son effet.

A decorative scroll graphic with a black outline and grey shading at the corners, framing the text.

Chapitre III

**Etude de la toxicité aiguë et
subaiguë de l'extrait des
grignons d'olive**

Généralité

I- Notion de Toxicologie

La toxicologie est depuis longtemps reconnue comme étant la science des poisons. Elle étudie les effets nocifs des agents physiques, chimiques ou de toute autre nature sur les organismes vivants. Elle fait appel à une multitude de connaissances scientifiques et s'intéresse à plusieurs secteurs de l'activité humaine : l'agriculture, l'alimentation, l'industrie pharmaceutique, l'environnement, les milieux de travail, etc. (**Demortain, 2013**). Elle s'étend de la recherche fondamentale sur le mécanisme d'action des agents toxiques, à la mise au point et à l'interprétation des tests normalisés permettant de caractériser les propriétés toxiques de ces agents (**Wu et al., 2016**).

Dans les sociétés modernes, la toxicologie est devenue un élément important pour assurer la santé tant dans le domaine environnemental que professionnel. C'est pourquoi de nombreuses organisations gouvernementales et non-gouvernementales font appel à son fonds de connaissances pour évaluer les risques en milieu professionnel ou dans l'environnement en général et proposer une réglementation. Partie intégrante des stratégies de prévention, la toxicologie est d'une valeur inestimable, puisqu'elle est la source d'informations sur les risques potentiels en l'absence d'expositions humaines pertinentes. Il faut aussi rappeler que l'industrie emploie beaucoup les méthodes toxicologiques puisqu'elle y puise des renseignements utiles à la formulation de nouveaux produits ou à la conception de nouvelles molécules (**Hoffmann et al., 2017 ; Hoffmann et al., 2018**).

II-1- Toxicité

La toxicité englobe l'ensemble des effets néfastes d'un toxique sur un organisme vivant. Autrement dit, il s'agit de la capacité inhérente à une substance chimique de produire des effets nocifs chez un organisme vivant et qui en font une substance dangereuse (**Kim et Kang, 2021**). C'est un caractère des substances chimiques qui, au contact ou après pénétration dans un organisme, ont la propriété de causer un dysfonctionnement à l'échelle moléculaire, cellulaire ou organique (**Gordon et al., 2014**).

L'effet néfaste est lié à la dose, à la voie d'absorption, au type et à la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion. L'apparition et l'intensité des effets toxiques, de même que le site-cible affecté au niveau de l'organisme peuvent varier selon la nature de l'exposition (**Kim et Kang, 2021**).

La nature d'une exposition dépend du compartiment environnemental où se retrouve la substance (eau, sol, air), de la forme physique des substances (gaz, liquides, particules), de leurs propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, liposolubilité) et de la durée du contact (court, prolongé). Les voies d'expositions, quant à elles, diffèrent selon que les expositions sont intentionnelles ou accidentelles (p.ex., exposition professionnelle versus prise de médicaments). Un contact avec des substances toxiques peut se faire de diverses façons ; par des aliments, par l'air inhalé, par manipulation de liquides (eau, solvants), par contact avec une autre personne, par injection... (Kumar et al., 2012 ; Thakur et al., 2021).

II-2- Les relations « dose-effet » et « dose-réponse »

Un principe important en toxicologie veut que toutes les substances chimiques soient toxiques, car il existe toujours une dose pouvant causer un effet nocif. Selon Paracelse, « C'est la dose qui détermine si une chose est un poison ». Toutes les substances chimiques sont toxiques, il existe une corrélation entre la dose et l'effet engendré par cette substance, plus la dose est élevée plus l'effet est nocif. Une augmentation de la dose entraîne une augmentation de l'intensité et de la diversité des effets toxiques, mais aussi le pourcentage d'individus affectés dans un lot exposé à cette dose, c'est la relation dose-effet ou exposition-effet (Guo et al., 2022).

La notion dose-effet est basique dans le cadre de l'estimation du degré d'une exposition 'sans danger' pour une substance chimique. Cette notion est indispensable pour expliquer les variations de l'effet d'une substance chimique que ce soit son intensité ou le pourcentage des individus qui répondent à un degré particulier de cet effet (Vincent et al., 2019).

Lorsque la réponse choisie pour étudier la relation dose-effet est « la létalité », on fait souvent appel aux doses létales (DL). Lorsque la réponse choisie est un effet nocif sérieux autre que la mortalité, on fait appel aux doses toxiques (DT). La DL50 est la dose létale qui provoque la mortalité de 50 % des sujets soumis au même test (Thomas et al., 2004 ; Calabrese, 2008).

La relation entre une dose et son effet est représentée par une grandeur numérique appelée Valeur Toxicologique de Référence (VTR). Établies par diverses instances internationales ou nationales sur l'analyse des connaissances toxicologiques animales et épidémiologiques, ces VTR sont une appellation générique regroupant tous les types d'indices toxicologiques établissant une relation quantitative entre une dose et un effet (toxiques à seuil de dose) ou

entre une dose et une probabilité d'effet (toxiques sans seuil de dose) (Miller et al., 2014 ; Cléro et al., 2021).

Pour les effets à seuil de dose, on dispose en pratique et dans le meilleur des cas (Hayes et Dixon, 2017) :

-D'un niveau d'exposition sans effet observé (NOEL : no-observed-effect level).

- D'un niveau d'exposition le plus faible ayant entraîné un effet (LOEL : lowest-observed-effect level).

Le niveau d'exposition le plus faible auquel un effet néfaste apparaît (LOAEL : lowest-observed-adverse-effect level).

Ces seuils sont issus d'expérimentations animales, d'études épidémiologiques ou d'essais de toxicologie clinique (Dishaw et al., 2020).

La relation dose-réponse désigne la relation entre la dose et le pourcentage d'individus présentant un effet spécifique. Lorsque la dose augmente, un plus grand nombre d'individus sont affectés dans la population exposée. Ainsi, une augmentation de la dose peut entraîner une augmentation des effets chez un individu ; et la proportion des individus affectés par une dose donnée devrait augmenter avec l'accroissement de la dose (Hayes et Dixon, 2017).

II-3- La toxicité et l'organe cible

L'organisme humain est en relation avec son milieu par un ensemble d'échanges qui contribuent à maintenir un équilibre dynamique. Quoique nous fassions, le milieu nous influence et nous l'influons. Ce principe d'action-réaction signifie que toute action a des conséquences (Cichocki et al., 2016).

L'organisme est exposé à de nombreux toxiques présents dans l'environnement général ou professionnel. Ces toxiques peuvent pénétrer dans l'organisme par trois portes d'entrée principales (Suman et al, 2022):

* L'appareil respiratoire, par inhalation de l'air pollué;

* L'appareil gastro-intestinal, par ingestion de nourriture, d'eau ou de boissons contaminées;

* La peau, par pénétration cutanée au niveau du derme.

Lorsqu'un produit chimique pénétrant dans l'organisme peut atteindre des organes cibles différents selon la voie, la dose, le sexe et l'espèce. Une interaction entre produits chimiques, ou entre produits chimiques et d'autres facteurs, peut également affecter différents organes cibles (**Cichocki et al., 2016**).

Le foie assure une grande part du catabolisme des xénobiotiques, ces substances étrangères apportées par l'alimentation ou l'environnement, grâce à son équipement enzymatique, sa localisation anatomique et sa vascularisation abondante. Ce processus, appelé détoxification, a pour but de rendre ces xénobiotiques plus hydrophiles, afin de faciliter leur élimination. Ces particularités du foie en font néanmoins une cible pour les composés toxiques (**Le Daré et al., 2021**). Généralement, l'hépatotoxicité est dose-dépendante et donc prévisible, apparaissant après un court délai (1—12 semaines) après exposition aux toxines (**Pannala et al., 2020**).

Une fois une molécule active ou un médicament ingéré, l'organisme va tout faire pour éliminer cet élément étranger. Il est donc important d'étudier le devenir de cette molécule et ses effets au sein de l'organisme, c'est-à-dire ses paramètres pharmacologiques qui comprennent la pharmacocinétique et les effets pharmacodynamiques (**Diez et Felly-Bosco, 2008**).

La pharmacodynamique comprend quatre étapes concernant le cheminement de la molécule dans l'organisme : son absorption, sa distribution, son métabolisme (sa transformation en produit éliminable) et son élimination (**Andres et al., 2019**).

La toxicodynamie s'intéresse à l'effet d'une substance étrangère introduite dans l'organisme (un xénobiotique), en étudiant l'interaction de la molécule avec sa cible se traduit par un ou plusieurs effets qui peuvent être mesurables ou non (**Andres et al., 2019**).

III-Les différentes formes de toxicité

L'étude de la toxicité concerne des domaines très variés. En effet, des médicaments aux armes chimiques en passant par les végétaux, les animaux, les produits industriels et bien d'autres. Toute substance destinée à être mise sur marché que ce soit un médicament ou autre produit chimique doit subir des essais de trois types de toxicité pour bien évaluer sa nocivité (**Robert et al., 2007**).

Selon la dose, la fréquence, la durée d'exposition et le temps d'apparition des signes cliniques. On distingue cliniquement trois formes essentielles de toxicité (tableau 12):

La toxicité aiguë, à court terme (subaiguë et sub-chronique) et à long terme (chronique).

Tableau 14 : Les différentes formes de toxicité (Bensimon et al., 2006)

Forme d'intoxication	Fréquence d'administration	Durée de l'exposition
Aiguë	Unique	< 24h
Sub-aiguë	Répétée	≤ 1mois
Chronique	Répétée	De 1 à 3mois
Sub-chronique	Répétée	> 3 mois

III-1- Toxicité aiguë

C'est une exposition de courte durée et d'absorption rapide du toxique par voie cutanée, pulmonaire ou buccale d'une dose unique ou multiples ne dépassant pas 24 heures en général les manifestations d'intoxications se développent rapidement, la mort ou la guérison surviennent sans retard. L'évaluation de toxicité aiguë d'une substance peut être réalisée par plusieurs types d'études (ECHA, 2012) :

- Études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux.
- Études *in vitro*, effectuées sur des cultures cellulaires ou tissulaires.
- Études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus.
- Études théoriques par modélisation (ex : structure, activité).

L'étude de la toxicité aiguë permet d'exprimer la dose qui tue 50 % des animaux d'expérience (DL50) ainsi que la dose minimale létale (DML) la plus petite dose qui tue un animal, ou encore la dose minimale sans effet toxique (DME) c'est-à-dire la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevé par rapport au lot témoin (Robert et al., 2007).

Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale 50 (DL₅₀). Cette dose permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. Elle sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances. Elle correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises (Cao et al., 2014).

La valeur absolue de la DL_{50} d'un composé varie beaucoup entre les laboratoires, et ces variations ont été attribuées aux différences, par exemple, dans les détails protocolaires, les souches animales, l'encagement, et la source de la substance chimique d'essai. Le résultat de ces discussions intensives des autorités ne demandent habituellement pas des tests de DL_{50} classiques impliquant un grand nombre d'animaux. L'Union Européenne et les États-Unis d'Amérique décrivent des méthodes alternatives bien établies et validées qui réduisent les souffrances des animaux et/ou utilisent beaucoup moins d'animaux que la méthode classique de Trevan (OCDE, 2008).

III-2- Toxicité subaiguë

Toxicité réitérée pendant au maximum 28 jours. L'intoxication subaiguë correspond à des expositions fréquentes et répétées sur une période de plusieurs jours ou semaines pour que les symptômes d'intoxication apparaissent. Elle permet d'identifier l'organe ou le système sur lequel le toxique agit préférentiellement (Bayat et al., 2014).

III-3- Toxicité chronique

L'intoxication chronique survient généralement suite à l'absorption répétée de faibles doses d'une molécule pendant une longue durée. Le délai avant l'apparition de symptômes ou de maladies peut être très long, il est donc souvent difficile de faire le lien entre l'exposition chronique et les effets constatés. L'évaluation des effets toxiques à long terme est complexe, car de nombreux paramètres entrent en jeu comme la nature des composés et leurs propriétés toxicodynamiques, leur synergie, les différents types d'exposition etc.

Le toxique s'accumule dans l'organisme de manière à ce que la quantité éliminée soit inférieure à la quantité absorbée. Cette concentration du toxique augmente progressivement dans l'organisme jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante pour engendrer des manifestations cliniques (Bayat et al., 2014 ; Ema et al., 2016).

Concernant la dose, il est recommandé de prévoir des groupes pour au moins trois niveaux de dose différents : une dose n'engendrant aucun effet toxicologique (dose sans effet) et une dose entraînant des effets toxicologiques. Dans cette fourchette, l'adjonction d'au moins un autre niveau de dose augmente la possibilité d'observer une relation dose-réaction. Toutes les études doivent inclure un groupe témoin d'animaux d'expérience chez lequel on n'administre que le véhicule (OMS, 2000).

Matériel et méthodes

La toxicité d'une substance peut être appréciée soit par l'étude de sa toxicité aiguë après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de sa toxicité après administration répétée de la substance. Notre étude expérimentale consiste à l'évaluation de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait hydro-méthanolique brut des grignons d'olive en utilisant le modèle animal « le rat Wistar ». L'objectif de ce chapitre est de :

- Étudier la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait des grignons d'olive in vivo.
- Déterminer l'effet toxique de l'extrait brut sur les paramètres biochimiques et quelques paramètres de stress oxydatif au niveau érythrocytaire et tissulaire.
- Étude histologique des cellules du foie, rein et tissu adipeux pour déterminer la présence ou l'absence des altérations cellulaires.

Protocole Expérimental

I- Préparation de L'extrait

L'extrait brut des grignons d'olive a été obtenu à partir de 50 g de poudre dans 1000 mL du mélange méthanol, eau (8:2 V, V) sous agitation. Après 48 h de macération, le mélange a été filtré puis évaporé jusqu'à l'obtention d'un résidu sec (voir chapitre II).

II- Animaux d'expérimentation

Les expériences sont réalisées sur des rates, albinos, de la souche Wistar, pesant entre 140 à 200 grammes, hébergées au niveau de l'animalerie du département de biologie (Université de Tlemcen). Les rates sont groupées par 5 dans chaque cage, disposées dans une salle ventilée, à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et elles ont eu un accès libre à une alimentation standard et à l'eau.

II-1-Étude de la toxicité aiguë

Les animaux sont au préalable mis à jeun 24 heures avant le traitement selon la ligne directrice de l'OCDE 423. Quinze (15) rates répartis en lots de trois rates chacun, ont été traités comme suit :

- Lot témoin a reçu de l'eau physiologique (1mL, 100g) ;

- Les lots 1, 2, 3 et 4 ont été traités à l'extrait hydro-méthanolique de GO des doses respectives de 200, 2000, 3000 et 5000 mg, kg.

Après administration unique de la solution préparée par voie orale, les animaux ont été placés dans les cages pour observations. Ces observations ont concerné le comportement et l'état général des animaux. La mortalité par lot a été évaluée pendant 48 heures après administration. Le poids corporel de chaque animal, a été mesuré quotidiennement pendant 14 jours. L'évaluation de cette toxicité permet l'indication de la dose létale 50 (DL50).

II-2- Étude de la toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë par voie orale a été réalisée selon la ligne directrice de l'OCDE 407 pendant 28 jours. Les rates sont réparties comme suit :

- Lot témoin reçoit l'eau physiologique (1 mL, kg).
- Les 4 autres lots sont les lots d'animaux traités avec l'extrait de GO à tester ont reçu respectivement les doses 2000, 500, 125, 30 et 3.125 mg, kg.

Pendant toute la période d'exposition, nous avons suivi leur poids corporel par la pesée chaque semaine et noté leur comportement tous les 28 jours.

À la fin des 2 tests, tous les animaux ont été sacrifiés après anesthésie avec le chloral 10 %. Le foie, les reins, la rate, l'intestin, tissu adipeux et muscle sont prélevés pour doser les paramètres de stress oxydatif (Homogénats) et aussi pour réaliser des analyses histopathologiques pour le foie, le rein et tissu adipeux. Ces dernières ont consisté pour la recherche d'éventuelles conséquences lésionnelles du traitement sur ses organes, par des analyses macroscopiques et microscopiques. Une fois l'organe prélevé (foie, rein, tissu adipeux) il était pesé et conservé dans un flacon contenant le formol à 10 % afin d'éviter sa dessiccation. Chaque organe a fait l'objet d'une analyse microscopique (voir chapitre II).

II-3-Détermination des paramètres hématologiques

Après la dissection des rates, le sang est prélevé par ponction dans l'aorte abdominale sur des tubes EDTA. Ces derniers ont été immédiatement utilisés pour déterminer les taux de globules blancs, de globules rouges, de plaquettes, MPV, MCH, MCHC, de la formule leucocytaire, de l'hémoglobine et de l'hématocrite. Ces dosages ont été réalisés au laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire, Tlemcen.

II-4-Détermination des paramètres biochimiques et de stress oxydatif

Les autres tubes sont centrifugés à 3 000 tours/min pendant 15 min. Le plasma recueilli à partir de ces échantillons est utilisé pour déterminer les paramètres biochimiques suivants : glucose, cholestérol, triglycérides, créatinine, urée, alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (ASAT) et protéines totales et le lysat obtenu pour déterminer quelques paramètres de stress oxydatif (MDA, Protéines carbonylés, Catalase, GSH et SOD).

III- Analyse statistique

Les variables étudiées ont été exprimées par moyenne \pm écart-type.

Les différences entre les groupes de toxicité aiguë et subaiguë ont été déterminées par une analyse à un facteur (ANOVA) pour la comparaison entre les moyennes en utilisant logiciel Minitab (18). Une p-value inférieure à 0,05 a été considérée significative.

Résultats et interprétation

I- Évaluation de la toxicité aiguë

I-1- Mortalité et observation des comportements

Le suivi régulier du comportement des rates a révélé que l'extrait hydro-métanolique n'a provoqué aucun changement (tableau 13). De plus, aucune mortalité n'a été observée chez les lots traités avec les doses 200, 2 000, 3 000, et 5 000 mg, kg pendant les deux semaines de l'étude.

Tableau 15 : Evaluation des comportements et symptômes des rates lors de l'étude de la toxicité aiguë.

Symptômes	Lot Témoins		Lots Traités	
	4h	Chaque jour	4h	Chaque jour
Peau et fourrure	Normal	Normal	Normal	Normal
Yeux	Normal	Normal	Normal	Normal
Muqueuse	Normal	Normal	Normal	Normal
Comportements anormaux	/	/	/	/
Salivation	Normal	Normal	Normal	Normal
Léthargie	/	/	/	/
Somnolence	/	/	/	/
Diarrhée	/	/	/	/
Coma	/	/	/	/
Tremblements	/	/	/	/

I-2-Évaluation du poids corporel

Le suivi de la variation du poids corporel des animaux au cours de l'expérience a démontré qu'il y a une diminution du poids après une semaine du gavage pour tous les lots traités (200, 2 000, 3 000 et 5 000 mg, kg). Cependant, dans la deuxième semaine de l'expérience, on constate une augmentation progressive du poids des rates des lots traités et les témoins (figure 32).

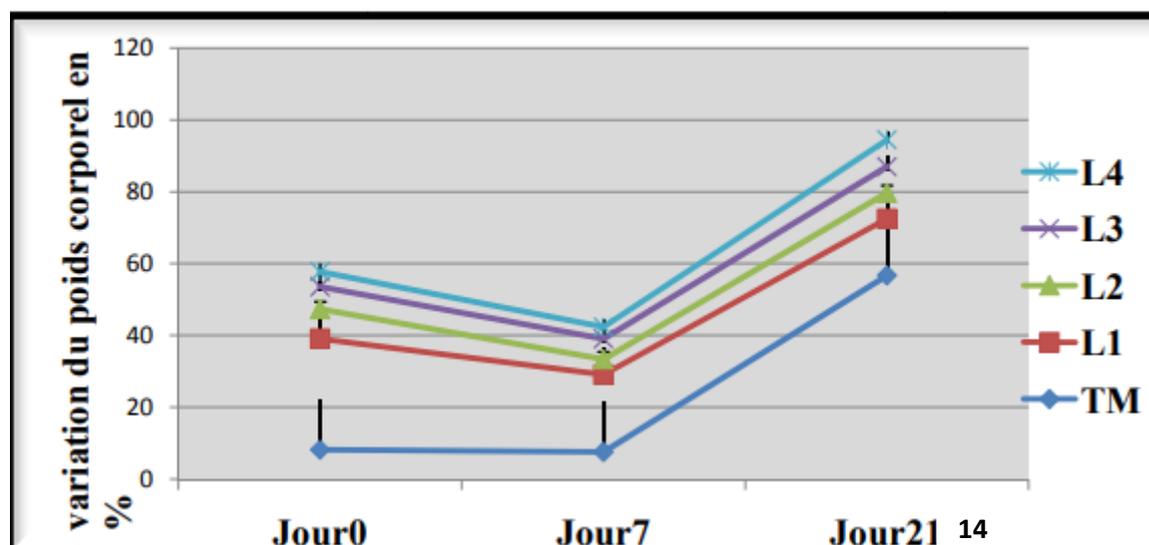


Figure 32 : Evolution du poids corporel des rates au cours de la toxicité aiguë

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. TM : Témoins ; L1 : rates traitées par la dose 200 mg, kg ; L2 : rates traitées par la dose 2 000 mg, kg ; L3 : rates traitées par la dose 3 000 mg, kg ; L4 : rates traitées par la dose 5000 mg, kg. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs sont significativement différentes à $P < 0,05$.

I-3- Poids relatifs des organes

L'administration orale des extraits n'a entraîné aucune modification significative du poids relatif des organes (foie, rate, reins, pancréas) chez les rates traitées par rapport aux rates témoins (tableau 14).

Tableau 16 : Poids relatifs (%) des organes des rates traitées avec l'extrait hydro méthanolique des GO

Lots/Organe	Foie	Rein	Rate	Pancréas
Témoins	4.5 \pm 0.07	1.07 \pm 0.10	0.46 \pm 0.03	0.47 \pm 0.02
200mg/kg	4.58 \pm 0.28	0.95 \pm 0.18	0.48 \pm 0.25	0.46 \pm 0.02
2000mg/kg	4.7 \pm 0.17	0.97 \pm 0.02	0.46 \pm 0.02	0.49 \pm 0.01
3000mg/kg	4.43 \pm 0.16	0.97 \pm 0.43	0.48 \pm 0.04	0.49 \pm 0.01
5000mg/kg	4.34 \pm 0.24	0.99 \pm 0.14	0.48 \pm 0.02	0.46 \pm 0.02

I-4-Paramètres biochimiques

L'analyse statistique des paramètres évalués (TGO, TGP, créatinine, urée) a montré qu'il y'a une différence significative pour la créatinine ($P=0.0001$) et l'urée ($P=0.001$) pour les groupes traités comparés aux témoins. Cependant, les moyennes de la TGO et la TGP par classe (témoins et groupes traités) sont pratiquement égales avec une différence non significative ($P>0,05$) (figure33).



Figure 33 : Teneurs plasmatiques en urée (mg/dl) et en créatinine (mg/dl)

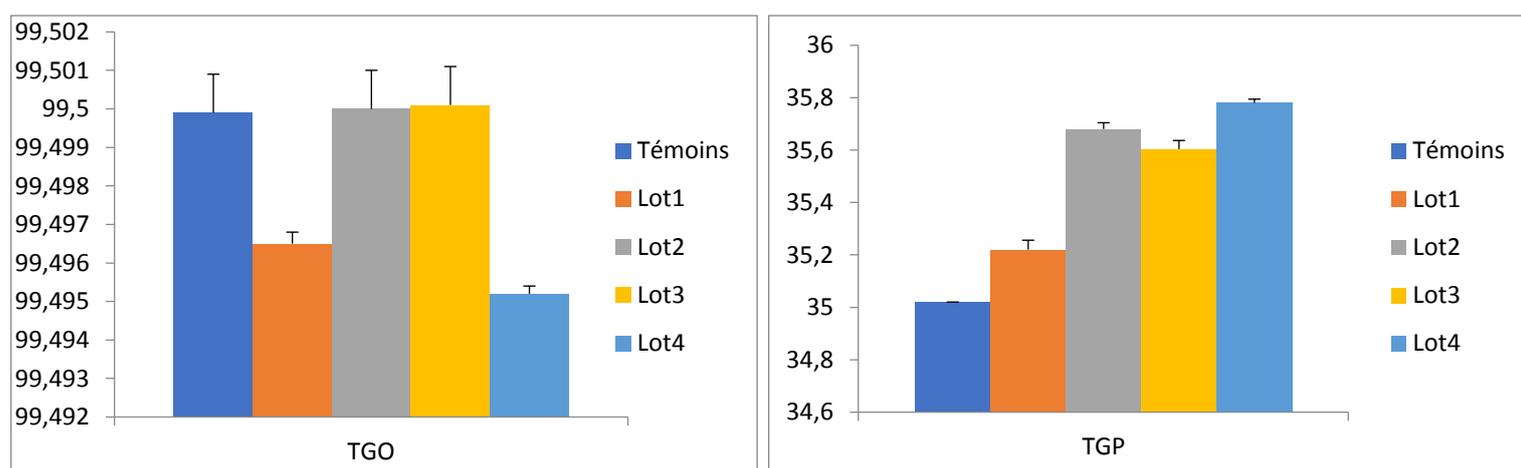


Figure 34 : Teneurs plasmatiques en transaminases (UI/L)

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. Témoins ; Lot1 : rates traitées par la dose 200 mg, kg ; Lot2 : rates traitées par la dose 2 000 mg, kg ; Lot3 : rates traitées par la dose 3 000 mg, kg ; Lot 4 : rates traitées par la dose 5 000 mg, kg. Après vérification de la distribution normale des

variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. Afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs sont significativement différentes à $P < 0,05$.

I-5-Paramètres de stress oxydatif

Les rats femelles traités par l'une des doses (2 000, 3 000, 5000 mg, kg) d'extrait hydro-méthanolique des GO présentent une augmentation significative des teneurs érythrocytaires en MDA et protéines carbonylées par rapport aux témoins et à la dose 200 mg, kg.

L'activité érythrocytaire de la GSH présente une diminution significative des doses 2 000, 3 000 et 5 000 mg,kg comparés à la dose 200 mg, kg et leurs témoins. Cependant l'activité de la catalase et la SOD présente aucune différence significative entre les témoins et les lots traités ($P > 0,05$) (tableau 15).

Tableau 17 : Teneurs érythrocytaires des paramètres de stress oxydatif

Paramètre/Lot	Témoin	200 mg/kg	2 000 mg/kg	3 000 mg/kg	5 000 mg/kg
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	0.70 ± 0.09	0.74 ± 0.07	0.85 ± 0.07	0.82 ± 0.05	0.82 ± 0.02
SOD (mM/min/mL)	377.37 ± 0.71	378.82 ± 1.27	379.83 ± 0.15	379.47 ± 0.3	379.38 ± 0.17
GSH ($\mu\text{mol/L}$)	0.60 ± 0.02	0.64 ± 0.90	0.19 ± 0.07	0.22 ± 0.02	0.14 ± 0.04
Protéines carbonylés ($\mu\text{mol/L}$)	0.30 ± 0.07	0.33 ± 0.08	0.37 ± 0.0007	0.46 ± 0.06	0.56 ± 0.01
Catalase (U/min/ mL)	253.2 ± 3.25	252.02 ± 1.12	253.02 ± 2.02	251.3 ± 3.02	255.31 ± 1.16

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. Témoins ; Lot 1 : rates traitées par la dose 200 mg, kg ; Lot 2 : rates traitées par la dose 2 000 mg, kg ; Lot 3 : rates traitées par a dose 3 000 mg, kg ; Lot 4 : rates traitées par la dose 5 000 mg, kg. Après vérification de

la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. Afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs sont significativement différentes à $P < 0,05$.

II- Évaluation de la toxicité sub-aiguë

II-1- Signes cliniques

Quelques instants après gavage de l'extrait hydro-méthanolique des GO à des doses allant de 3.12 à 2000 mg/kg, une faiblesse et un isolement individuel ont été notés chez les rates gavées avec une dose de 2 000 mg/kg seulement. Une vingtaine de minutes plus tard, tous les animaux ont repris leur habitude normale. Des modifications relatives à l'aspect général des rates (pilosité, peau, état des yeux, des oreilles et de la bouche) n'ont pas été observées durant les 28 jours d'administration.

Après 28 jours de l'administration de l'extrait, aucune mortalité n'a été signalée pendant l'expérience. Pour le comportement, on constate que le lot témoin contenant les rates gavées par l'eau physiologique, n'a montré aucun signe de toxicité. Même résultat a été obtenu avec les lots traités par les doses 125, 31.25 et 3.12 mg/kg. En revanche, on a remarqué une diarrhée au cours de la 3^{ème} et 4^{ème} semaine de l'expérience pour les lots traités par les doses 500 et 2 000 mg/kg (tableau16).

Tableau 18 : L'effet toxique de l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive sur le comportement des rates

Lot	Signes de toxicité
Témoins	Normal
2000 mg/kg	Perte d'appétit et faiblesse les 3 premiers jours. Diarrhée forte au cours de 3 et 4 ^{ème} semaine.
500 mg/kg	Diarrhée au cours de la 4 ^{ème} semaine.
125 mg/kg	Normal
31.25 mg/kg	Normal
3.12 mg/kg	Normal

II-2- Évaluation du poids corporel

Le suivi de variation du poids corporel des rates durant les 28 jours d'expérience montre qu'après la deuxième semaine, l'administration de l'extrait entraîne une diminution du poids corporel chez les rates des lots traités comparé aux témoins. À partir de la 3^{ème} semaine, on a enregistré une augmentation du poids chez tous les lots traités. Puis une chute du poids est retrouvée chez ces mêmes lots dans la dernière semaine d'expérience (figure 35).

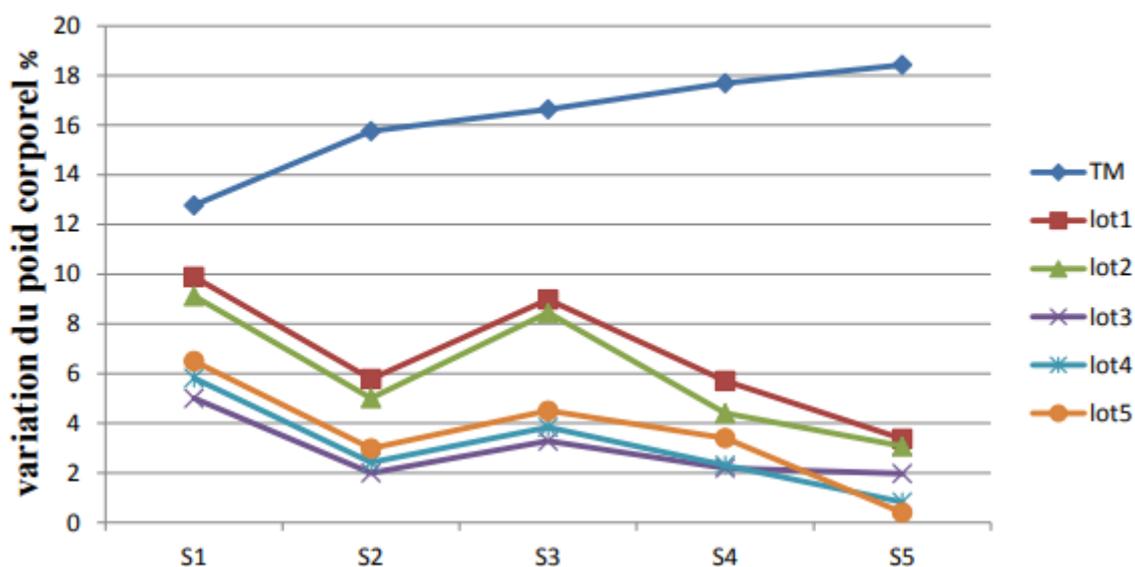


Figure 35 : Evolution du poids corporel des rates pendant la période d'expérimentation

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D.

TM : Témoins ; Lot 1 : rates traitées par la dose 3.12 mg, kg ; Lot 2 : rates traitées par la dose 31.25 mg, kg ; Lot 3 : rates traitées par la dose 125mg, kg ; Lot 4 : rates traitées par la dose 500 mg, kg ; Lot 5 : rates traitées par la dose 2000 mg, kg. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. Afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs sont significativement différentes à P.

II-3- Poids relatif des organes

Après l'examen macroscopique des différents organes prélevés (foie, rein, pancréas, rate), on a observé que leurs tailles et leurs formes sont normales. Aussi, il n'y a aucune modification significative du poids relatif des organes comparé aux témoins (tableau 17).

Tableau 19 : Poids relatif des organes

Lots/Organe	Foie	Rein	Rate	Pancréas
Témoins	3.71 ± 0.21	0.78 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.47 ± 0.05
2000 mg/kg	3.48 ± 0.18	0.81 ± 0.04	0.43 ± 0.01	0.46 ± 0.03
500 mg/kg	3.57 ± 0.17	0.83 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.42 ± 0.08
125 mg/kg	3.51 ± 0.24	0.78 ± 0.02	0.44 ± 0.05	0.48 ± 0.01
31.25 mg/kg	3.19 ± 0.04	0.77 ± 0.08	0.45 ± 0.02	0.49 ± 0.02
3.12 mg/kg	3.68 ± 0.13	0.78 ± 0.03	0.46 ± 0.06	0.47 ± 0.03

II-4- Paramètres hématologiques

L'analyse statistique des paramètres hématologiques montre qu'il y a aucune différence significative entre les témoins et lots traités avec l'extrait des GO ($p\text{-value} > 0.05$) pour l'hématocrite, hémoglobine, plaquettes, MPV, MCH, neutrophiles, lymphocytes, monocytes et basophiles. D'autre part les lots traités par les doses 125 et 31.25mg, kg présentent des moyennes significativement faible ($P=0,0411$) comparées aux témoins pour les globules rouges. Les rates gavées avec une dose de 2 000 mg, kg montrent une augmentation significative de taux des globules blancs ($P=0.0115$) et MCHC ($P=0.0128$). Les éosinophiles augmentent de façon très significative ($P=0.007$) chez tous les lots comparée aux témoins (tableau 18).

Tableau 20: Évaluation de taux des paramètres hématologiques des différents lots traités et témoin dans les conditions de toxicité sub-aiguë

	Témoins	2000 mg/kg	500 mg/kg	125 mg/kg	31,25 mg/kg	3,12 mg/kg	p-value
GR (10⁶/μl)	5,097±0,629	5,580±0,440	4,557±1,002	3,79±0,02	3,653±0,982	4,850±1,043	0,0411
Hématocrite (%)	29,93±3,19	25,850±1,650	24,73±3,79	23,1±0,990	26,60± 7,95	32,90±4,88	0,2148
Hémoglobine (g/dl)	10,367±1,137	9,350±1,250	9,367±0,896	9,5±0,1	8,07±2,42	10,63±2,35	0,4655
Plaquettes (10³/μl)	311,00±9,00	693,00±8,00	438±351	641,00±7,00	375,3±149,3	442±173	0,1057
MPV	6,033±0,252	7,35±0,05	6,367±1,436	6,1750±0,1250	7,000±1,015	5,367±1,079	0,1376
MCH (pg)	20,333±0,351	20,3±0,8	19,200±1,015	19,4±0,2	19,467±0,503	18,600±1,323	0,1367
MCHC (g/dL)	34,567±0,379	37,900±0,600	34,97±2,54	34,450±0,450	32,63±2,15	33,400±0,794	0,0128
GB (10³/μL)	1,667±0,820	7,560±0,270	4,86±3,08	4,705±0,304	2,600±1,306	2,627±1,695	0,0115
Neutrophiles (%)	8,03±2,68	16,850±0,650	11,47±6,47	10,200±0,849	13,83±5,02	19,07±15,27	0,5173
Lymphocytes (%)	41,10±10,08	15,150±0,495	31,8±30,3	15,850±1,202	20,17±8,57	35,70±12,60	0,3635
Monocytes (%)	8,633±1,041	5,250±0,350	11,60±10,91	6,200±0,141	20,5±21,2	8,037±0,650	0,5351
Basophiles (%)	7,43±12,19	0,385±0,005	0,850±0,823	0,355±0,005	0,607±0,427	0,693±0,525	0,4874
Eosinophiles(%)	0,933±0,643	4,4±0,1	2,04±1,76	3,95±0,15	3,1167±0,1041	3,233±1,305	0,0071

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D.

TM : Témoins ; Lot 1 : rates traitées par la dose 3.12 mg, kg ; Lot 2 : rates traitées par la dose 31.25 mg, kg ; Lot 3 : rates traitées par la dose 125 mg, kg ; Lot 4 : rates traitées par la dose 500 mg, kg ; Lot 5 : rates traitées par la dose 2 000 mg, kg. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. Afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs sont significativement différentes à $P < 0,05$.

II-5- Paramètres biochimiques

Les données montrent que les groupes traités par des doses de 2 000 mg, kg, 500 mg, kg et 3,12 mg, kg, présentent des moyennes de glucose ($125,200 \pm 1,000$; $132,449 \pm 1,154$; $133,70 \pm 2,21$ respectivement) plus faible que les témoins ($144,977 \pm 0,760$) ainsi que les groupes traités par des doses de 125 mg, kg ($144,14 \pm 3,99$) et 31,25 mg, kg ($144,08 \pm 1,79$). Ainsi, les moyennes des paramètres lipidiques (TG, cholestérol et HDLc) présentent des différences très significatives ($P=0.0001$) entre les groupes traités et les témoins. Le taux de la TGO présente une augmentation significative chez les lots traités par les doses 2000 et 500 mg, kg comparés aux groupes (125, 31.25 et 3.12 mg, kg) et groupe témoins. Les paramètres rénaux montrent aussi des moyennes hautement significatives des groupes traités comparés à leurs témoins.

Cependant, les moyennes des protéines totales et de la TGP ne diffèrent pas (p) entre les témoins et les groupes traités par des différentes doses (tableau 19).

Tableau 21 : Évaluation des teneurs des paramètres biochimiques des différents lots traités et témoin dans les conditions de toxicité sub-aiguë

	Témoins	2000 mg/kg	500 mg/kg	125 mg/kg	31,25 mg/kg	3,12 mg/kg	p-value
Glucose (mg/dl)	144,977±0,760	125,200±1,000	132,449±1,154	144,14±3,99	144,08±1,79	133,70±2,21	0,0001
Protéines totales (g/dl)	4,013±0,444	3,717±0,197	3,213±1,075	3,923±0,231	4,7050±0,0450	3,513±0,960	0,1550
TG (mg/dl)	58,560±1,058	30,955±0,500	32,57±3,39	37,86±7,94	50,34±2,66	58,020±0,520	0,0001
Cholestérol (mg/dl)	35,1733±0,1274	33,593±0,615	37,890±0,700	77,96±11,14	76,01±2,54	75,61±6,41	0,0001
TGO (U/l)	75,640±0,753	179,350±1,150	159,51±9,09	70,62±9,69	54,420±0,516	72,25±4,55	0,0001
TGP (U/l)	34,737±0,491	141,873±1,625	97,00±7,09	49,900±0,600	37,76±1,74	27,63±2,07	0,3265
Urée (mg/dl)	31,48±2,33	140,963±0,775	121,73±6,27	63,4±21,9	48,303±0,415	31,94±2,02	0,0001
Créatinine (mg/dl)	5,207±0,911	15,250±0,250	14,000±0,500	8,690±1,143	7,000±0,661	3,667±0,382	0,0001
HDL (mg/dl)	63,507±1,161	46,870±0,570	31,60±1,82	74,28±3,52	61,69±7,56	61,833±0,775	0,0001

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. TM : Témoins ; Lot 1 : rates traitées par la dose 3.12 mg, kg ; Lot 2 : rates traitées par la dose 31.25 mg, kg ; Lot 3 : rates traitées par la dose 125 mg, kg ; Lot 4 : rates traitées par la dose 500 mg, kg ; Lot 5 : rates traitées par la dose 2 000 mg, kg. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. Afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs sont significativement différentes à $P < 0,05$.

II-6-Paramètres de stress oxydatif

Les teneurs en malondialdéhyde (MDA) et protéines carbonylées présentent des moyennes hautement significatives pour les lots traités par des doses 2 000 et 500 mg, kg comparés aux témoins. L'activité de la catalase et les teneurs en glutathion réduit (GSH) aux concentrations 2000 et 500 mg,kg présentent des moyennes faibles significativement que les témoins et les autres groupes traités. En outre, l'activité de le superoxyde dismutase (SOD) ne présente aucune variation entre les différentes doses et les témoins ($P>0.05$) (tableau 20).

Tableau 22 : Evaluation des teneurs des paramètres érythrocytaires des différents lots traités et témoin dans les conditions de toxicité sub-aiguë.

Paramètres	Témoins	2000 mg/kg	500 mg/kg	125 mg/kg	31.25 mg/kg	3.12 mg/kg	P-value
SOD (mM/min/mL)	380.04±4.26	380.07±1.83	373.04±2.24	377.35±0.77	376.72±2.55	375.14±5.09	0.144
Catalase (U/min/ mL)	252.75±1.43	247.12±0.86	260.80±4.79	254.80±0.91	253.94±0.89	253.79±1.63	0.0001
GSH (µmol/L)	0.18±0.001	0.16±0.001	0.20±0.009	0.18±0.002	0.16±0.001	0.16±0.001	0.0001
MDA (µmol/L)	0.70±0.03	0.94±0.01	0.90±0.03	0.78±0.01	0.69±0.02	0.69±0.01	0.0001
Protéines carbonylés (µmol/L)	0.33±0.03	0.38±0.005	0.34±0.009	0.35±0.004	0.34±0.002	0.35±0.004	0.065

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm S.D. TM : Témoins ; Lot 1 : rates traitées par la dose 3.12 mg, kg ; Lot 2 : rates traitées par la dose 31.25 mg, kg ; Lot 3 : rates traitées par la dose 125 mg, kg ; Lot 4 : rates traitées par la dose 500 mg, kg ; Lot 5 : rates traitées par la dose 2000 mg, kg. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. Afin de classer et de comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs sont significativement différentes à $P<0,05$.

II-7-Étude histologique de foie, rein et tissu adipeux

Les résultats de l'examen histologique sont indiqués dans les figures (36, 37, 38, 39, 40, 41). D'après ces résultats, on a remarqué que l'examen histologique du foie ne montre aucune altération structurelle des hépatocytes avec une vascularisation normale, aucune nécrose focale ou une vacuolisation n'ont été observées au niveau des coupes examinées de tous les rates traités par l'extrait hydro-méthanolique des GO à différentes doses comparés aux hépatocytes des rates témoins.

L'examen histologique du rein montre des glomérules et des tubules proximaux et distaux normaux, aucune modification de la zone corticale ou les capsules de Bowman n'ont été observées chez les groupes traités par les doses 3.12, 31.25 et 125 mg, kg comparés aux témoins. En outre, on remarque au niveau des reins des rates traitées par les doses 500 et 2000 mg, kg une inflammation aiguë de l'infiltration cellulaire des lymphocytes et des neutrophiles au niveau médullaire. Par ailleurs, l'histologie des adipocytes au niveau du tissu adipeux ne montre aucune altération membranaire ou nucléaire chez tous les groupes traités par l'extrait.

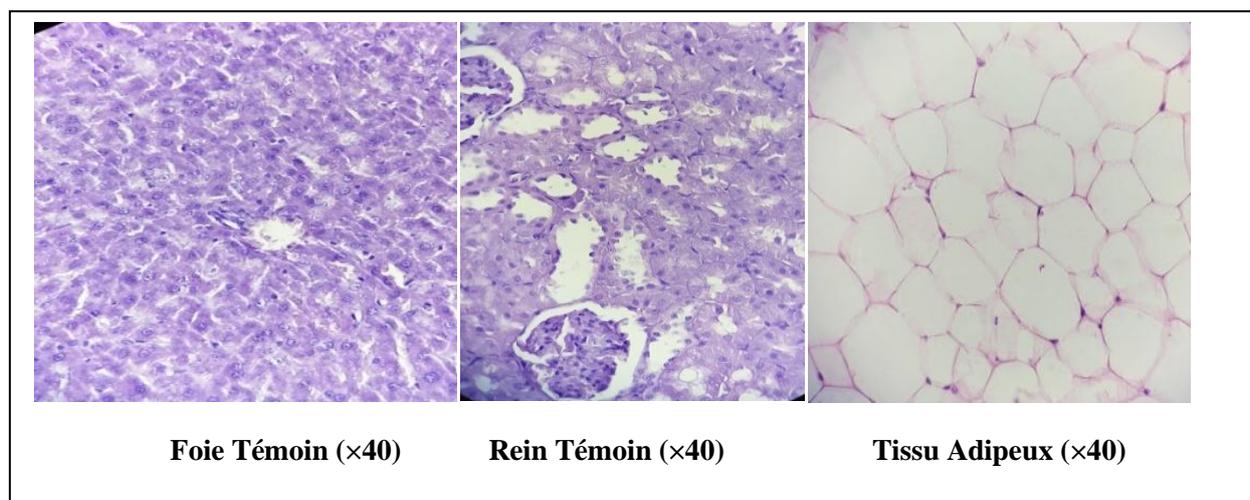


Figure 36 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates témoins

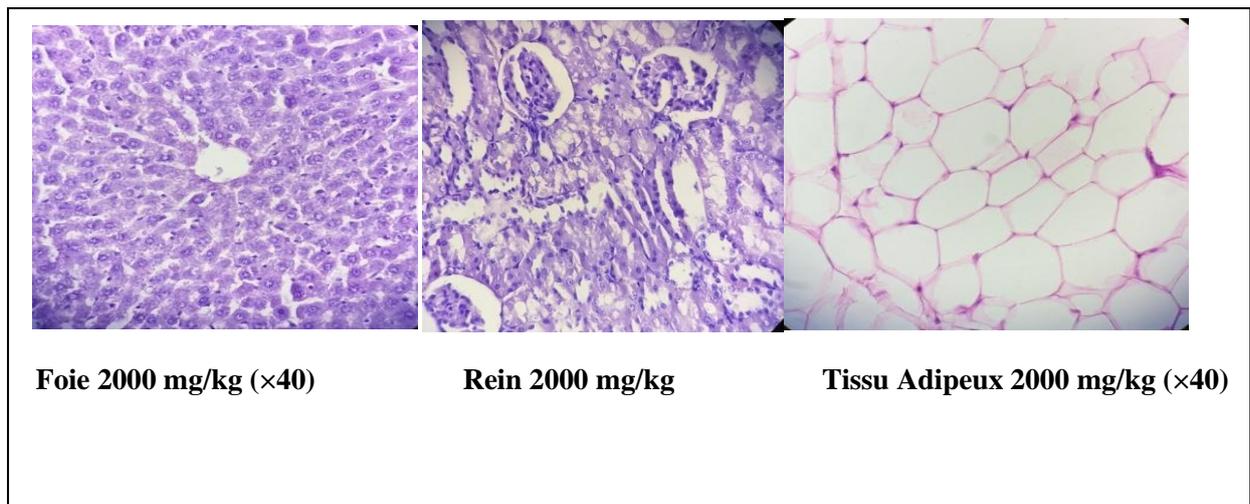


Figure 37 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 2000 mg/kg

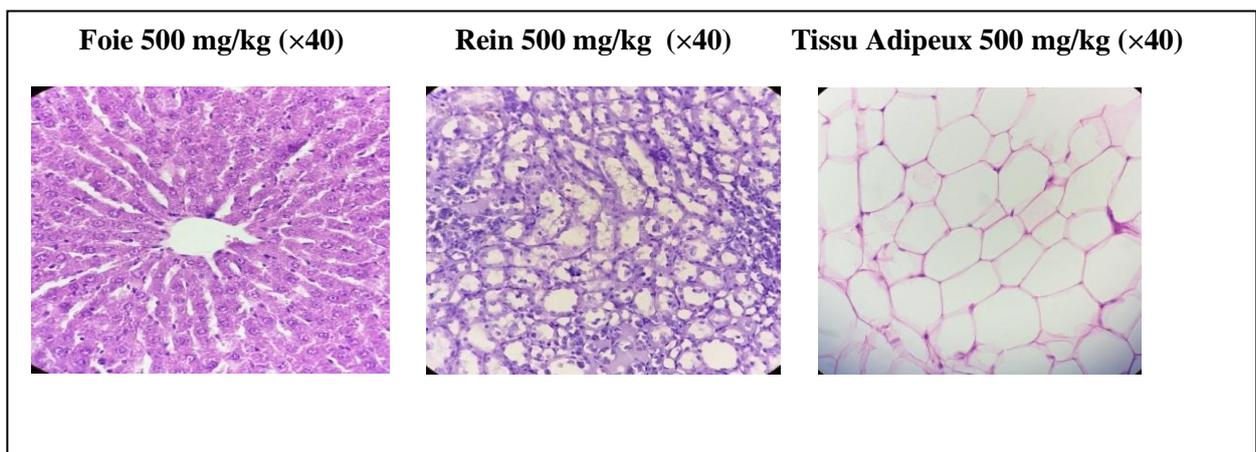


Figure 38 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 500mg/kg

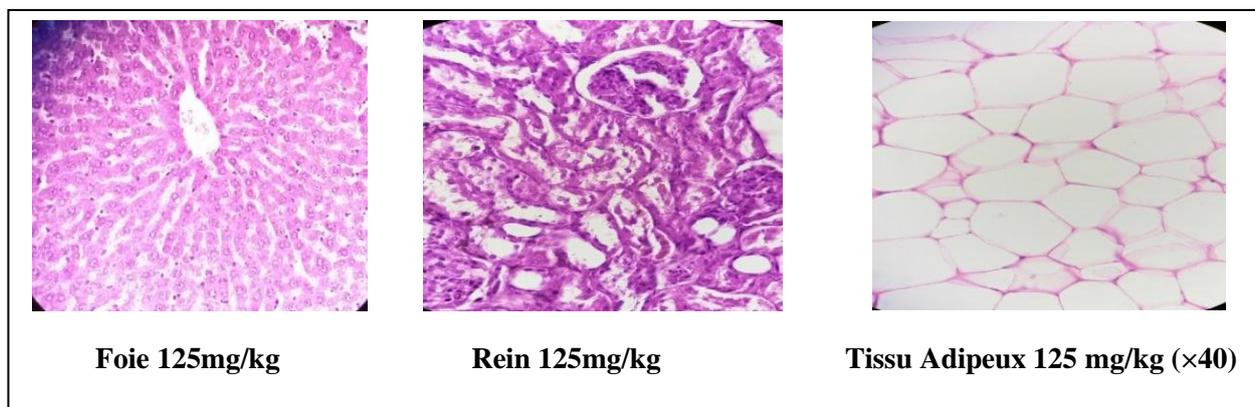


Figure 39 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 125 mg/kg

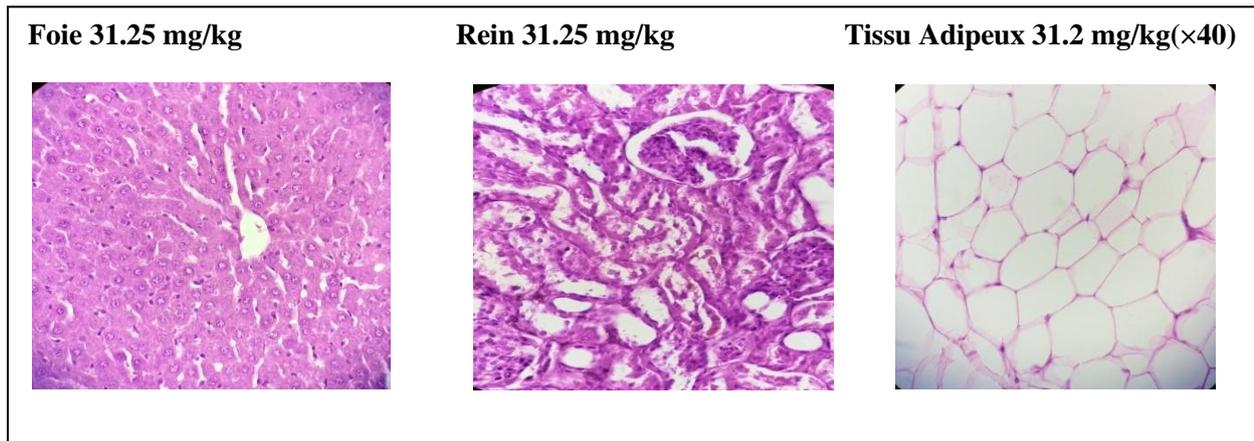


Figure 40 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 31.25 mg/kg

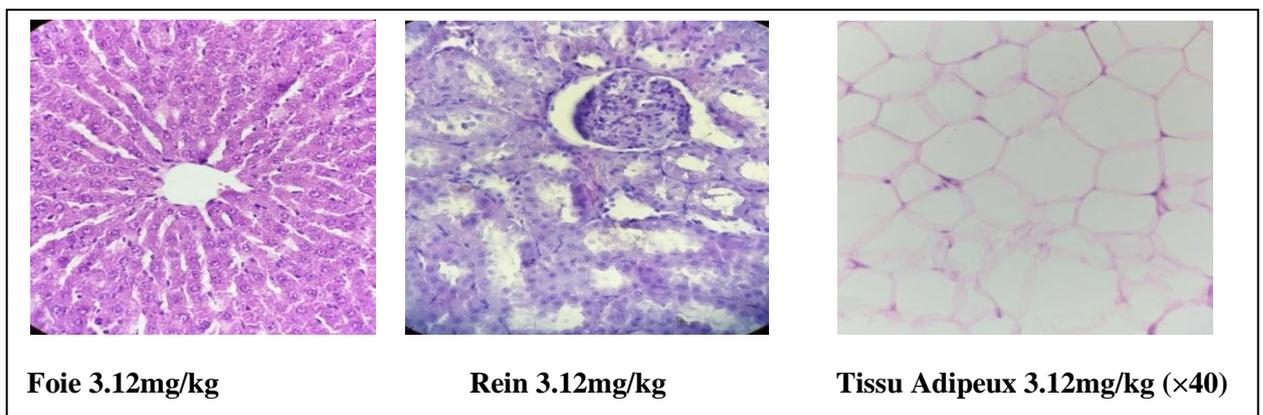


Figure 41 : Coupes histologiques du foie, rein et TA des rates traitées par la dose 3.12 mg/kg

Discussion

L'utilisation thérapeutique des extraits à bases des plantes (phytothérapie) est très ancienne et connut actuellement un regain d'intérêt au pré du public (Awad et al., 2020). Aujourd'hui, environ 80 % de la population mondiale utilise la médecine traditionnelle. Cependant, l'évaluation de la toxicité de ces extraits a attiré l'attention des chercheurs surtout l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité (Chen et al., 2021). Ainsi, pour garantir la sécurité des produits végétaux destinés à l'usage humain, des études systématiques sont nécessaires pour prévoir les risques de toxicité et fournir des informations scientifiques permettant de sélectionner des doses sûres chez l'homme (Awad et al., 2020). A notre connaissance aucune étude de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait brut hydro-méthanolique du GO n'a été réalisée. L'étude de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive montre que notre extrait est presque non toxique avec une $DL_{50} > 5000$ mg, kg. Selon la classification de Hodge et Sterner (Frank, 1992), notre substance, administrée par voie orale, est légèrement toxique, dont la DL_{50} se situant entre 5 000 et 15000 mg, kg du poids corporel. Le changement du poids est utilisé comme un indicateur général des effets indésirables des composés chimiques (Fantke et al., 2021). Une diminution du poids corporel après le 7^{ème} jour de gavage au cours de la toxicité aiguë peut s'expliquer par une perte d'appétit due à une irritation gastro-intestinale qui réduit la consommation des aliments (Deyno et al, 2020).

Une modification de poids relatif des organes est un indicateur des dommages cellulaire au niveau de ses organes (Olaniyan et al., 2016). Les résultats ne montrent aucun effet délétère sur le poids de foie, rein, rate et pancréas chez tous les rats traités ; ces résultats sont en accord avec les résultats de Ahmad et al. (2022) qui a étudié la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Combretum Hypopilinum* à des doses 1000, 3000 et 5000 mg, kg qui ne provoque aucune modification des poids relatif des organes chez tous les lots traités.

Sur le plan biochimique, les données statistiques ne montrent aucune différence significative entre les lots témoins et les lots traités pour les transaminases (ASAT et ALAT) au cours de la toxicité aiguë. Ces deux enzymes sont des bio-marqueurs de l'activité du foie (He et al., 2023), ces résultats sont en corrélation avec l'étude histologique du foie chez les rates gavées par la dose 2000 mg,kg qui ne présentent aucune modification structurales des hépatocytes. Par contre on remarque une augmentation significative de taux sérique des paramètres rénaux

chez les lots traités par des doses élevés (2 000, 3 000 et 5 000 mg, kg) de l'extrait des GO. L'examen histologique des reins chez les rates traités par une dose de 2000 mg, kg a confirmé ces résultats.

En effet, l'inflammation aiguë marqué au niveau médullaire est due à une substance toxique, car le rein est la principale voie d'excrétion des xénobiotiques qui sont très concentrés au niveau glomérulaire et le cortex reçoit environ 80 % du flux sanguin donc une forte concentration des xénobiotiques, aussi après la réabsorption ces toxines s'accumulent dans les tubules proximaux (**Radi, 2019**). Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Krache et al (2017)** ; qui a étudié la toxicité aiguë et sub-chronique de l'extrait méthanolique de *Teucrium poulimum* chez des rats femelles a montré une augmentation significative de l'urée et la créatinine avec une altération au niveau rénal chez les groupes traités.

Au cours de la toxicité subaiguë de l'extrait hydro-méthanolique des GO (**Badi et al., 2022**), la diminution significative de la glycémie chez les rates traitées par la dose 500 et 2000 mg, kg est la cause de la présence des polyphénols qui favorise la diminution de taux du glucose ; ces résultats sont en accord avec **Cherad et Bouderbala (2019)** qui ont conclu que chez les rats rendus diabétiques, la consommation d'un régime supplémenté des GO induit la diminution de la glycémie. En outre, la diminution des paramètres lipidiques chez les groupes traités par les fortes doses d'extrait des GO (500 et 2 000 mg, kg) est due à l'effet des grignons d'olive sur les deux enzymes clés du métabolisme : hydroxy-méthyl-glutary-coenzyme A réductase, enzyme responsable de la régulation de la biosynthèse du cholestérol et le cholestérol α -hydroxydase, enzyme impliqué dans la transformation du cholestérol en acide biliaire. De plus l'effet hypotriglycéridémiant peut être expliqué par l'augmentation du catabolisme des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) fraction qui permet l'exportation des TG hépatiques causée par l'augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase post-hépariné ; enzyme localisé au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins (**Bouderbala et al., 2014**). L'augmentation de taux de HDLc chez les rates traitées par la dose 125 mg, kg est un indicateur de protection du muscle cardiaque alors un effet bénéfique (**Liu et al., 2011 ; Bidie et al., 2016**). Des résultats similaires ont été rapportés par **Abdulmumin et al (2020)**, en mesurant le profile lipidique chez des rats après l'étude de la toxicité de l'extrait des tiges et des racines de *Jatropha curcas*.

Les transaminases sont des marqueurs de la toxicité hépatique et leur taux sériques, élevés renseignent sur une lésion des hépatocytes (**Awotunde et al., 2019**). Nos résultats indiquent une augmentation sérique des taux de TGO et TGP chez les rates traités par les doses 2 000 et

500 mg/kg seulement et aucune perturbation chez les lots 125, 31.25 et 3.12 mg, kg ; par contre l'examen histologique des foies chez tous les lots n'indique aucune altération des hépatocytes, des résultats similaires ont été obtenus par **Micolo B. et al. (2020)** après l'administration orale de la dose 500 et 2 000 mg, kg de l'extrait aqueux des feuilles de *Tetracera pitoria* pendant 28 jours chez des rats Wistar. Le bilan rénal sert à dépister un éventuel dysfonctionnement du rein (**Chitra et al., 2015**). Nos résultats montrent un taux élevé d'urée et de créatinine chez les groupes traités avec des doses élevés, ceux qui ont confirmé par l'étude histologique des reins qui montrent une atteinte de la fonction rénale. D'autres auteurs ont également montré l'effet toxique de certains phytomédicaments sur la fonction rénale par l'augmentation du taux sérique de la créatinine et l'urée (**Adeneye et al., 2006 ; Awotunde et al., 2019 ; Gbogbo et al., 2021**).

Le système hématopoïétique est très sensible aux substances toxiques, c'est un indicateur important de l'état physiologique et pathologique du corps (**Sundaram et al., 2021**). C'est pour cela, que tout changement dans les paramètres hématologiques a une valeur prédictive pour l'intoxication humaine, lorsque les données sont traduites à partir des études réalisées sur des animaux (**Manda et al., 2017**). Dans cette étude, l'administration orale de l'extrait hydro-méthanolique des GO montre aucun effet sur l'hématocrite, hémoglobine, plaquettes, MPV, MCH, neutrophiles, lymphocytes, monocytes et basophiles. Par contre chez les rates gavées avec la dose 2000 mg/kg, on note une augmentation de taux des globules blanc et rouge ; cette augmentation est due à la surproduction des paramètres hématopoïétiques tels que l'érythropoïétine et la thrombopoïétine par les cellules stromales au niveau de la moelle osseuse (**Rhiouani et al., 2008**). Ceci suggère que les GO renferment des substances bioactives qui ont un pouvoir amplificateur de la réponse immunitaire en augmentant le taux des globules blancs : Ceci suggère que les GO renferment des substances bioactives qui ont un pouvoir amplificateur de la réponse immunitaire en augmentant le taux des globules blancs : le premier niveau défensif de l'organisme (**Manda et al., 2017**). Le taux élevé des éosinophiles chez tous les lots traités par rapport aux témoins peut être expliquer par la stimulation de la prolifération de ces cellules par les composés phytochimiques présentés dans notre extrait surtout les saponines qui ont une capacité de fortifier le système immunitaire (**Musila M et al., 2017**). Les mêmes résultats sont rapportés par **Ahmad et al. (2022)**, après l'administration de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Combretum hypopilinum* à différentes doses (250, 500 et 1 000 mg, kg) à des rats Wistar, ils remarquent une augmentation des éosinophiles et d'autres cellules immunitaires.

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif composé principalement des adipocytes, c'est un site important d'accumulation des substances toxiques et il joue un rôle majeur dans le stockage de certains xénobiotiques de nature hydrophobe (**Jackson et al., 2018**).

L'examen histologique de tissu adipeux ne montre aucune altération ou modification des adipocytes chez tous les lots traités par l'extrait hydro-méthanolique des GO.

NOEL est la dose la plus élevée d'une substance, dans la gamme de doses testées, pour laquelle il n'y a pas de différence statistiquement significative par rapport aux organismes témoins. Les résultats montrent que la dose 125mg/kg présente aucun effet toxique de notre extrait administré du GO.

Depuis 1985, le terme « stress oxydative » désigne les dommages oxydatifs cellulaires et tissulaires (organes) à cause d'une perturbation entre les pro-oxydants et les anti-oxydants (**Sies et al., 2017**). Une production excessive des radicaux libres est induite par plusieurs facteurs tels que des substances toxiques, des médicaments... Cette toxicité peut toucher différents organes : foie, reins, système nerveux et cardiovasculaire... (**Deavall et al., 2012**).

Après une administration unique de l'extrait hydro-méthanolique des GO, on remarque une augmentation significative des taux érythrocytaires de MDA et les protéines carbonylés avec une diminution significative de GSH chez les lots traités par les doses 2 000, 3 000 et 5 000 mg, kg. Par contre, on ne note aucune modification des taux des enzymes anti-oxydantes la catalase et le superoxyde dismutase. Ces études similaires ont prouvé que l'administration des substances à des doses élevées cause une peroxydation lipidique, c'est-à-dire l'augmentation de MDA et une diminution des enzymes anti-oxydantes (**Kim et al., 2009 ; Tedesco et al., 2010 ; Patllola et al., 2015 ; Wang et al., 2016**).

L'augmentation de MDA est le résultat de la diminution de GSH, car ce dernier est un facteur important de la protection contre la peroxydation lipidique (**Jamshidzadeh et al., 2008**). Par ailleurs, après 28 jours de gavage, on remarque aussi des variations dans les taux des paramètres de statut Redox, une augmentation significative de MDA et des protéines carbonylées chez les rates traitées par les doses 500 et 2 000 mg, kg et la diminution de la catalase et GSH. Ces résultats se rapprochent de **Koh et al. (2012)**, qui a étudié la toxicité de l'extrait de *Cymbopogon* chez des rats Wistar.

Aussi **Tousson et El-Gharbawy (2023)** trouvent une diminution de taux de catalase et GSH chez des rats après l'administration de 100 mg, kg de l'extrait de *Saussurea Lappa*. Le superoxyde dismutase constitue la première ligne de défense contre les espèces réactives de

l'oxygène (ROS) donc un antioxydant très important dans notre corps (Younus, 2018). Les résultats ne montrent aucune variation de taux de SOD entre les témoins et les groupes traités. Cet effet est dû à la capacité des GO de favoriser la synthèse de SOD pour protéger l'organisme contre l'effet toxique (Cherrad et Bouderbala, 2019 ; Li et al., 2019).

Conclusion

Le présent chapitre avait pour but d'évaluer la toxicité orale aiguë et subaiguë de l'extrait hydro-méthanolique des GO sur des rates de souche Wistar. Ce regain d'intérêt est lié au besoin de rechercher une médication par une thérapie moins toxique et sans effets secondaires. Dans la littérature, aucune étude n'a fait l'objet du profil toxicologique sur les grignons d'olive, cela donne à notre travail de la nouveauté et de l'originalité, pour cette raison, on a essayé de trouver la dose sans un effet toxique.

L'étude de toxicologie a quant à elle démontré, qu'il n'y a apparition d'aucun signe délétère sur l'aspect physique des animaux, aucune modification de la texture et de l'architecture des organes étudiés pour la toxicité aiguë et subaiguë.

La toxicité aiguë montre des augmentations significatives des taux des paramètres rénaux et les paramètres de stress oxydatif chez les groupes traités par les doses 2000, 3000 et 5000 mg, kg.

L'extrait hydro-méthanolique de GO n'est pas une substance toxique sans seuil. Il admet un seuil de toxicité avec une DL_{50} qui indique que la toxicité est légère.

La toxicité subaiguë aussi montre des modifications sur le plan biochimique, hématologiques, histologique et le statut Redox particulièrement pour les concentrations 500 et 2 000 mg, kg, par contre aucune signe de toxicité pour les concentrations 125, 31.25 et 3.12 mg, kg.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vivo* ne constituent qu'une première étape dans l'évaluation de la toxicité de notre extrait étudié, des essais complémentaires seraient nécessaires pour confirmer les performances mises en évidence et il serait appréciable de développer les points suivants :

- Étude de toxicité sub-chronique des grignons d'olives pendant 90 jours, afin de déterminer les effets à moyen terme et long terme, d'évaluer la dose sans effet toxique.
- Étude de la toxicité chronique de grignon d'olive pendant un an ou deux ans, pour établir les normes de sécurité concernant l'exposition humaine.
- La purification et l'identification des molécules responsables de l'effet toxique.
- Etude de la cytotoxicité *in vitro* en utilisant des cultures cellulaires, et de la mutagénicité et de la cancérogénicité afin de mieux comprendre le profil de sécurité de cet extrait.

Chapitre IV

Etude de quelques activités biologiques de l'extrait des grignons d'olive

Le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété des médicaments potentiels, tout en étant accessible au plus grand nombre, y compris dans les pays en voie de développement ! De plus, cette science évolue et s'affine sans cesse avec l'amélioration des instruments d'investigation et de l'accès à l'information scientifique. La pharmacognosie et la phytochimie sont donc en totale adéquation avec les objectifs d'une recherche moderne des composés à visée thérapeutique.

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété des molécules biologiquement actives, c'est le cas de notre extrait des grignons d'olive qui est très riche en polyphénols.

Dans ce contexte, nous avons tenté d'évaluer l'activité anti-hémolytique et anti-inflammatoire de l'extrait brut et délipidé des grignons d'olive.

I- Activité anti-inflammatoire

I-1- L'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'organisme contre les agressions d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse, indispensable à son intégrité. Cette réponse immunitaire protectrice peut être parfois néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, des anomalies de régulation et de production des cellules intervenant dans l'inflammation (**John et al., 2021**). Bénéfique pour l'organisme, elle doit, pour atteindre son but, faire payer le prix au malade avec des symptômes pénibles, locaux (rougeur, chaleur, tumeur, douleur), généraux (fièvre, asthénie, anorexie, myalgies, torpeur...), et parfois dangereux (occlusion ou rupture d'une artère au cours d'une vascularite par exemple) (**Muster, 2005**).

I-2- Physiopathologie de l'inflammation

L'inflammation est le résultat de l'activation d'un ensemble complexe d'interactions entre des cellules et de facteurs sécrétés. Elle se développe dans tous les types tissulaires suite à un traumatisme physique (blessure, rayons UV), infectieux (virus, bactéries) ou chimique (toxiques). Cette réaction a pour but d'éliminer l'agent inflammatoire et de favoriser la cicatrisation du tissu atteint. Cependant, lorsque la réponse inflammatoire est exacerbée à cause d'une altération excessive du tissu ou d'une cicatrisation anormale (**Arulselvan et al., 2016 ; Singh et al., 2019**).

L'inflammation commence par une réaction de « reconnaissance » faisant intervenir certaines cellules de l'organisme (monocytes, macrophages, lymphocytes) ou des protéines circulantes

(anticorps, protéines du complément, facteur de Hageman...). À la phase de reconnaissance faite suite à la mise en jeu séquentiel de tout un ensemble de cellules et de médiateurs dont l'ordre d'intervention est complexe et variable. Certains médiateurs, comme les prostaglandines et les cytokines, sont produites par différents types cellulaires, agissent sur plusieurs types cellulaires et contrôlent parfois leur propre production par régulation rétroactive. C'est dire la complexité des mécanismes de la réaction inflammatoire, empêchant la description d'un schéma d'ensemble et obligeant à une description analytique et individuelle des cellules et des médiateurs qui la composent (**Weill et al., 2003**).

La réponse inflammatoire peut être divisée en trois phases (**Muster, 2005**) :

- Une phase d'initiation qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires.
- Une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires.
- Une phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé.

L'inflammation aiguë est une réponse immédiate et précoce à l'agression, elle se caractérise par l'importance des phénomènes vasculaires : exsudat, œdème, modification de la microcirculation et l'afflux de polynucléaires sur le site lésionnel. C'est le mode de réaction le plus classique aux infections, observé dans les salpingites, endométrites, abcès du sein... (**Weill et al., 2003**). L'inflammation chronique est une inflammation de durée prolongée au cours de laquelle évoluent simultanément une phase active, une destruction cellulaire et des tentatives de réparation. Elle se caractérise par un infiltrat inflammatoire mononucléé, de la fibrose avec angiogenèse, observé dans l'adénomyose, l'endométriose, la mastite extasiante... (**Calvino, 2023**).

Le processus inflammatoire est initié suite à l'interaction des produits microbiens avec les constituants de l'hôte, que ceux-ci soient des facteurs solubles (par exemple système du complément) ou des récepteurs membranaires (par exemple toll-like receptors). Dans ce dernier cas, la signalisation intracellulaire initiée à la surface de la cellule par les produits microbiens aboutit à la production de nombreux médiateurs solubles. Parmi ceux-ci, les cytokines pro-inflammatoires, et tout particulièrement l'interleukine (IL-1) et le tumor necrosis factor (TNF), orchestrent une cascade de médiateurs qui contribuent directement au processus inflammatoire. Parallèlement, des médiateurs anti-inflammatoires, tendant à limiter le processus inflammatoire, sont également produits. Si le sepsis est associé à une production exacerbée de la majorité d'entre eux, il faut garder en mémoire que la majorité des médiateurs

de l'inflammation sont essentiels à la mise en place de la réponse anti-infectieuse. Aussi, leur neutralisation totale pourrait s'avérer délétère pour maîtriser l'agression microbienne. Sans doute, l'aspect mi-ange, mi-démon de ces médiateurs rend compte des difficultés liées aux approches thérapeutiques qui cherchent à les neutraliser individuellement (**Dinarelo, 2010 ; Calvino, 2023**).

I-3- Le processus anti-inflammatoire

Les anti-inflammatoires permettent de lutter contre l'inflammation quelle que soit la cause de cette inflammation. Ce sont des traitements symptomatiques, c'est-à-dire qu'ils ne suppriment pas la cause de l'inflammation, mais seulement sa conséquence. Ils ont une action également sur la douleur. Il existe deux catégories, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), et les anti-inflammatoires stéroïdiens : les corticoïdes (**Hassan et al., 2022**).

I-3-1- Les anti-inflammatoire stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (corticoïdes ou glucocorticoïdes) constituent un ensemble de substances hormonales, soit d'origine naturelle, secrétée par la corticosurrénale, soit obtenues par semi-synthèse voire par synthèse totale. Ils se caractérisent sur le plan chimique par leurs structures stéroïdique et sur le plan pharmacologique par des propriétés essentiellement anti-inflammatoires d'où le nom qu'on leur donne : anti-inflammatoires stéroïdiens (**Kohler et al., 2016 ; Hassan et al., 2022**).

I-3-2- Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

Les AINS regroupent un ensemble de molécules présentant des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques, mais qui peuvent également engendrer des effets secondaires, parfois graves. Leur efficacité, comme leurs principaux effets secondaires sont liés à leur mécanisme d'action principal qui est une inhibition de la cyclo-oxygénase (COX), enzyme responsable de la biosynthèse des prostaglandines et du thromboxane. Les AINS classiques, c'est-à-dire non-sélectifs, inhibent les deux isoformes de la COX (COX-1 et COX-2), contrairement aux AINS sélectifs de la COX-2 (**Husain et al., 2017 ; Prozzi et al., 2018**). Les AINS sont très nombreux et ont prouvé leur efficacité pour lutter contre la douleur inflammatoire et l'inflammation. Leur efficacité sur la douleur et l'inflammation se manifeste rapidement en quelques heures ou quelques jours (**Husain et al., 2017**).

La prise des anti-inflammatoires présente souvent des risques gastro-intestinaux (ulcères gastroduodénaux, perforation, sténose), des risques rénaux tels que l'insuffisance rénale aiguë

et parfois des complications cardiaques, pour cette raison la recherche de nouvelles molécules médicales sans risques d'effets secondaires s'avère indispensable pour les traitements des sujets. C'est pourquoi, l'accent est de plus en plus mis sur la recherche de nouvelles molécules douées d'activités anti-inflammatoires dans les plantes médicinales (**Jhon et al., 2021**).

D'autre part, une certaine perte de confiance de la population vis-à-vis des médicaments de synthèse l'incite à se tourner vers des médications plus traditionnelles telles que la phytothérapie (**Azab et al., 2016**).

II- Hémolysse

II-1- Définition

Destruction des globules rouges (GR) arrivés au terme de leur vie circulatoire de 120 j associant à la libération puis au catabolisme de l'hémoglobine (**Loustau et al., 2011**). C'est un phénomène irréversible dû au vieillissement des GR, c'est donc une mort physiologique par sénescence. L'hémolyse est liée au vieillissement du GR et cette sénescence est marquée par la diminution de l'équipement enzymatique due à l'absence de renouvellement qui a pour conséquence la diminution de la protection de la membrane et l'Hb contre l'oxydation irréversible et la présence d'Hb oxydée (corps de Heinz) faciliterait leur phagocytose par les macrophages de la rate (**Vieira Junior et al., 2012 ; Kato et al., 2017**). Cette hémolyse est :

- Essentiellement intratissulaire (80 %) au niveau des macrophages de la rate, du foie et de la moelle osseuse
- Secondairement intravasculaire (10-20 %), par lyse osmotique des GR vieilliss.

Dans les conditions d'équilibre, l'hémolyse physiologique détruit chaque jour les GR les plus âgés et la moelle osseuse libère dans la circulation sanguine une quantité égale de GR (**Lippi et Plebani, 2019**).

II-2- Hémolysse pathologique

C'est la destruction précoce et exagérée des GR circulants. Elle sera responsable d'une anémie hémolytique (**Kato et al., 2017**) L'hémolyse pathologique peut se produire à l'extérieur ou à l'intérieur même de l'espace vasculaire. Ceci dépend du mécanisme causal et de la brutalité avec laquelle la membrane érythrocytaire est attaquée.

Les principaux facteurs qui déterminent la flexibilité d'un érythrocyte normal sont :

- Sa forme de disque biconcave, caractérisée par un rapport surface, volume favorable (à l'opposé, la sphère est la forme géométrique qui possède le plus petit rapport s, v);
- La flexibilité de sa membrane ;
- la fluidité de son contenu en Hb

Toute modification ou atteinte de l'un ou l'autre de ces facteurs est susceptible de rendre la cellule prématurément incapable de franchir les interstices du filtre splénique, responsable de sa séquestration et sa destruction précoce (**Sesti-Costa et al., 2023**).

Deux types d'hémolyse peuvent résulter du conflit entre l'anticorps, le complément et les hématies. Dans le premier, la phagocytose des complexes membrane-anticorps par les macrophages entraîne une réduction progressive de la surface membranaire des hématies, et l'apparition de sphérocytes à la déformabilité réduite qui sont voués à l'hémolyse principalement dans la rate (hémolyse dite « tissulaire »). Ce mécanisme, lorsqu'il est prépondérant, est à l'origine d'une splénomégalie progressive et d'un ictère à bilirubine libre (produit de digestion de l'hémoglobine par les macrophages) dont l'augmentation dans le sérum est parallèle à l'importance du processus hémolytique. Le deuxième mécanisme résulte d'une activation majeure du système complément et notamment d'un complexe lytique C5-C9 capable de détruire la membrane de l'hématie directement. Il en résulte une hémolyse dite intravasculaire, avec hémoglobinémie et hémoglobinurie. L'haptoglobine plasmatique libre (1 à 2 g, L) dont le rôle est de fixer l'hémoglobine libre plasmatique pour s'opposer à son élimination rénale, est donc diminuée. Ce signe est très sensible. Bien souvent, l'hémolyse emprunte aux deux mécanismes, même si l'un est prépondérant (**Leporrier, 2011**).

Matériel et méthodes

Ce chapitre porte sur l'étude des activités biologiques de l'extrait brut (non délipidé) et délipidé des grignons d'olive *in vitro* :

- Premièrement, la préparation des extraits hydro-éthanoliques et hydro-méthanoliques bruts et délipidés des grignons d'olive.
- Étude de la cytotoxicité *in vitro* pour les différents extraits.
- Étude de l'activité anti-hémolytique et anti-inflammatoire des différents extraits.

I-Obtention des extraits végétaux

10 g de la poudre brute des grignons d'olive et 10 g de la poudre délipidé des grignons d'olive ont été macérés dans 200 mL de mélange de solvants (éthanol : H₂O) et (méthanol : H₂O) (80 : 20) pendant 48 heures à température ambiante. Après filtration, les filtrats sont évaporés sous pression réduite à 45 °C dans un rotavapeur de type LABOROTA 4 000 (Heidolph) pour obtenir des résidus secs.



Figure 42 : Le résidu sec des grignons d'olive

II- 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 3 000 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 isosaline et utilisé immédiatement.

III- Étude des activités biologiques :

III-1- Test de cytotoxicité

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 37°C, pendant 30 min, ensuite centrifugé à 3 000 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 :

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

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

III-2- Évaluation 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 1,5 mL 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 %) est ajoutée à chaque concentration et une deuxième incubation est réalisée à 56 °C pendant 1 heure. Au final, les tubes sont refroidis sous l'eau courante et suivis par une centrifugation à 2 500 rpm pendant 5 min. 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.

III-3- Évaluation 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) composé 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 contrôle test (0,5 mL) composé de 0,45 mL de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 mL d'eau distillée (*test contrôle*).
3. La solution contrôle produit (0,5 mL) composé de 0,45 mL d'eau distillée et 0,05 mL d'extraits avec une concentration de 250 pg, mL (*contrôle*).
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*).

IV- Analyse statistique

Les variables étudiées ont été exprimées par moyenne \pm écart-type.

Le test ANOVA a été effectué pour comparer entre les moyennes, et pour tester l'effet des extraits et des doses des extraits sur la cytotoxicité, l'activité anti-hémolytique et l'activité anti-inflammatoire. Nous avons procédé à des régressions linéaires multiples pour vérifier l'association des extraits et des doses à la cytotoxicité, à l'activité anti-hémolytique et à l'activité anti-inflammatoire. La corrélation entre les doses d'une part et la cytotoxicité, l'activité anti-hémolytique et l'activité anti inflammatoire d'autre part a été étudiée par le test de corrélation de spearman. Une valeur de p-value inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

L'ensemble de ces tests statistiques ont été réalisés sur le logiciel Minitab 18.

Résultats et interprétation

I-1- Rendement d'extraction des extraits de grignons d'olive :

Extraction par 2 solvants à polarité différente (méthanol et éthanol) a permis d'obtenir quatre extraits ; deux délipidé et deux non délipidé (bruts) ayant un aspect pâteux de couleur allant de brune foncée au brune claire. Le rendement d'extraction a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec sous forme de poudre et les résultats ont été exprimés en pourcentage. Le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait brut *hydro-méthanolique* (9 %) suivi par l'extrait *délipidé hydro-méthanolique* (8.2 %) ensuite l'extrait brut *hydro-éthanolique* (8%) et enfin l'extrait *délipidé hydro-éthanolique* (7 %) possédant le plus faible rendement (tableau 21).

Tableau 23 : Couleur et rendement des différents extraits obtenus à partir des GO

Extrait	Couleur	Rendement
Brut hydro-méthanolique	Brune foncée	9%
Brut hydro-éthanolique	Brune claire	8%
Délipidé hydro-méthanolique	Brune foncée	8.2%
Délipidé hydro-éthanolique	Brune claire	7%

II- Évaluation des activités biologiques *in vitro* des extraits biologiques

II-1- Test de cytotoxicité

Le test *in vitro* de cytotoxicité représenté par le pourcentage d'hémolyse des globules rouges est effectué en utilisant des globules rouges d'un donneur sain en bonne santé (GR). Différentes concentrations de l'acide gallique (polyphénol de référence) et des extraits bruts et délipidé (méthanoliques et éthanoliques) des GO sont testés. 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 représente 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 un taux de 21.30 %, à la concentration de 250 µg, mL et un taux de 34 % à la concentration 500 µg, mL et atteint un maximum de 80 % à la concentration 1 mg, mL (figure 43).

Les extraits méthanoliques des GO brut et délipidé montrent un taux d'hémolyse des GR plus important, allant de 7 % à 8 % à la concentration de 250 µg, mL. Ce taux augmente encore avec la concentration de 500 µg, mL pour atteindre 43 % d'hémolyse. À la concentration de 1 mg, mL, le pouvoir de cytotoxicité contre les GR montre un taux d'hémolyse plus important (43 %) pour l'extrait brut (non délipidé). Concernant l'extrait délipidé, il montre un taux d'hémolyse plus important allant de 7 %, 9 %, 25 % jusqu'à 68 % aux concentrations 125, 250, 500 µg, mL. Les extraits éthanoliques brut des GO provoquent un taux d'hémolyse des GR de 6 % à la concentration de 250 µg, mL et de 12 % à la concentration de 500 µg, mL et 29 % à la concentration 1 mg, mL. Le taux d'hémolyse des GR est plus important avec les extraits éthanoliques des GO délipidés ; il est de 10 % à la concentration de 250 µg, mL et atteint 18 % d'hémolyse à la concentration de 500 µg, mL, et 30 % à la concentration de 1 mg, mL. De plus, les résultats montrent que les deux extraits éthanoliques et méthanoliques exercent un effet cytotoxique faible par rapport à l'acide gallique (molécule de référence) quelque soit la concentration utilisée (figure 44).

L'analyse des coefficients de corrélation montre que la cytotoxicité est significativement, positivement, très fortement et linéairement ($R^2 = 93,5\%$) liée aux extraits délipidés et bruts éthanoliques et méthanoliques ($P = 0,0001$) à leurs dose ($P = 0,0001$). La même intensité de corrélation est observée entre la cytotoxicité et l'acide gallique ($r = 0,972$; $p = 0,0001$).

0, 500 µg, mL et 1 mg, mL respectivement.

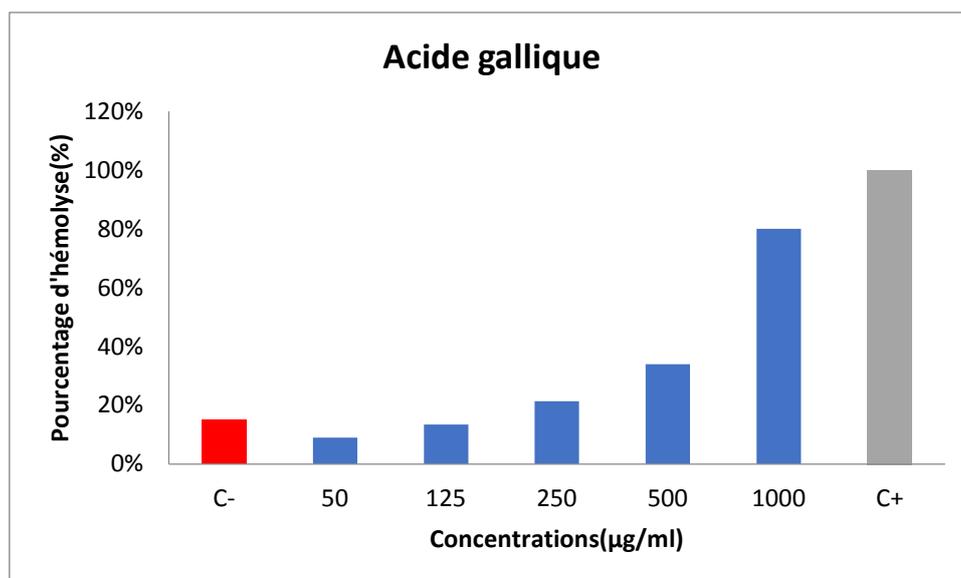


Figure 43. Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique C- : 15% ; C+ : 100%

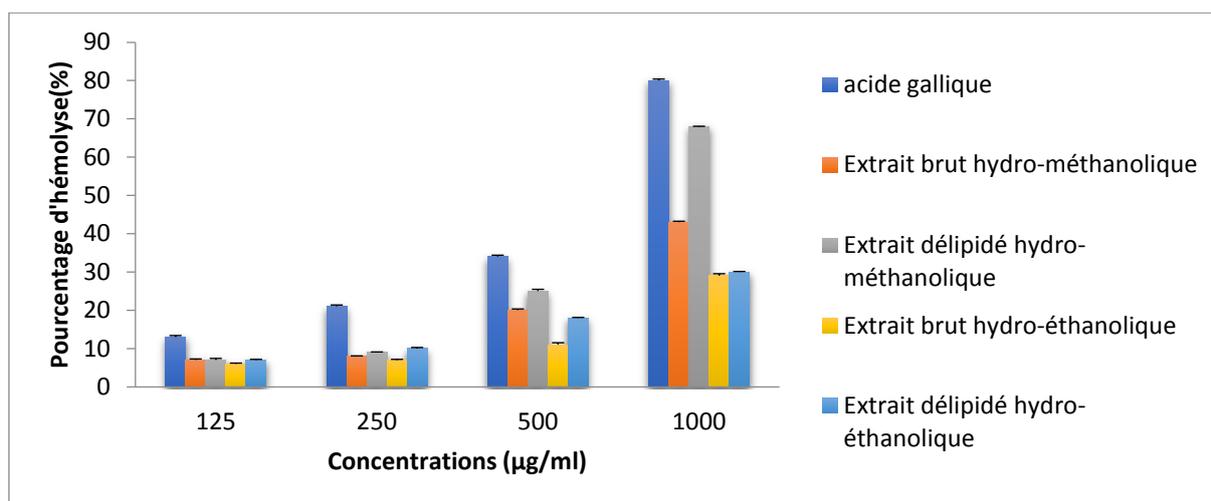


Figure 44: Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par les extraits méthanoliques et éthanoliques bruts et délipidé des grignons d'olive.

II-2- Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges)

Le modèle érythrocytaire a été largement utilisé pour vérifier l'indication directe de la toxicité de la membrane. Pour déterminer si l'activité cytotoxique est liée à un dommage direct sur la membrane ou non. 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 bruts et délipidé des GO et en les comparant à deux molécules de référence, à savoir le diclofénac qui est un médicament anti-inflammatoire non-stéroïdien et anti-hémolytique et l'acide gallique

étant un polyphénol à activité anti-hémolytique. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 45.

Nos résultats montrent que l'acide gallique à faible concentration de 10,30 et 75 μg , mL présente un effet anti-hémolytique, protecteur et stabilisateur des membranes des GR 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). 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.

Les données obtenues avec les extraits méthanoliques brut et délipidé des GO indiquent qu'ils présentent une activité importante (70 et 69.71 %) à faible concentration de 10 μg , mL. Cette activité stabilisatrice de la membrane des GR continue d'augmenter avec la concentration des extraits méthanoliques pour atteindre 79 et 74 % lorsque la concentration est de 150 et 300 μg , mL.

L'activité stabilisatrice de la membrane des GR continue aussi d'augmenter avec les extraits éthanoliques pour atteindre 80 % pour l'extrait brut des GO et 70 % pour l'extrait délipidé lorsque la concentration est de 300 μg , mL.

L'effet anti-hémolytique de nos extraits est par la suite comparé à celui de l'acide gallique et du diclofénac. Les résultats des extraits méthanoliques montrent un effet anti-hémolytique plus important que celui du diclofénac et l'acide gallique aux concentrations (10, 30,75 μg , mL) et presque identique à la concentration 300 μg ,mL comparant au diclofénac, mais supérieur à celui de l'acide gallique. Cet effet est presque identique avec l'extrait brut éthanolique, par contre L'extrait éthanolique de GO délipidé induit un effet anti-hémolytique plus important que celui du diclofénacà faible concentration (10, 30 et 75 μg , mL), mais l'effet devient plus faible à celui du diclofénacà forte concentration (150 et 300 μg , mL), et aussi inférieur à celui de l'acide gallique sauf à la concentration de 300 μg , mL où l'extrait éthanolique affiche un effet élevé par comparaison à celui de l'acide gallique à la même concentration (figure 45).

L'analyse des coefficients de corrélation montre que l'activité anti-hémolytique est liée significativement à la dose ($P=0,0001$) non aux extraits éthonolique et méthanoliques ($P>0,05$), cette liaison est positive linéaire relative forte ($R^2=51,8\%$). Pour l'acide gallique et le diclofénac, l'activité anti-hémolytique est significativement ($P=0,002$) linéairement liée

uniquement à la dose, mais cette liaison très faible ($R^2=34,8\%$). Nous avons constaté que l'activité anti-hémolytique dépend uniquement de la dose. En comparant avec l'acide gallique et le diclofénac, l'activité anti-hémolytique est significativement positivement et très fortement corrélée avec la dose du diclofénac ($r=0,983$; $p=0,0001$) ce qui est identique avec le résultat de corrélation entre l'activité anti hémolytique et la dose de l'extrait brut hydro-éthanolique, cependant, l'activité anti hémolytique n'est pas corrélée à la dose de l'acide gallique ($r=0,295$; $p=0,286$).

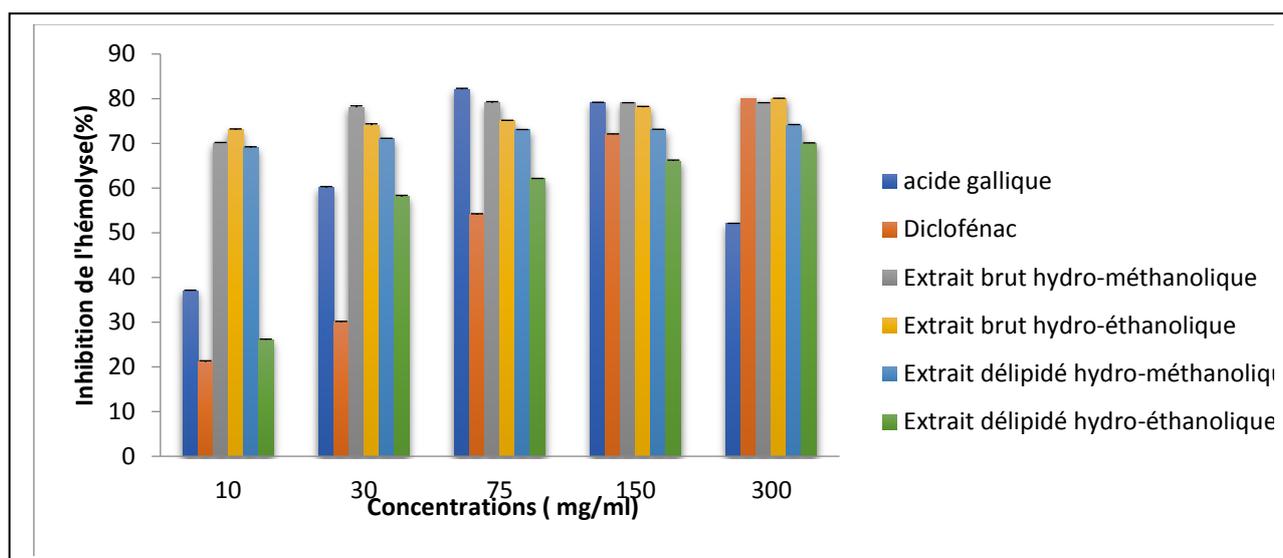


Figure 45 : Comparaison de l'activité anti-hémolytique entre l'acide gallique, diclofénac et les extraits méthanoliques et éthanoliques des grignons d'olive.

II-3- Activité anti-inflammatoire

La méthode de l'inhibition de la dénaturation protéique est la plus convenable pour l'évaluation *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire des extraits. La protéine utilisée pour ces tests est le sérum albumine bovine (SBA) et les résultats ont été comparés à ceux de diclofénac comme médicament standard.

Nos résultats montrent que le diclofénac tant qu'un médicament anti-inflammatoire standard assure une bonne inhibition de la dénaturation protéique, presque totale (se rapprochant de 100 %) à la concentration 250 μg , mL marquant ainsi son effet anti-inflammatoire (figure 46).

Pour les extraits bruts. 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. Cet effet reste toujours légèrement faible comparé au diclofénac pour les deux extraits. Par ailleurs les résultats obtenus avec les extraits délipidés

éthanolique et méthanolique indiquent un effet protecteur aussi important. Les extraits étudiés donnent un pourcentage d'inhibition égale à 99 % à la concentration de 250 µg, mL comparé à 89 % pour le diclofénac à la même concentration (tableau 22).

L'analyse des coefficients de corrélation de l'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques et méthanoliques, montre une liaison significative linéaire, relativement forte ($R^2=56,4\%$) entre l'activité anti inflammatoire d'une part et les extraits ($P=0,036$) ainsi que la dose ($P=0,002$) d'autre part. Et en fonction de dose du diclofénac, cette activité est significativement positivement linéairement très fortement ($R^2=92,1\%$) liée à la dose du diclofénac. On note une activité anti-inflammatoire très élevée des doses du diclofénac ($R^2=92,1\%$) par rapport aux doses des extraits éthanoliques et méthanoliques ($R^2=56,4\%$). Nous constatons que ces corrélations sont de la même nature que la corrélation entre l'activité anti-inflammatoire et la dose du diclofénac ($r=0,957$; $p=0,0001$).

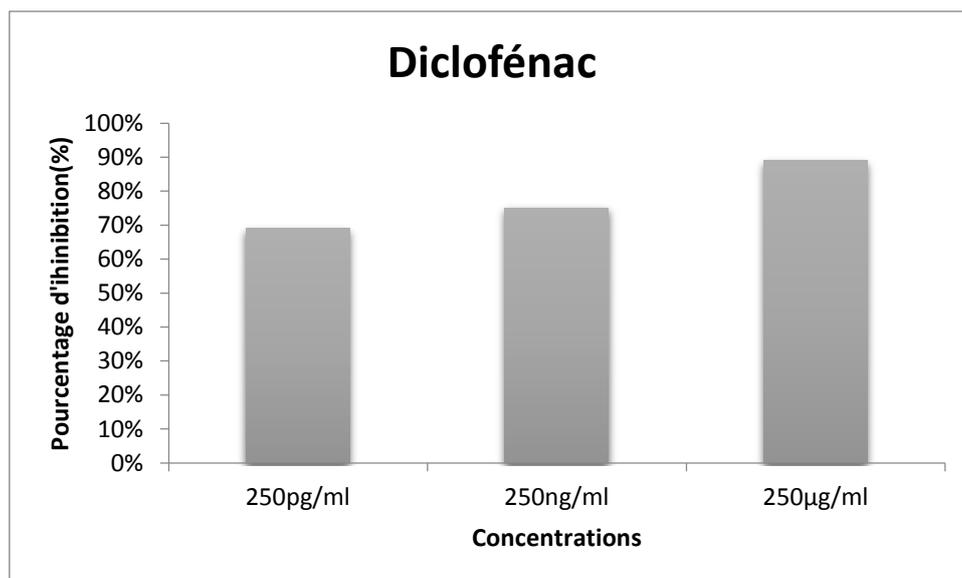


Figure 46 : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac.

Tableau 24 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits des GO

Extrait/Standard	Concentrations	Inhibition de dénaturation(%)
Diclofénac	250 µg/mL	89 ±0.05
	250 ng/mL	75 ± 0.03
	250 pg/mL	69 ± 0.23
EBM	250 µg/mL	75 ± 0.05
	250 ng/mL	67 ± 0.02
	250 pg/mL	42 ± 0.20
EDM	250 µg/mL	98 ± 0.07
	250 ng/mL	98 ± 0.02
	250 pg/mL	78 ± 0.02
EBE	250 µg/mL	81 ± 0.11
	250 ng/mL	74 ± 0.02
	250 pg/mL	59 ± 0.13
EDE	250 µg/mL	98 ± 0.07
	250 ng/mL	98 ± 0.04
	250 pg/mL	79 ± 0.08

EBM : Extrait brut hydro-méthanolique

EDM : Extrait délipidé hydro-méthanolique

EBE : Extrait brut hydro-éthanolique

EDE : Extrait délipidé hydro-éthanolique

Discussion

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques ; et actuellement, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays (**Ferrerres et al., 2021**).

Les grignons d'olive ; le déchet précieux de la production d'huile d'olive est très riche en fibres alimentaire, acides gras insaturés (oléique et linoléique), CP, source de mannitol, potassium et hydroxytyrosol ainsi d'autres ingrédients multifonctionnels (**Ribeiro et al., 2021**). C'est dans cette optique que s'inscrit le présent chapitre au cours de lequel nous avons étudié quelques activités biologiques des extraits bruts et délipidé des GO.

L'extraction est une étape très importante pour la mise en évidence des principes actifs des matières végétales étudiées et ainsi leur valorisation sur le plan thérapeutique (**Alara et al., 2021**). Dans le but d'extraire les principes actifs des GO, deux méthodes d'extraction sont adoptées : extraction au Soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant et extraction par macération en utilisant le méthanol, l'éthanol et l'eau distillée. Les résultats montrent que le rendement des extraits hydro-méthanoliques est supérieur à celui des extraits hydro-éthanoliques pour les GO délipidé et non délipidé ; c'est dû à la polarité des solvants utilisés qui influencent sur l'extraction des composés phytochimiques et la solubilité de ces composés dans le solvant et plusieurs études montrent que l'utilisation de méthanol, eau (80 : 20 v, v) est plus efficace pour récupérer les CP et avoir un meilleur rendement par rapport à l'éthanol (**Sultana et al., 2009 ; Alara et al., 2021**).

De puis les années 1970, les chercheurs dans le domaine médical ont essayé de trouver des tests pour assurer l'utilisation des nouveaux produits thérapeutiques ; et le test le plus préféré c'est la cytotoxicité *in vitro* car c'est un test simple avec une sensibilité très élevée en utilisant des globules rouges (**Li et al., 2015**). La cytotoxicité significative des extraits méthanoliques brut et délipidé due à la présence de méthanol, car ce dernier est plus toxique à forte dose par rapport à l'éthanol et peut causer une nécrose cellulaire en modifiant la morphologie, le cytoplasme, et même le noyau (**Joshi et Adhikari, 2019 ; Le Dare et al., 2019**). Ainsi la cytotoxicité des extraits délipidés des GO peut s'expliquer par la présence des CP avec un teneur élevé par rapport aux extraits non délipidé. Les dosages phytochimiques indiquent clairement ces résultats ; et la présence des polyphénols à forte dose 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, aussi la protection contre l'hémolyse de la membrane érythrocytaire augmente avec la lipophilie de la molécule, c'est-à-dire la capacité de pénétrer la membrane (**Marozien et al., 2000 ; Galati et al., 2002**). En plus l'huile du GO contient des molécules importantes qui peuvent protéger la cellule telle que l'hydroxytyrosol (**Morato et al., 2015**). Ces résultats sont toujours faibles par rapport à l'acide gallique (polyphénols de référence) dans toutes les concentrations utilisées surtout à 1mg, mL.

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**). En outre la mutilation oxydative des lipides et protéines membranaires, certains médicaments, les rayonnements, l'hémoglobinopathie... sont parmi les causes de l'hémolyse érythrocytaire (**Afsar et al., 2016**).

Dans notre étude, les extraits des grignons d'olive brut et délipidé inhibent la lyse induite par l'hypotonie de la membrane érythrocytaire en présentant un effet de stabilisation de la membrane car ces extraits sont riches en CP qui 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 pression osmotique due à la présence d'ions ; de plus, le CP inhibe la polymérisation de l'hémoglobine en s'engageant dans une réaction avec cette protéine qui serait compétitive avec la polymérisation empêchant la peroxydation des lipides membranaires et prévenir ainsi la lyse des érythrocytes. Ils peuvent aussi stabiliser l'hémoglobine en augmentant son affinité pour l'oxygène et favoriser un meilleur apport d'eau au niveau érythrocytaire (**Ngbolua et al, 2012 ; Zhang et al., 2019**).

Les résultats montrent aussi que les extraits méthanoliques ont un effet anti-hémolytique important par rapport aux extraits éthanoliques ; c'est dû à la polarité de solvant utilisé (**Asfar et al., 2016**). Par ailleurs, nous avons remarqué que les extraits délipidés présentent un effet anti-hémolytique faible en comparant aux extraits bruts. D'après **Merah et al. (2020)**, l'étape de délipidation entraînerait une perte des molécules liposolubles présentant des propriétés antioxydants : des polyphénols, mais vraisemblablement aussi des molécules comme les vitamines E et A présentant un caractère amphiphile et, ou lipophile. Cette activité anti-hémolytique de nos extraits était comparée à l'acide gallique et au diclofénac. Plusieurs études montrent l'effet anti-hémolytique de diclofénac avec ces propriétés tensioactives en

intégrant avec les lipides membranaires des érythrocytes et conduisant à la solubilité de sa structure (**Bukara et al., 2016**).

L'inflammation est souvent associée à des douleurs dont le soulagement nécessite des anti-inflammatoires non-stéroïdiens et des corticostéroïdes, mais l'utilisation à long terme de ces médicaments est néfaste, pouvant inclure des troubles gastriques et digestifs sévères, des problèmes hépatiques et rénaux. Pour cela, les extraits phénoliques sont la cible des recherches pour développer des anti-inflammatoires naturels sans un effet toxique (**Quamar et al., 2021**).

La dénaturation des protéines est un processus pathologique par lequel les protéines perdent leur configuration et deviennent inactives. Il est prouvé que la prévention de la dénaturation des protéines est faite par les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (**García-Lafuente et al., 2014 ; Quamar et al., 2021**).

Pour cette raison, l'effet anti-inflammatoire des extraits bruts et délipidés des GO a été évalué par la méthode de dénaturation de la BSA et les résultats ont été comparés à ceux de diclofénac comme médicament standard.

D'après les résultats, nous constatons que tous nos extraits des GO sont capables d'empêcher l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines et peuvent contrôler la production d'auto-antigènes provenant de la dénaturation des protéines. Cependant, les extraits délipidés méthanolique et éthanolique ayant un fort pouvoir inhibiteur de la dénaturation protéique (98 %) à la concentration 250 µg, mL comparés au diclofénac (89 %) donc sont capables de contrôler la production d'auto-antigènes via la richesse de l'extrait délipidé en flavonoïdes et en tannins qui, avec leurs groupements hydroxyles inhibent la libération des constituants des lysosomes des neutrophiles au niveau des sites de l'inflammation (**Maguergue et al., 2022**). En outre, le CP peut contrôler la transcription et la sécrétion des cytokines inflammatoires (IL1, IL6, TNF α et interféron C) (**Shankaran et al., 2017**).

Cette activité anti-inflammatoire des GO est due à la présence d'érythrodiol (triterpènes pentacyclique majeur dans les GO) (**Shen et al., 2020**) et à l'acide maslinique qui présente un effet antiarthritique très important et aide à soulager le syndrome locomoteur d'après **Shumazu et al. (2019)**. En outre, **Di Nuzio et al. (2018)** ont démontré que l'extrait des GO est capable de réduire significativement la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8

dans des cellules Caco-2. Ainsi **Alimenti C. et al.** (2023) ont rapporté l'effet anti-inflammatoire de tyrosol et hydroxytyrosol, CP des GO au niveau digestif.

Conclusion

Le présent chapitre s'inscrit dans le cadre de la valorisation de l'extrait des grignons d'olive à des fins thérapeutiques par la détermination de quelques activités biologiques *in vitro*.

Cette étude nous a permis d'obtenir des résultats intéressants sur l'activité anti-hémolytique et anti-inflammatoire de l'extrait hydro-méthanolique et hydro-éthanolique des GO.

Nos résultats montrent que nos extraits sont toxique à la concentration 1 mg,mL surtout l'extrait hydro-méthanolique délipidé. Cependant, ils sont faiblement toxiques à la concentration 125 et 250 µg, mL puisqu'ils induisent une faible hémolyse, et ces résultats sont toujours faibles par rapport à l'acide gallique.

L'effet anti-hémolytique des extraits des GO réalisé sur les érythrocytes humain donne des bons résultats avec un pourcentage d'inhibition très important et assure une stabilité de la membrane érythrocytaire par apport aux molécules de référence, à savoir l'acide gallique et diclofénac.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits des GO montre que ce résidu possède un pouvoir pharmacologique. Cette activité est comparable à celle de diclofénac qui est un anti-inflammatoire de référence. Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que les extraits délipidés et bruts des GO exercent une inhibition de la dénaturation des protéines importante.

Il serait intéressant donc de poursuivre ce travail par des perspectives qui consistent en :

- Evaluation d'autres activités biologiques des différentes parties du GO *in vitro* et *in vivo*.
- Identification de la molécule responsable des activités précédentes.
- Détermination de la dose thérapeutique de la molécule bioactive.
- Réalisation des tests de cytotoxicité sur d'autre type des cellules (culture cellulaire).



Conclusion Générale

Conclusion Générale

L'obésité est une maladie chronique complexe dans laquelle la graisse corporelle anormale ou excessive nuit à la santé, augmente le risque de complications médicales à long terme et réduit la durée de vie. Elle résulte de l'interaction complexe de nombreux facteurs génétiques, métaboliques, comportementaux et environnementaux, et ces derniers seraient la cause la plus probable de l'accroissement substantiel de sa prévalence. Cependant, l'obésité est un état hétérogène et ainsi, l'accumulation intra-abdominale de tissu adipeux a un impact plus important sur le développement des facteurs de risque cardio-métaboliques et des répercussions notables sur le profil lipidique. La disponibilité accrue d'acides gras libres, la libération des cytokines pro-inflammatoires et les adipokines du tissu adipeux, la résistance à l'insuline hépatique, l'inflammation, un stress oxydatif chronique, et la dyslipidémie qui en résulte sont parmi des nombreux troubles métaboliques associés à cette affection. Une alimentation hypocalorique représente toujours l'étape principale et essentielle du traitement de l'obésité, associée à une activité physique accrue et à des changements de style de vie. Le régime méditerranéen représente l'outil le plus répandu pour réduire le poids chez les personnes obèses à base d'huile d'olive qu'est une source des acides gras mono-insaturés. L'extraction d'huile d'olive génère un sous produit très riche en CP qu'est le grignon d'olive. La récupération et la valorisation de sous produit à des fins thérapeutiques peut constituer une alternative intéressante améliorant ainsi le rendement de l'oléiculture et à la fois contribuer à la préservation de l'environnement.

L'objectif principal de notre travail de recherche est de valoriser les déchets de l'extraction d'huile d'olive, en particulier les grignons d'olive dans le traitement d'obésité in vivo et d'autres activités biologiques in vitro, avec une étude de toxicité in vivo et in vitro afin de déterminer l'activité pharmacologique de notre extrait hydro-méthanolique du GO. Ce déchet précieux présente plusieurs effets thérapeutiques tels que l'activité anti-inflammatoire, anti-oxydante, effet hypolipidémiant, hypoglycémiant, etc. Ces activités biologiques sont dues à la richesse du GO en hydroxytyrosol, en acides phénoliques tels que l'acide caféique, acide gallique, acide vanillique, acide cinnamique, acide férulique et en flavonoïdes.

Dans la première partie, nous avons étudié la caractérisation phytochimique de l'extrait hydro-méthanolique du GO, en réalisant pour la première étape une analyse comparative de l'extrait délipidé et non-délipidé du GO. Le screening phytochimique démontre une composition riche et variée en métabolites secondaires dans notre extrait.

L'analyse phytochimique quantitative démontre que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes sont nettement plus élevées pour l'extrait délipidé, tandis que les tanins condensés sont importants dans l'extrait non-délipidé. L'étude du pouvoir antioxydant du GO

Conclusion Générale

révèle que l'extrait délipidé a la plus grande activité de piégeage des radicaux libres et de réduction du fer par rapport à l'extrait non-délipidé.

L'étude de l'effet d'extrait brut hydro-méthanolique du GO sur l'obésité chez le rat montre des résultats intéressants :

- La consommation de régime cafétéria riche en calorie provoque un surpoids associé d'une accumulation des lipides et des protéines qu'induisent une obésité chez le rat, plus une élévation de taux du glucose et une résistance de l'insuline, Ce régime provoque une hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie, une augmentation des protéines totales, des transaminases et une les paramètres rénaux plasmatiques chez les rats obèses. Concernant le statut redox, les résultats obtenus montrent que les rats obèses présentent un stress oxydatif intense caractérisé par une augmentation de la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines mais aussi par une diminution des capacités de défenses anti-oxydantes telles que le GSH, SOD, la catalase et même la vitamine C. Chez ces rats obèses, le stress oxydatif intracellulaire affiche une certaine gravité puisqu'il touche tous les organes et peut être à l'origine de lésions tissulaires.

- L'administration de 200 mg, kg d'extrait hydro-méthanolique brut des GO pendant un mois présente un effet hypolipidémiant très important au niveau plasmatique et tissulaire avec une augmentation de HDLc. En outre, notre extrait montre une activité anti-oxydante très importante en renforçant le système enzymatique de défense érythrocytaire, et même au niveau des organes (foie, rein, rate, intestin, tissu adipeux, muscle).

- L'examen microscopique des coupes histologiques du foie, rein et tissu adipeux confirme tous ces résultats, en montrant une amélioration au niveau des cellules, telles que la diminution de l'inflammation au niveau des hépatocytes et la correction de l'architecture des adipocytes.

Les tests de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait délipidé et non-délipidé du GO révèlent des résultats intéressants surtout les extraits délipidés (EDE et EDM) qui présentent un effet protecteur de la dénaturation des protéines par rapport aux extraits bruts EBE et EBM.

L'évaluation du pouvoir anti hémolytique des globules rouges des extraits délipidés et non-délipidés contre le H₂O₂ a révélé que les extraits EBM et EDM présentent le meilleur effet, tandis que l'extrait EDE a enregistré le plus faible effet inhibiteur à les concentrations 30, 75, 150 et 300 µg, mL.

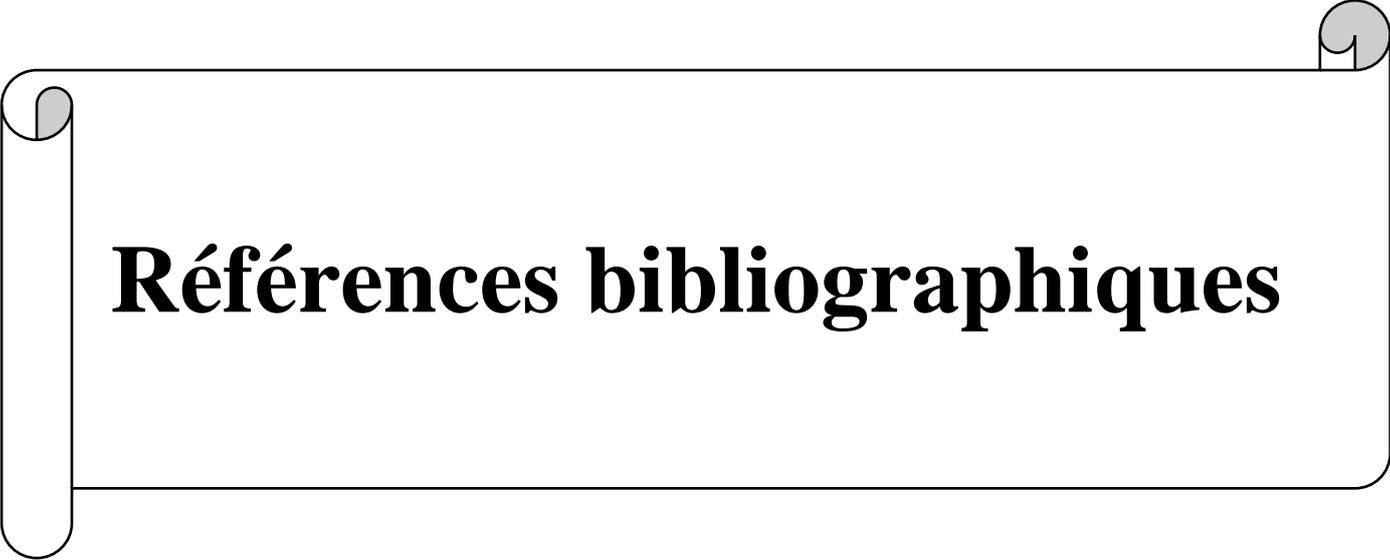
L'étude de la toxicité a révélé que l'extrait hydro-méthanolique brut du GO n'a pas causé de mortalité ou d'autres signes de toxicité. La toxicité aiguë montre que notre extrait est presque non toxique avec une DL₅₀>5000 mg, kg. Il ne montre aucun effet délétère sur le foie.

Conclusion Générale

Par contre à la dose 2000, 3000 et 5000 mg, kg PC, on note une augmentation de la créatinine et l'urée chez les rates après 14 jours d'administration unique de l'extrait avec une inflammation au niveau médullaire des reins. En outre la toxicité subaiguë de notre extrait après l'administration orale de la dose 3.12, 31.25, 125, 500 et 2000 mg, kg PC montre des perturbations sur le plan biochimique, hématologique et même histologique pour les doses 500 et 2000 mg, kg PC.

On conclut donc que les résultats obtenus à travers ce travail de doctorat sont très favorables pour la valorisation des GO, vu sa richesse en molécules bioactives qui agissent en synergie et dans plusieurs sites d'action. C'est une source non négligeable des CP qu'il faut utiliser et d'une autre part on diminue leur effet polluant sur l'environnement.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie pour isoler, purifier et identifier les molécules responsables des activités précédentes, en élucidant les mécanismes d'action sur les systèmes pro-oxydant-antioxydants *in vivo*, l'activité anti-inflammatoire, l'activité anti-hémolytique, les enzymes et les molécules impliquées dans le traitement des complications liés à l'obésité et enfin élargir le spectre d'activité. Cependant, les recherches effectuées sont encore très en amont d'une éventuelle application clinique, qui nécessite des travaux complémentaires.



Références bibliographiques

Introduction Générale

- Bendi Djelloul MCE, Belkherroubi L (2022). Quality control and labeling compliance of some olive oils marketed in Tlemcen. *ASJP*. 9(2):96-115.
- Boccellino M, D'Angelo S (2020). Anti-Obesity Effects of Polyphenol Intake: Current Status and Future Possibilities. *Int J Mol Sci*. 21(16):5642.
- De Lima Cherubim DJ, Buzanello Martins CV, Oliveira Fariña L, da Silva de Lucca RA (2020). Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J Cosmet Dermatol*. 19(1):33-37.
- De Martino A, Iorio M, Prenzler PD, Ryan D, Hassan K. Obied, Arienzo M (2013). Adsorption of phenols from olive oil waste waters on layered double hydroxide, hydroxyaluminium–iron-co-precipitate and hydroxyaluminium–iron–montmorillonite complex. *Applied Clay Science*. 81:154-161.
- Fortunato IM, Dos Santos TW, Ferraz LFC, Santos JC, Ribeiro ML (2021). Effect of Polyphenols Intake on Obesity-Induced Maternal Programming. *Nutrients*. 13;13(7):2390.
- Jiang TA (2019). Health Benefits of Culinary Herbs and Spices. *J AOAC Int*.102(2):395-411.
- Mojzer E B, Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*.21 (7):901.
- M'sadak Y, Makhoul M., El Amrouni S (2015). Évaluation qualitative et possibilités de valorisation biologique de la biomasse oléicole reprise dans le Sahel Tunisien, *Journal of New Sciences*. 18(4) :2286-5314.
- Murakami A (2022). Novel mechanisms underlying bioactivities of polyphenols via hormesis. *Current Opinion in Toxicology*. 30: 100337.
- Puig-Gamero M, Parascanu MM, Sánchez P, Sanchez-Silva L (2021). Olive pomace versus natural gas for methanol production: a life cycle assessment. *Environ Sci Pollut Res Int*. 28(23):30335-30350.
- Rajendran N, Gurunathan B, Han J, Krishna S, Ananth A, Venugopal K, Sherly Priyanka RB (2021). Recent advances in valorization of organic municipal waste into energy using biorefinery approach, environment and economic analysis. *Bioresour Technol*.337:125498.
- Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem*.383:132531.
- Singh M, Thrimawithana T, Shukla R, Adhikari A (2020).Managing Obesity through Natural Polyphenols. A Review, *Future Foods*. 1-2:2666-8335.

Senani N, Moulti-Mati F (2012). Etude du pouvoir antifongique des extraits phénoliques issus des margines de la variété chamlal (*olea europea*) sur deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. *Tunisian Journal Medicinal Plants and Natural Products*. 8(1):44-48.

Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Huanbiao Mo, Shastri A, Su R, Bapat P, Kwun I, Shen C-L (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 25(1):1-18.

Zeggwagh AA, Lahlou Y, Bousliman Y (2013). Enquête sur les aspects toxicologiques de la phytothérapie utilisée par un herboriste à Fes, Maroc. *Pan Afr Med J*. 14:125.

Zhang Y, Balasooriya H, Sirisena S, Ken N (2023). The effectiveness of dietary polyphenols in obesity management: A systematic review and meta-analysis of human clinical trials. *Food Chemistry*. 404(Pt B):134668.

Chapitre I

Aliakbarian B, Palmieri D, Casazza AA, Palombo D, Perego P (2012). Antioxidant activity and biological evaluation of olive pomace extract. *Nat Prod Res*. 26(24):2280-90.

ANAT (2010). Plan d'Aménagement du Territoire de la Wilaya de Tlemcen. Phase 1 Evaluation Territoriale. 257p.

Belmamoun AR, Mhamdia C, Ammam A, Baki A, Chadli R, Benmaissa H (2023). Phytochemical Screening of Methanolic Extract of *Urtica dioica* L: Antioxidant and Antimicrobial Power for Food Safety. *Egypt. Acad. J. Biol. Sci. (C. Physiology and Molecular biology)*. 15(1):27-34.

Bemoussat A, Adjim M, Bensaoula F (2019). Irrigation with treated wastewaters and the protection of Hennaya groundwater – Tlemcen, Algeria. *Journal of Water and Land Development*. 43:19-27.

Ben Miled DD, Smaoui A, Zarrouk M, Chérif A (2000). Do extraction procedures affect olive oil quality and stability? *Biochem Soc Trans*. 28 (6):929-33.

Bentabet N, Boucherit Otmani Z, Boucherit K (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*. 12:364– 371.

BenYahia N, Zein KA (2003). Special look at the waste problems of the olive oil industry and the latest viable solutions. 2nd International Conference, Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II) January: Lausanne, Swiss. 28–29.

Bermúdez-Oria A, Rodríguez-Juan E, Rodríguez-Gutiérrez G, Fernández-Prior Á, Fernández-Bolaños J (2021). Effect of the Olive Oil Extraction Process on the Formation of Complex

Références Bibliographiques

Pectin–Polyphenols and Their Antioxidant and Antiproliferative Activities. *Antioxidants*.10 (12):1858.

Cap sur région (2021). Oléiculture à Tlemcen. Capdz.dz.

<https://capdz.dz/2021/10/17/oleiculture-a-tlemcen-une-production-de-773-000-quintaux-dolives-attendue/>

Cepo DV, Radic K, Jurmanovic S, Jug M, Rajkovic MG, Pedisic S, Moslavac T, Albahari P (2018). Valorization of Olive Pomace-Based Nutraceuticals as Antioxidants in Chemical, Food, and Biological Models. *molecules*. 23(8):2070.

Cherrad H , Bouderbala S (2019) .Les grignons d'olive diminuent la glycémie et améliorent l'activité antioxydante tissulaire, chez le rat rendu diabétique par injection à la streptozotocine. *Nutrition clinique et métabolisme*. 33:4–114.

Contreras MDM, Gómez-Cruz I, Romero I, Castro E (2021). Olive Pomace-Derived Biomasses Fractionation through a Two-Step Extraction Based on the Use of Ultrasounds: Chemical Characteristics. *Foods*.10 (1):111.

De Bruno A, Romeo R, Francesca LF, Sicari A, Piscopo A, Poiano M (2018). L. Antioxidant activity shown by olive pomace extracts, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 53:8.

Difonzo G, Troilo M, Squeo G, Pasqualone A, Caponio F (2020). Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods - a review. *J Sci Food Agric*.101 (1):15-26.

Direction de la Production Végétale (DPV) (2009) Brochure technique Ministère de l'Agriculture Rabat, Maroc.

Ducom G, Gautier M, Pietraccini M, Tagutchou J-P, Lebouil D, Dumont N, Gourdon R (2019). Caractérisation de grignons d'olives en vue d'une valorisation thermo-chimique par gazéification. *Environnement, Ingénierie et Développement*. 82.

Gómez-Cruz I, Contreras MDM, Carvalheiro F, Duarte LC, Roseiro LB, Romero I, Castro E (2021). Recovery of Bioactive Compounds from Industrial Exhausted Olive Pomace through Ultrasound-Assisted Extraction. *Biology (Basel)*.10(6):514.

Gori A, Boucherle B, Rey A, Rome M, Fuzzati N, Peuchmaur M (2021). Development of an innovative maceration technique to optimize extraction and phase partition of natural products. *Fitoterapia*.148:104798.

Hadjloune H, Kihal O, Ahcène K, Belhouadjeb A (2021). Quel avenir pour la filière huile d'olive fraîchement introduite dans une zone steppique ? Cas de la région de M'Sila. *New Medit*. 20: 125-140.

Références Bibliographiques

- Harborne JB (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman & Hall Thomson Science (UK). 3^{ème} ed: 203-234.
- Hayes JE, Stepanyan V, Allen P, O'Grady MN, Kerry J P (2011). Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. *LWT- Food Science and Technology* 44(1):164–172.
- Karagözler A, Erdag CS, Çalmaz Emek Y (2008) Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chem.* 111: 400–7.
- Karumi Y, Onyeyili PA, Ogugbuaja VO (2004). Identification of active principes of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Scien.* 4: 179- 182.
- Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Vincieri FF, Romani A (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem.* 99: 464-469.
- Khelfaoui M, Hamidi Y (2018). Contribution de l'entrepreneuriat durable à la promotion des produits de terroir (PDT) en Algérie cas de la filière oléicole de la région de Tizi-Ouzou. *International Journal ESMB.* 14 :85-95.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Tian Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry.* 102: 771-776.
- Liu J, Sun H, Shang J, Yong Y, Zhang L (2011). Effect of olive pomace extracts on hyperlipidaemia. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters.* 25:12.
- Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*). *Revue « Nature & Technologie ».* B- Sciences Agronomiques et Biologiques. 9 : 35-40.
- Martínez C, Jiménez A, Garrigós MC, Valdés A (2023). Oxidative Stability of Avocado Snacks Formulated with Olive Extract as an Active Ingredient for Novel Food Production. *Foods.* 12(12):2382.
- Mateos R, Sarria, Bravo L (2020). Nutritional and other health properties of olive pomace oil. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 60:20.
- Mouzaoui K, Yazzag L, Moulti-Mati F (2014). Composés phénoliques des grignons d'olive provenant d'huileries traditionnelle et moderne : Essai de purification de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol. *Sciences et Technologie.* 40 :9-15.
- Nefzaoui A (1988). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. *Olivae.* 19:17-21.

Références Bibliographiques

- Nunes MA, Palmeira JD, Melo D, Machado S, Lobo JC, Costa ASG, Alves RC, Ferreira H, Oliveira MBPP (2021). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of a New Olive Pomace Functional Ingredient. *Pharmaceuticals*.14: 913.
- Ribeiro TB, Oliveira AL, Costa C, Nunes J, Vicente AA, Pintado M (2020). Total and Sustainable Valorisation of Olive Pomace Using a Fractionation Approach. *Appl. Sci.* 10(19): 6785.
- Sahin Ozkan K, Ketenoglu O, Yorulmaz A, Tekin A (2019). Utilization of molecular distillation for determining the effects of some minor compounds on the quality and frying stability of olive pomace oil. *J Food Sci Technol.* 56(7):3449-3460.
- Samarth MR, Panwar M, Kumar M, Soni A, Kumar M, Kumar A (2008). Evaluation of antioxidant and radical – Scavenging activities of certain radio protective plant extracts. *Food Chem.* 106: 868- 873.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Sci Food Agr.*76: 270.
- Seddiki Y, Moreira da Silva H, Moreira da Silva F (2017). Antioxidant Properties of Polyphenols and Their Potential Use in Improvement of Male Fertility: A Review. *J Sci & Tech Res.* 1(3).
- Sidhoume M, Gaouar S (2017). Diversité oléicole dans la Wilaya de Tlemcen. 52p.
- Tapia-Quirós P, Montenegro-Landívar MF, Vecino X, Alvarino T, Cortina JL, Saurina J, Granados M, Reig M (2022). A green approach to phenolic compounds recovery from olive mill and winery wastes. *Science of The Total Environment.* 835.
- Trease GE, Evans WC (1989). A textbook of Pharmacognosy (13th edition) BacilluereTinal Ltd, London.
- Turkoglu A, Duru ME, Mercan N, Kivrak I, Gezer K (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry.* 101, 267–273.
- Uğurlu M, Kula I (2007). Decolourization and removal of some organic compounds from olive mill wastewater by advanced oxidation processes and lime treatment. *Environ Sci Pollut Res Int.*14(5):319-25.
- Verge-Mèrida G, Solà-Oriol D, Tres A, Verdú M, Farré G, Garcés-Narro C, Barroeta AC (2022). Olive pomace oil and acid oil as alternative fat sources in growing-finishing broiler chicken diets. *Poult Sci.*101(10):102079.
- Vidal AM, Moya M, Alcalá S, Romero I, Espínola F (2022). Enrichment of Refined Olive Oils with Phenolic Extracts of Olive Leaf and Exhausted Olive Pomace. *Antioxidants (Basel).* 11(2):204.

Références Bibliographiques

Volpe MG, De Cunzo F, Siano F, Paolucci M, Barbarisi C, Cammarota G (2014). Influence of extraction techniques on physical-chemical characteristics and volatile compounds of extra virgin olive oil. *J Oleo Sci.*63(9):875-83.

Ying D, Hlaing MM, Lerisson J, Pitts K, Cheng L, Sanguansri L, Augustin MA (2017). Physical properties and FTIR analysis of rice-oat flour and maize-oat flour based extruded food products containing olive pomace. *Food Res Int.*100 (Pt 1):665-673.

Yue Y, Qiu ZD, Qu XY, Deng AP, Yuan Y, Huang LQ, Lai CJ (2018). Discoursing on Soxhlet extraction of ginseng using association analysis and scanning electron microscopy. *J Pharm Anal.* 8(5):312-317.

Zhao H, Avena-Bustillos RJ, Wang SC (2022). Extraction, Purification and In Vitro Antioxidant Activity Evaluation of Phenolic Compounds in California Olive Pomace. *Foods.* 11(2):174.

Zhao H, Kim Y, Roberto J, Bustillos A, Nitin N, Selina CW (2023). Characterization of California olive pomace fractions and their in vitro antioxidant and antimicrobial activities. *LWT.* 180:114677.

Chapitre II

Abu Bakar Sajak A, Mediani A, Maulidiani, Mohd Dom NS, Machap C, Hamid M, Ismail A, Khatib A, Abas F (2017). Effect of Ipomoea aquatica ethanolic extract in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats via ¹H NMR-based metabolomics approach. *Phytomedicine.* 36:201-209.

Acar-Tek N, Ağagündüz D (2020). Olive Leaf (*Olea europaea* L. folium): Potential Effects on Glycemia and Lipidemia. *Ann Nutr Metab.*76(1):10-15.

Aebi H (1974). Catalase. In: Bergmeyer, H.U., Ed., *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie/Academic Press Inc., Weinheim/New York.673-680.

Ali SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, Khan FH (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem.*44 (3):e13145.

Alkadi H (2020). A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets.* 20(1):16-26.

Apovian CM, Mechanick JI (2013). Obesity IS a disease!. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 20(5):367-8.

Averill-Bates DA (2023). The antioxidant glutathione. *Vitam Horm.*121:109-141.

Références Bibliographiques

- Banse HE, Frank N, Kwong GP, McFarlane D (2015). Relationship of oxidative stress in skeletal muscle with obesity and obesity-associated hyperinsulinemia in horses. *Can J Vet Res.*79(4):329-38.
- Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Ragni M, Nisoli E (2018). Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord.* 23(2):149-157.
- Basdevant A, Clément K, Oppert JM (2014). Vers de nouveaux phénotypes et de nouvelles nosographies : de l'obésité aux maladies du tissu adipeux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* 8 : 234-243.
- Bates S, Bayley T, Norman P, Breeze P, Brennan A (2020). A Systematic Review of Methods to Predict Weight Trajectories in Health Economic Models of Behavioral Weight-Management Programs: The Potential Role of Psychosocial Factors. *Med Decis Making.* 40(1):90-105.
- Baudin B (2020). Doser les enzymes du stress oxydant, oui ou non ? *Revue Francophone Des Laboratoires.* 522 : 62–65.
- Bensakhria A (2018). Le stress oxydatif. *Toxicologie générale.* 70-86.
- Berberich AJ, Hegele RA (2022). A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr Rev.* 43(4):611-653.
- Ben Salem M, Affes H, Ksouda K, Dhouibi R, Sahnoun Z, Hammami S, Zeghal KM (2015). Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 70(4):441-53.
- Blackman LM, Hardham AR (2008). Regulation of catalase activity and gene expression during *Phytophthora nicotianae* development and infection of tobacco. *Mol Plant Pathol.* 9(4):495-510.
- Blaner WS, Shmarakov IO, Traber MG (2021). Vitamin A and Vitamin E: Will the Real Antioxidant Please Stand Up? *Annu Rev Nutr.*41:105-131.
- Boirie Y, Farigon N, Miolanne M, Montel F, Lahaye C, Guillet C, Walrand S. L'obésité sarcopénique : causes et conséquences. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* 51(3) :132-138.
- Bonnefont-Rousselot D (2014). Obésité et stress oxydant. *Obes* 9, 8–13.
- Bosomworth NJ (2019). Obésité centrale malgré un poids normal: Les dangers particuliers de la taille toxique. *Can Fam Physician.*65(6):e251-e260.
- Bouderbala S, Ougouag A, Benmansour J, Madoui K, Al-hiti MK, Bouchenak M (2014). Les grignons d'olive réduisent la cholestérolémie et la triglycéridémie et atténuent la peroxydation lipidique sérique chez le rat consommant un régime enrichi en cholestérol. 3(1) :23-31.

Références Bibliographiques

- Bouderbala S, Al- hiti MK, Mahdad N , Bouchenak M (2015). Effet des grignons d'olive sur l'activité de la lécithine : cholestérol acyltransférase, chez le rat soumis à un régime enrichi en cholestérol. *J Nutr Santé*. 4(2):76-83.
- Brissot P, Buffet C (2023). Non-alcoholic fatty liver disease: A public health challenge. *Académie nationale de médecine*. 207 : 521-533.
- Cao YL, Lin JH, Hammes HP, Zhang C (2022). Flavonoids in Treatment of Chronic Kidney Disease. *Molecules*.27(7):2365.
- Cassard-Doulier AM, Perlemuter G (2011). Inflammation hépatique liée à l'obésité (NASH). *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 46(5) :240-246.
- Catalano PM, Shankar K (2017). Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ*.356:j1.
- Cherrad H, Bouderbala S (2019) .Les grignons d'olive diminuent la glycémie et améliorent l'activité antioxydante tissulaire, chez le rat rendu diabétique par injection à la streptozotocine. *Nutrition clinique et métabolisme*. 33:4–114.
- Claro-Cala CM, Quintela JC, Pérez-Montero M, Miñano J, de Sotomayor MA, Herrera MD, Rodríguez-Rodríguez AR (2020). Pomace Olive Oil Concentrated in Triterpenic Acids Restores Vascular Function, Glucose Tolerance and Obesity Progression in Mice. *Nutrients*. 12(2):323.
- Clément G (2011). *Fundamentals of Space Medicine* (2nd ed). New York: Springer.
- CMAJ (2020). L'obésité chez l'adulte : ligne directrice de pratique clinique. 192:875-91.
- 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(1):63-81.
- Contreras MDM, Gómez-Cruz I, Romero I, Castro E (2021). Olive Pomace-Derived Biomasses Fractionation through a Two-Step Extraction Based on the Use of Ultrasounds: Chemical Characteristics. *Foods*.10 (1):111.
- Claro-Cala CM, Quintela JC, Pérez-Montero M, Miñano J, de Sotomayor MA, Herrera MD, Rodríguez-Rodríguez AR (2020). Pomace Olive Oil Concentrated in Triterpenic Acids Restores Vascular Function, Glucose Tolerance and Obesity Progression in Mice. *Nutrients*. 12(2):323.
- Da Silva W, Machado AS, Souza MA, Mello-Carpes PB, Carpes FP (2018). Effect of green tea extract supplementation on exercise-induced delayed onset muscle soreness and muscular damage. *Physiol Behav*. 194:77-82.

Références Bibliographiques

- Dargent J (2020). Systematic Assessment of Weight Trajectories in Obesity Implementation and Treatment. *Clinical article*. 15:28-38.
- De Saint-Pol T (2014). Obésité, alimentation et image du corps. *Médecine des Maladies Métaboliques*. 8(3) : 271-274.
- Di Meo S, Venditti P (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 9829176.
- Draper H, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186: 421–231.
- Ducom G, Gautier M, Pietraccini M, Tagutchou J-P, Lebouil D, Dumont N, Gourdon R (2019). Caractérisation de grignons d'olives en vue d'une valorisation thermo-chimique par gazéification. *Environnement, Ingénierie et Développement*. 82.
- Eliche-Quesada D, Leite-Costa J (2016). Use of bottom ash from olive pomace combustion in the production of eco-friendly fired clay bricks. *Waste Manag*.48:323-333.
- Ellman GL (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82: 70 –77.
- Elmaksoud HAA, Motawea MH, Desoky AA, Elharrif MG, Ibrahim A (2012). Hydroxytyrosol alleviate intestinal inflammation, oxidative stress and apoptosis resulted in ulcerative colitis. *Biomed Pharmacother*.142:112073.
- Elstner EF, Youngman R J, Obwald W (1983). Superoxide dismutase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. H. B. Bergmeyer). 3 (3): 293–302.
- Faucher P, Poitou C (2016). Physiopathologie de l'obésité. *Revue Du Rhumatisme. Monographies*. 83(1) : 6–12.
- Foti P, Occhipinti P.S, Romeo FV, Timpanaro N, Musumeci T, Randazzo CL, Caggia C (2022). Phenols recovered from olive mill wastewater as natural booster to fortify blood orange juice. *Food Chem*. 393: 133428.
- Fruh SM (2017). Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J Am Assoc Nurse Pract*. 29(S1):S3-S14.
- Genser L, Poitou C, Brot-Laroche É, Rousset M, Vaillant JC, Clément K, Thenet S, Leturque A (2016). L'altération de la perméabilité intestinale : chaînon manquant entre dysbiose et inflammation au cours de l'obésité ?. *Med Sci (Paris)*. 32(5):461-9.
- Geny B, Charles AL, Lejay A, Meyer A (2019). Pollution et stress oxydant. *Revue française d'allergologie*. 59:174 – 176 pp.

Références Bibliographiques

- Gómez-Cruz I, Contreras MDM, Carvalheiro F, Duarte LC, Roseiro LB, Romero I, Castro E (2021). Recovery of Bioactive Compounds from Industrial Exhausted Olive Pomace through Ultrasound-Assisted Extraction. *Biology (Basel)*.10(6):514.
- Gorassini A, Verardo G, Bortolomeazzi R (2019). Polymeric reversed phase and small particle size silica gel solid phase extractions for rapid analysis of sterols and triterpene dialcohols in olive oils by GC-FID. *Food Chem.* 283:177-182.
- Gotoh K, Fujiwara K, Anai M, Okamoto M, Masaki T, Kakuma T, Shibata H (2017). Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity [Review]. *Endocr J.* 64(4):375-378.
- Grasemann H, Holguin F (2021). Oxidative stress and obesity-related asthma. *Paediatr Respir Rev.*37:18-21.
- Haywood C, Sumithran P (2019). Treatment of obesity in older persons-A systematic review. *Obes Rev.* 20(4):588-598.
- Hennebelle T, Sahnaz S, Bailleul F (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie.* 1 :3-6.
- Ighodoro OM, Akinloye OA (2017). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J of Med.*
- Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016:7432797.
- Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med.*32(4-6):234-46.
- Ilunga RM, Helbling C, Favre L, Collet TH (2018). Prise en charge de la dyslipidémie liée à l'obésité : une approche centrée sur l'alimentation. *Med Suisse.* 14 : 627-32.
- Jabri MA, Aissani N, Tounsi H, Sakly M, Marzouki L, Sebai H (2017). Chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract inhibits in vitro intestinal glucose absorption and attenuates high fat diet-induced lipotoxicity and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 87 :153-159.
- Jebai R, Gbadamosi SO, Nassar Gorra L, Madhivanan P (2019). Letter to the editor: Weight-loss interventions in older persons. *Obes Rev.* 20(8):1184.
- Katsinas N, Rodríguez-Rojo S, Enríquez-de-Salamanca A (2021). Olive Pomace Phenolic Compounds and Extracts Can Inhibit Inflammatory- and Oxidative-Related Diseases of Human Ocular Surface Epithelium. *Antioxidants (Basel)*.10(7):1150

Références Bibliographiques

- Kawai T, Autieri MV, Scalia R (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol.*320 (3):C375-C391.
- Kerasioti E, Terzopoulou Z, Komini O, Kafantaris I, Makri S, Stagos D, Gerasopoulos K, Anisimov NY, Tsatsakis AM, Kouretas D (2017). Tissue specific effects of feeds supplemented with grape pomace or olive oil mill wastewater on detoxification enzymes in sheep. *Toxicol Rep.*4:364-372.
- Kim KB, Shin YA (2020). Males with Obesity and Overweight. *J Obes Metab Syndr.* 29(1):18-25.
- Kovesdy CP, Furth S, Zoccali C (2017). World Kidney Day Steering Committee. Obesity and kidney disease: Hidden consequences of the epidemic. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 28(2):241-252.
- Kumar SR, Mohd Ramli ES, Abdul Nasir NA, Mohd Ismail N, Mohd Fahami NA (2021). Methanolic Extract of *Piper sarmentosum* Attenuates Obesity and Hyperlipidemia in Fructose-Induced Metabolic Syndrome Rats. *Molecules.*26(13):3985.
- Jackson E, Shoemaker R, Larian N, Cassis L (2017). Adipose Tissue as a Site of Toxin Accumulation. *Compr Physiol.*7(4):1085-1135.
- Jagota SK, Dani HMA (1982). New Colorimetric Technique for the Estimation of Vitamin C Using Folin Phenol Reagent. *Analytical Biochemistry.* 127:178-182
- Jarosz E, Gugushvili A (2022). BMI and dissatisfaction with life: contextual factors and socioemotional costs of obesity. *Qual Life Res.*31(4):1167-1177.
- Lauby-Secretan B, Dossus L, Marant-Micallef C, His M. Obésité et cancer (2019). Obesity and Cancer. *Bull Cancer.* 106(7-8):635-646.
- Lee ES, Kwon MH, Kim HM, Woo HB, Ahn CM, Chung CH (2020). Curcumin analog CUR5-8 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice with high-fat diet-induced obesity. *Metabolism.* 103:154015.
- Lee Y, Lee J, Lee MS, Chang E, Kim Y (2021). *Chrysanthemum morifolium* Flower Extract Ameliorates Obesity-Induced Inflammation and Increases the Muscle Mitochondria Content and AMPK/SIRT1 Activities in Obese Rats. *Nutrients.* 13(10):3660.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*186:464-78.
- Li H, Ren J, Li Y, Wu Q, Wei J. Oxidative stress: The nexus of obesity and cognitive dysfunction in diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).*14:1134025.

Références Bibliographiques

- Lin X, Li H (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*.12:706978.
- Liu M, Yun P, Hu Y, Yang J, Khadka RB, Peng X (2020). Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Obesity. *Obes Facts*.13(2):279-291.
- Liu J, Sun H, Shang J, Yong Y, Zhang L (2011). Effect of olive pomace extracts on hyperlipidaemia. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. 25:12.
- Luca SV, Macovei I, Bujor A, Miron A, Skalicka-Woźniak K, Aprotosoiaie AC, Trifan A (2020). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 60(4):626-659.
- Ma Y, Ding X, Gu J, Zhou S, Jiang Y(2023).Effects of olive oil on hepatic steatosis and liver enzymes: A systematic review. *Journal of Functional Foods*. 109:105815.
- Mayoral LP, Andrade GM, Mayoral EP, Huerta TH, Canseco SP, Rodal Canales FJ, Cabrera-Fuentes HA, Cruz MM, Pérez Santiago AD, Alpuche JJ, Zenteno E, Ruíz HM, Cruz RM, Jeronimo JH, Perez-Campos E (2020). Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian J Med Res*. 151(1):11-21.
- Mallamaci R, Budriesi R, Clodoveo ML, Biotti G, Micucci M, Ragusa A, Curci F, Muraglia M, Corbo F, Franchini C (2021). Olive Tree in Circular Economy as a Source of Secondary Metabolites Active for Human and Animal Health Beyond Oxidative Stress and Inflammation. *Molecules*. 26(4):1072.
- Marcelin G, Clément K (2018). Adipose tissue fibrosis: an aggravating factor in obesity. *Med Sci*. 34:424-431.
- Marcelin G, Silveira ALM, Martins LB, Ferreira AV, Clément K (2019). Deciphering the cellular interplays underlying obesity-induced adipose tissue fibrosis. *J Clin Invest*.129(10):4032-4040.
- Mateos R, Sarria B, Bravo L (2020). Nutritional and other health properties of olive pomace oil. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 60(20):3506-3521.
- Mayer C (2019). Effets préventifs des micro-algues marines et de leurs molécules bioactives sur le syndrome métabolique et l'obésité. *Biochimie, Biologie Moléculaire*.
- Mikami T, Kim J, Park J, Lee H, Yaicharoen P, Suidasari S, Yokozawa M, Yamauchi K (2021). Olive leaf extract prevents obesity, cognitive decline, and depression and improves exercise capacity in mice. *Sci Rep*.11(1):12495.
- Milić S, Lulić D, Štimac D (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*. 20(28):9330-7.

Références Bibliographiques

- Mirabelli M, Chiefari E, Arcidiacono B, Corigliano DM, Brunetti FS, Maggisano V, Russo D, Foti DP, Brunetti A (2020). Mediterranean Diet Nutrients to Turn the Tide against Insulin Resistance and Related Diseases. *Nutrients*.12(4):1066.
- Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, Nakagawa K, Miyazawa T (2019). Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life*.71(4):430-441
- Montana L, Colas PA, Valverde A, Carandina S (2022). Altérations de la motilité digestive après chirurgie de l'obésité. *Journal de Chirurgie Viscérale*. 159(1) :33-40.
- Moretti DB, Nordi WM, Cruz TMB, Neto RM (2017). Catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and oxygen radical absorbance capacity in the gut of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* and dourado *Salminus brasiliensis* fed bovine first milk secretion. *Lat Am. J. Aquat. Res.*, 45(4): 717-723.
- Mouzaoui K, Yazzag L, Moulti-Mati F(2014). Composés phénoliques des grignons d'olive provenant d'huileries traditionnelle et moderne : Essai de purification de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol. *Sciences et Technologie*. 40 :9-15.
- Mustacich DJ, Bruno RS, Traber MG (2007). Vitamin E. *Vitam Horm*.76:1-21.
- Ou Y, Jobu K, Ishida T, Morisawa S, Fujita H, Kawada K, Yoshioka S, Miyamura M (2022). Saikokeishikankyoto extract alleviates muscle atrophy in KKAy mice. *J Nat Med*.76(2):379-388.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews. Immunology*. 11: 85–97.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 22(1):18-35.
- Palmieri D, Aliakbarian B, Casazza AA, Ferrari N, Spinella G, Pane B, Cafueri G, Perego P, Palombo D (2012). Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction. *Microvasc Res*. 83(3):281-9.
- Panić M, Radić Stojković M, Kraljić K, Škevin D, Radojčić Redovniković I, Gaurina Srček V, Radošević K (2019). Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food Chem*. 283:628-636.
- Papadaki E, Tsimidou MZ (2022). Edible oils from olive drupes as a source of bioactive pentacyclic triterpenes. Is there a prospect for a health claim authorization?. *Food Chemistry*. 381: 132286.
- Park W, Lim D (2009). Effect of the oligo(ethylene glycol) group on the antioxidant activity of manganese salen complexes. *Bioorg Med Chem Lett*. 19(3):614-7.

Références Bibliographiques

- Pérez-Torres I, Castrejón-Téllez V, Soto ME, Rubio-Ruiz ME, Manzano-Pech L, Guarner-Lans V (2021). Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *Int J Mol Sci.* 22(4):1786.
- Petrella C, Di Certo MG, Gabanella F, Barbato C, Ceci FM, Greco A, Ralli M, Polimeni A, Angeloni A, Severini C, Vitali M, Ferraguti G, Ceccanti M, Lucarelli M, Severi C, Fiore M (2021). Mediterranean Diet, Brain and Muscle: Olive Polyphenols and Resveratrol Protection in Neurodegenerative and Neuromuscular Disorders. *Curr Med Chem.*28(37):7595-7613.
- Piché ME, Tchernof A, Després JP (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res.* 126(11):1477-1500.
- Poitou C, Clément k (2007). Le tissu adipeux : un acteur majeur du syndrome inflammatoire de l'obésité ?. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* 42(2) : 90-96.
- Puig-Gamero M, Parascanu MM, Sánchez P, Sanchez-Silva L (2021). Olive pomace versus natural gas for methanol production: a life cycle assessment. *Environ Sci Pollut Res Int.* 28(23):30335-30350.
- Ribeiro TB, Oliveira AL, Costa C, Nunes J, Vicente AA, Pintado M (2020). Total and Sustainable Valorisation of Olive Pomace Using a Fractionation Approach. *Appl. Sci.* 10(19): 6785.
- Romanick SS, Ulrich C, Schlauch K, Hostler A, Payne J, Woolsey R, Quilici D, Feng Y, Ferguson BS (2018). Obesity-mediated regulation of cardiac protein acetylation: parallel analysis of total and acetylated proteins via TMT-tagged mass spectrometry. *Biosci Rep.* 38(5):BSR20180721.
- Rospond B, Krakowska A, Krośniak M, Muszyńska B, Opoka W (2022). The influence of high-fat and high-sucrose feeding regimes on organ weight, body weight, and serum concentration of bioelements in rats. *J Trace Elem Med Biol.*73:127020.
- Safaei M, Sundararajan EA, Driss M, Boulila W, Shapi'i A (2021). A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. *Comput Biol Med.*136:104754.
- Sagni A (2019). L'obésité et la lutte contre le poids :enjeux médicaux et sociaux. CNRS Edition. 351-361p.
- Samba Garba M, Bouderbala S (2022), "Olive cake reduces obesity by decreasing epididymal adipocyte size, inhibiting oxidative stress and pancreatic lipase, in rat fed high fat diet". *Nutrition & Food Science.* 52(8): 1206-1220

Références Bibliographiques

- Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Warleta F, Campos M (2013). Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of *Olea europaea*. *J Agric Food Chem.*61(50):12173-82.
- Sánchez-Quesada C, Toledo E, González-Mata G, Ramos-Ballesta MI, Peis JI, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Corella D, Fitó M, Romaguera D, Vioque J, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Estruch R, Tinahones FJ, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, Garcia-Rios A, Cano-Ibáñez N, Matía-Martín P, Daimiel L, Sánchez-Rodríguez R, Vidal J, Vázquez C, Ros E, Hernández-Alonso P, Barragan R, Muñoz-Martínez J, López M, González-Palacios S, Vaquero-Luna J, Crespo-Oliva E, Zulet MA, Díaz-González V, Casas R, Fernandez-Garcia JC, Santos-Lozano JM, Galera A, Ripoll-Vera T, Buil-Cosiales P, Canudas S, Martinez-Lacruz R, Pérez-Vega KA, Rios Á, Lloret-Macián R, Moreno-Rodriguez A, Ruiz-Canela M, Babio N, Zomeño Fajardo MD, Gaforio JJ (2020). Relationship between olive oil consumption and ankle-brachial pressure index in a population at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 314:48-57.
- Seravalle G, Grassi G (2017). Obesity and hypertension. *Pharmacol Res.*122:1-7.
- Sharma GN, Gupta G, Sharma P (2018). A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 28(2):139-154.
- Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem.*383:132531.
- Sies H (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.*4:180-3.
- Suneja M, Kumar AB (2014). Obesity and perioperative acute kidney injury: a focused review. *J Crit Care.* 29(4):694.e1-6.
- Talimula k, Mizéhoun-Adissoda C, Padonou G, Aguemon B., Barikissou G, Ouendo E (2019). Facteurs associés à l'obésité au sein d'un groupe d'utilisateurs du marché Dantokpa (Bénin). *Santé Publique.*31: 591-602.
- Ticinesi A, Guerra A, Nouvenne A, Meschi T, Maggi S (2023). Disentangling the Complexity of Nutrition, Frailty and Gut Microbial Pathways during Aging: A Focus on Hippuric Acid. *Nutrients.*15(5):1138.
- Touyz RM, Rios FJ, Alves-Lopes R, Neves KB, Camargo LL, Montezano AC (2020). Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *Can J Cardiol.*36(5):659-670.
- Tsao R (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2(12):1231-46.

Références Bibliographiques

- Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Antonopoulou S, Demopoulos CA (2007). Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. *Mediators Inflamm.*2007:36204.
- Tsai SC, Huang YW, Wu CC, Wang JJ, Chen YT, Singhania RR, Chen CW, Dong CD, Hsieh SL (2022). Anti-Obesity Effect of *Nostoc commune* Ethanol Extract In Vitro and In Vivo. *14(5):968.*
- Tsoupras AB, Fragopoulou E, Nomikos T, Iatrou C, Antonopoulou S, Demopoulos CA (2007). Characterization of the de novo biosynthetic enzyme of platelet activating factor, DDT-insensitive cholinephosphotransferase, of human mesangial cells. *Mediators Inflamm.* 2007:27683.
- Valero-Muñoz M, Martín-Fernández B, Ballesteros S, de la Fuente E, Quintela JC, Lahera V, de las Heras N(2014). Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: mechanisms involved. *Mol Nutr Food Res.* 58(2):376-83.
- Van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P (2019). Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.*21(4):425-435.
- Vergani L, Vecchione G, Baldini F, Grasselli E, Voci A, Portincasa P, Ferrari PF, Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P (2018). Polyphenolic extract attenuates fatty acid-induced steatosis and oxidative stress in hepatic and endothelial cells. *Eur J Nutr.*57(5):1793-1805.
- Weihrauch-Blüher S, Schwarz P, Klusmann JH (2019). Childhood obesity: increased risk for cardiometabolic disease and cancer in adulthood. *Metabolism.*92:147-152.
- Weiss GA, Hennet T (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci.* 74(16):2959-2977.
- Wharton S, Lau DCW, Vallis M, Sharma AM, Biertho L, Campbell-Scherer D, Adamo K, Alberga A, Bell R, Boulé N, Boyling E, Brown J, Calam B, Clarke C, Crowshoe L, Divalentino D, Forhan M, Freedhoff Y, Gagner M, Glazer S, Grand C, Green M, Hahn M, Hawa R, Henderson R, Hong D, Hung P, Janssen I, Jacklin K, Johnson-Stoklossa C, Kemp A, Kirk S, Kuk J, Langlois MF, Lear S, McInnes A, Macklin D, Naji L, Manjoo P, Morin MP, Nerenberg K, Patton I, Pedersen S, Pereira L, Piccinini-Vallis H, Poddar M, Poirier P, Prud'homme D, Salas XR, Rueda-Clausen C, Russell-Mayhew S, Shiao J, Sherifali D, Sievenpiper J, Sockalingam S, Taylor V, Toth E, Twells L, Tytus R, Walji S, Walker L, Wicklum S (2020). L'obésité chez l'adulte : ligne directrice de pratique clinique. *CMAJ.* 192(49):E1757-E1775.

Références Bibliographiques

WHO (2000). World Health Report- Health Systems: Improving Performance. World Health Organization.

Yahiaoui Z, Bouderbala S, Cherrad H, Bouchenak M (2019). Olive cake attenuates lipid peroxidation, and increases tissues antioxidant activity, in streptozotocin-induced diabetic rats, fed cholesterol-enriched diet. *Nutr Santé*. 08(02): 72-79.

Yang JM, Sun Y, Wang M, Zhang XL, Zhang SJ, Gao YS, Chen L, Wu MY, Zhou L, Zhou YM, Wang Y, Zheng FJ, Li YH (2019). Regulatory effect of a Chinese herbal medicine formula on non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 25(34):5105-5119.

Yu PC, Hsu CC, Lee WJ, Liang CK, Chou MY, Lin MH, Hsiao FY, Peng LN, Chen LK (2021). Muscle-to-fat ratio identifies functional impairments and cardiometabolic risk and predicts outcomes: biomarkers of sarcopenic obesity. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 13(1):368-376.

Yu T, Zhao L, Zhang JC, Xuan DY (2018). [Impacts of periodontitis on visceral organ weight and weight percentage in obese mice]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*.36(5):514-520.

Zhuang Y, Wu H, Wang X, He J, He S, Yin Y (2019). Resveratrol Attenuates Oxidative Stress-Induced Intestinal Barrier Injury through PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev*.2019:7591840.

Chapitre III

Abdulmumin TM, Abdulmumin Y, Ibrahim AM, Sarki SI, Murtala M (2020). Acute toxicity study and serum lipids profile of Pet- éther extract of leave, stem bark and root of *Jatropha curcas* in Wistar rats. *Saudi J Biomed Res*. 2518-3222.

Adeneye AA, Ajagbonna OP, Adeleke TI, Bello SO (2006). Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *J Ethnopharmacol*.105(3):374-9.

Ahmad MH, Zezi AU, Anafi SB (2022). Sub-acute toxicity study on hydromethanolic leaves extract of *Combretum hypopilinum* (Combretaceae) Diels in Wistar rats. *Toxicol Res*. 38: 487–502.

Andres TM, McGrane T, McEvoy MD, Allen BFS (2019). Geriatric Pharmacology: An Update. *Anesthesiol Clin*. 37(3):475-492.

Références Bibliographiques

- Awad OME, El-Sohaimy SA, Ghareeb DA, Aboulenein AM, Saleh SR, El-Aziz NMA (2020). Phytochemical Analysis and Toxicity Assessment of Artichoke By-product Extract. *Pak J Biol Sci.* 23(1):81-91.
- Awotunde OS, Adewoye SO, P S D, Hawumba J (2019). Subacute toxicity study of aqueous root extract of *Terminalia schimperiana* in male Wistar rats. *Toxicol Rep.*6:825-832.
- Badi Z, Guermouche B, Haddam N, Belyagoubi N, Rouigueb K, Benzerjeb H, Dali-Sahi M, Kechkouche Y, Merzouk H (2022). Assessment of acute and sub-acute toxicity of olive pomace in female Wistar rats. *World Cancer Res J.* 9:2359.
- Bayat S, Geiser F, Kristiansen P, Wilson SC (2014). Organic contaminants in bats: trends and new issues. *Environ Int.* 63:40-52.
- Bensimon G, Berlin I, Hulot JS, Lacomblez L, Lebrun-Vignes B, Lechat P, Warot D (2006). *Pharmacologie.* Paris: Lechat. 349 p.
- Bouderbala S, Ougouag A, Benmansour J, Madoui K, Al-hiti MK, Bouchenak M (2014). Les grignons d'olive réduisent la cholestérolémie et la triglycéridémie et atténuent la peroxydation lipidique sérique chez le rat consommant un régime enrichi en cholestérol. 3(1) :23-31.
- Bidies ADP, Adeoti FM, Yapo FA, Tiekpa JW, N'Guessan JD, Djaman JA (2016). Effet de l'extrait total aqueux de *Chrysophyllum Perpulchrum* sur les paramètres hématologiques, biochimiques et la croissance pondérale des rats Wistar sains. *Rev Ivoir Sci Technol.* 28 :333-348.
- Calabrese EJ (2008). Hormesis and medicine. *Br J Clin Pharmacol.* 66(5):594-617.
- Cao L, Hu WG, Kirova YM, Yang ZZ, Cai G, Yu XL, Ma JL, Guo XM, Shao ZM, Chen JY (2014). Potential impact of cardiac dose-volume on acute cardiac toxicity following concurrent trastuzumab and radiotherapy. *Cancer Radiother.*18(2):119-24.
- Chen H, Sha X, Luo Y, Chen J, Li X, Wang J, Cao G, Peng X (2021). Acute and subacute toxicity evaluation of *Houttuynia cordata* ethanol extract and plasma metabolic profiling analysis in both male and female rats. *J Appl Toxicol.*41(12):2068-2082.
- Cherrad H, Bouderbala S (2019) .Les grignons d'olive diminuent la glycémie et améliorent l'activité antioxydante tissulaire, chez le rat rendu diabétique par injection à la streptozotocine. *Nutrition clinique et métabolisme.* 33:4–114.
- Chitra B, Ramaswamy RS, Suba V (2015). Toxicity Evaluation of Pūrṇa Cantīrotaya Centūram, a Siddha Medicine in Wistar Rats. *Int Sch Res Notices.*2015:473296.
- Cichocki JA, Guyton KZ, Guha N, Chiu WA, Rusyn I, Lash LH (2016). Target Organ Metabolism, Toxicity, and Mechanisms of Trichloroethylene and Perchloroethylene: Key Similarities, Differences, and Data Gaps. *J Pharmacol Exp Ther.*359(1):110-23.

Références Bibliographiques

- Cléro E, Bisson M, Nathalie V, Blanchardon E, Thybaud E, Billarand Y (2021). Cancer risk from chronic exposures to chemicals and radiation: a comparison of the toxicological reference value with the radiation detriment. *Radiat Environ Biophys.* 60(4):531-547.
- Demortain D (2013). *Regulatory Toxicology in Controversy. Science, Technology, & Human Values.* 38(6) :727-748.
- Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R (2012). Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol.* 2012:645460.
- Deyno S, Abebe A, Tola MA, Hymete A, Bazira J, Makonnen E, Alele PE (2020). Acute and sub-acute toxicity of *Echinops kebericho* decoction in rats. *BMC Complement Med Ther.* 20(1):2.
- Diezi J, Felly-Bosco E (2008). *Precis de toxicology.* Genève: Editions Médecine et Hygiène.
- Di Nunzio M, Picone G, Pasini F, Caboni MF, Gianotti A, Bordoni A, Capozzi F (2018). Olive Oil Industry By-Products. Effects of a Polyphenol-Rich Extract on the Metabolome and Response to Inflammation in Cultured Intestinal Cell. *Food Res. Int.* 113: 392–400.
- Dishaw L, Yost E, Arzuaga X, Luke A, Kraft A, Walker T, Thayer K (2020). A novel study evaluation strategy in the systematic review of animal toxicology studies for human health assessments of environmental chemicals. *Environ Int.* 141:105736.
- Ema M, Gamo M, Honda K (2015). A review of toxicity studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 74:42-63.
- European Chemicals Agency ECHA (2012). How to prepare toxicological summaries in IUCLID and how to derive DNELs. *Practical Guide 14.* 1831-6727.
- Fantke P, Chiu WA, Aylward L (2021). Exposure and toxicity characterization of chemical emissions and chemicals in products: global recommendations and implementation in USEtox. *Int J Life Cycle Assess.* 26: 899–915.
- Frank C.L.U (1992). *Toxicologie, Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque.* (Paris) :73-202.
- Fantke P, Chiu WA, Aylward L (2021). Exposure and toxicity characterization of chemical emissions and chemicals in products: global recommendations and implementation in USEtox. *Int J Life Cycle Assess.* 26: 899–915.
- Gbogdo M, Kouadio RY, Aboli FT, Kone M, Kporou EK, Yapo PA (2021). Evaluation de la toxicité d'un aphrodisiaque ivoirien d'origine naturelle (aphro) chez le rat. *Int J Biol Chem Sci.* 15(4) : 1595-1604.
- Gordon CJ, Johnstone AF, Aydin C (2014). Thermal stress and toxicity. *Compr Physiol.* 4(3):995-1016.

Références Bibliographiques

- Guo JJ, Liu N, Ma Z, Gong ZJ, Liang YL, Cheng Q, Zhong XG, Yao ZJ (2022). Dose-Response Effects of Low-Dose Ionizing Radiation on Blood Parameters in Industrial Irradiation Workers. *Dose Response*. 20(2):15593258221105695.
- Hayes AW, Dixon D. Cornerstones of Toxicology. *Toxicol Pathol*. 45(1):57-63.
- He A, Zhou Z, Huang L, Yip KC, Chen J, Yan R, Li R (2023). Association between serum iron and liver transaminases based on a large adult women population. *J Health Popul Nutr*. 42(1):69.
- Hoffmann S, de Vries RBM, Stephens ML, Beck NB, Dirven HAAM, Fowle JR 3rd, Goodman JE, Hartung T, Kimber I, Lalu MM, Thayer K, Whaley P, Wikoff D, Tsaïoun K (2017). A primer on systematic reviews in toxicology. *Arch Toxicol*.91(7):2551-2575.
- Hoffmann S, Kleinstreuer N, Alépée N, Allen D, Api AM, Ashikaga T, Clouet E, Cluzel M, Desprez B, Gellatly N, Goebel C, Kern PS, Klaric M, Kühnl J, Lalko JF, Martinozzi-Teissier S, Mewes K, Miyazawa M, Parakhia R, Vliet E, Zang Q, Petersohn D (2018). Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database, *Critical Reviews in Toxicology*.48(5): 344-358.
- Jackson E, Shoemaker R, Larian N, Cassis L (2017). Adipose Tissue as a Site of Toxin Accumulation. *Compr Physiol*. 7(4):1085-1135.
- Jamshidzadeh A, Baghban M, Azarpira N, Mohammadi Bardbori A, Niknahad H (2008). Effects of tomato extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats. *Food Chem Toxicol*. 46(12):3612-5.
- Kim HM, Kang JS (2021). Metabolomic Studies for the Evaluation of Toxicity Induced by Environmental Toxicants on Model Organisms. *Metabolites*. 11(8):485.
- Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro*. 23(6):1076-84.
- Koh PH, Mohd RA, Iqbal M (2012). Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract: alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and toxicity. *Human and Experimental Toxicology*. 31(1): 81-91.
- Krache I, Boussoualim N, Ouhida S, Amraoui N, Baghiani A, Arrar L (2017). Acute and Chronic Effects of Methanolic Extract of *Teucrium polium* on Blood Parameters and Histopathology of Liver and Kidney in Female Rats. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2(3): 1-11.
- Kumar V, Kumari A, Guleria P, Yadav SK (2012). Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals. *Rev Environ Contam Toxicol*. 215:39-121.

Références Bibliographiques

- Le Daré B, Ferron PJ, Gicquel T (2021). Toxic Effects of Amanitins: Repurposing Toxicities toward New Therapeutics. *Toxins*. 13(6): 417.
- Li M, Xu G, Yu R, Wang Y, Yu Y (2019). Bioaccumulation and toxicity of pentachloronitrobenzene to earthworm (*Eisenia fetida*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 174:429-434.
- Liu J, Sun H, Shang J, Yong Y, Zhang L (2011). Effect of olive pomace extracts on hyperlipidaemia. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. 25:12.
- Manda P, Manda O, Vangan-Manda MO, Kroa E, Dano SD (2017). Etude des toxicités aiguë et subaiguë du remède nature utilisé dans le traitement du Paludisme. *Rev Ivoir Sci Technol*. 29 :145-158.
- Mikolo B, Etou Ossibi AW, Miamb LR, Abena AA (2020). Evaluation des toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait aqueux des feuilles de *Tetracera potatoria* Ex.G.Don chez les rongeurs de laboratoire. *J Anim Plant Sci*. 45(3) : 7980-7991.
- Miller I, Serchi T, Murk AJ, Gutleb AC. The added value of proteomics for toxicological studies. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*.17(4):225-46.
- OCDE (2002), Essai n° 423: Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Section 4. Éditions OCDE, Paris : <https://doi.org/10.1787/9789264071018-fr>
- OCDE (2008). Guidelines for the testing of chemicals. *Acute Oral. Toxic. Proced*. 425,27.
- OCDE (2008), Essai n° 407: Toxicité orale à doses répétées - pendant 28 jours sur les rongeurs. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Section 4, Éditions OCDE, Paris : <https://doi.org/10.1787/9789264070691-fr>.
- Olaniyan JM, Muhammad HL, Makun HA, Busari MB, Abdullah AS (2016). Acute and sub-acute toxicity studies of aqueous and methanol extracts of *Nelsonia campestris* in rats. *Journal of Acute Disease*. 5(1):62-70.
- OMS (2000). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. Département Médicaments essentiels et politiques pharmaceutiques (EDM) Organisation mondiale de la Santé.
- Pannala VR, Estes SK, Rahim M, Trenary I, O'Brien TP, Shiota C, Printz RL, Reifman J, Shiota M, Young JD, Wallqvist A (2020). Toxicant-Induced Metabolic Alterations in Lipid and Amino Acid Pathways Are Predictive of Acute Liver Toxicity in Rats. *Int J Mol Sci*. 21(21):8250.

Références Bibliographiques

- Patlolla AK, Hackett D, Tchounwou PB (2015). Silver nanoparticle-induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats. *Mol Cell Biochem.* 399: 257–268.
- Radi ZA (2019). Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. *Int J Toxicol.* 38(3):215-227.
- Rhiouani H, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B (2008). Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *J Ethnopharmacol.* 118(3):378-86.
- Robert L, Vincent H, Perrine H, Dominique L (2007). *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles.* Elsevier Masson SAS: Paris.
- Sies H, Berndt C, Jones DP (2017). Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry.* 86: 715-748.
- Suman TY, Kim SY, Yeom DH, Jeon J (2022). Transformation Products of Emerging Pollutants Explored Using Non-Target Screening: Perspective in the Transformation Pathway and Toxicity Mechanism-A Review. *Toxics.* 10(2):54.
- Sundaram V, Mohammed S, Srinivasan MR (2021). Acute and subacute toxicity evaluation of hydroalcoholic extract from the stem bark of Bois Bande (*Parinari campestris* Aubl.1772) in rats. *BMC Pharmacol Toxicol.* 22: 51 (2021).
- Tedesco S, Doyle H, Blasco J, Redmond G, Sheehan D (2010). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol.* 100(2):178-86.
- Thakur M, Rachamalla M, Niyogi S, Datusalia AK, Flora SJS (2021). Molecular Mechanism of Arsenic-Induced Neurotoxicity including Neuronal Dysfunctions. *Int J Mol Sci.* 22(18):10077.
- Thomas SR, Elkinton JS (2004). Pathogenicity and virulence. *J Invertebr Pathol.* 85(3):146-51.
- Tousson E, El-Gharbawy DM (2023). Impact of *Saussurea lappa* root extract against copper oxide nanoparticles induced oxidative stress and toxicity in rat cardiac tissues. 38(2):415-412.
- Vincent MJ, Kozal JS, Thompson WJ, Maier A, Dotson GS, Best EA, Mundt KA (2019). Ethylene Oxide: Cancer Evidence Integration and Dose-Response Implications. *Dose Response.* 17(4):1559325819888317.
- Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, Yuan P, Mahan TE, Shi Y, Gilfillan S, Cella M, Grutzendler J, DeMattos RB, Cirrito JR, Holtzman DM, Colonna M (2016). TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med.* 213(5):667-75.

Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int.* 23(9):8244-59.

Younus H (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim).* 12(3):88-93.

Chapitre IV

Afsar T, Razak S, Khan MR, Mawash S, Almajwal A, Shabir M, Haq IU (2016). Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydasypica* R. Parker aerial parts. *BMC Complement Altern Med.* 16:258.

Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci.* 4:200-214.

Alimenti C, Lianza M, Antognoni F, Giusti L, Bistoni O, Liotta L, Angeloni C, Lupidi G, Beghelli D (2023). Characterization and Biological Activities of In Vitro Digested Olive Pomace Polyphenols Evaluated on Ex Vivo Human Immune Blood Cells. *Molecules.* 28(5):2122.

Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, Kumar S (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016:15.

Azab A, Nassar A, Azab AN (2016). Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules.* 21(10):1321.

Bouhlali E.D.T, 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 (05): 156-162.

Bukara K, Drvenica I, Ilić V, Stančić A, Mišić D, Vasić B, Gajić R, Vučetić D, Kiekens F, Bugarski B (2016). Comparative studies on osmosis based encapsulation of sodium diclofenac in porcine and outdated human erythrocyte ghosts. *J Biotechnol.* 240:14-22.

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(2): 105-120.

Calvino B (2023). Inflammation aiguë, inflammation chronique : arthrite rhumatoïde (AR) et ostéoarthrite (OA), Douleurs : Évaluation - Diagnostic – Traitement. *24(3): 130-146.*

Références Bibliographiques

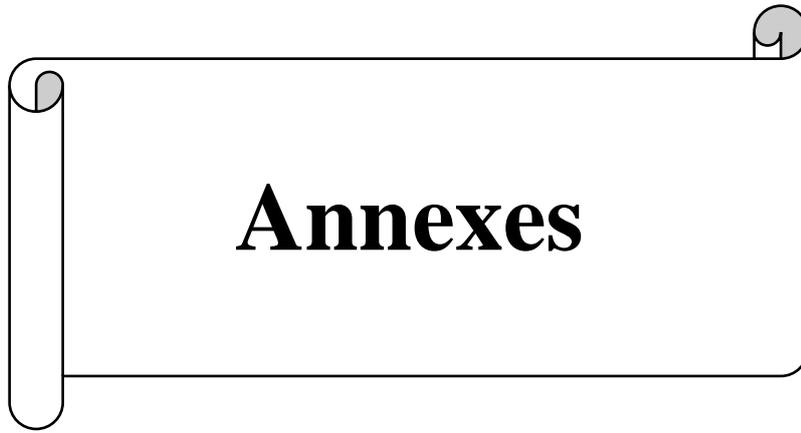
- Chandra S, Chatterjee P, Dey P, Bhattacharya S (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(1) :178-180.
- Dinarello CA (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*. 140(6):935-50.
- Ferreres F, Andrade C, Gomes NGM, Andrade PB, Gil-Izquierdo A, Pereira DM, Suksungworn R, Duangsrissai S, Videira RA, Valentão P (2021). Valorisation of kitul, an overlooked food plant: Phenolic profiling of fruits and inflorescences and assessment of their effects on diabetes-related targets. *Food Chem*. 342:128323.
- Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177(1):91-104.
- García-Lafuente A, Moro C, Manchón N, Gonzalo-Ruiz A, Villares A, Guillamón E, Rostagno M, Mateo-Vivaracho L (2014). In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chem*.161:216-23.
- Hassan MSA, Ahmed EM, El-Malah AA, Kassab AE (2022). Anti-inflammatory activity of pyridazinones: A review. *Arch Pharm (Weinheim)*.355(8):e2200067.
- Husain MI, Strawbridge R, Stokes PR, Young AH (2017). Anti-inflammatory treatments for mood disorders: Systematic review and meta-analysis. *J Psychopharmacol*. 31(9):1137-1148.
- John KK, Fatou Shcherazade OS, Georges A, N'guessan Ernest Z, Koffi Roger K, Kouassi Emile B, Kangah Mireille KT, Jean-Jacques KK, Severin K (2021). Activité Anti-Inflammatoire Et Études Phytochimiques De L'extrait Aqueux Des Écorces *Distemonanthus Benthamianus* Baill. (Caesalpiniaceae : Leguminosae - Caesalpinioideae). *European Scientific Journal*, ESJ. 17(7) :74.
- Joshi DR, Adhikari N (2019). "An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity". *Journal of Pharmaceutical Research International*. 28(3): 1–18.
- Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT (2017). Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 127(3):750-760.
- Kohler O, Krogh J, Mors O, Benros ME (2016). Inflammation in Depression and the Potential for Anti-Inflammatory Treatment. *Curr Neuropharmacol*.14(7):732-42.
- Le Dare B, Lagente V, Gicquel T (2019). Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. *Drug Metabolism Reviews*. 51 (4):545-561.
- Leporrier M (2011). Anémies hémolytiques immunologiques. *EMC - Traité de Médecine AKOS*. 6(4) : 1–5.

Références Bibliographiques

- Li W, Zhou J, Xu Y (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep.*3(5):617-620.
- Lippi G, Plebani M (2019). Identification and management of spurious hemolysis: controversies, concerns and criticisms. *Clin Chem Lab Med.*57(11):1647-1649.
- Loustau V, Guillaud C, Garcon L, Godeau B, Michel M (2011). Anémie hémolytique chez l'adulte : principales causes et démarche diagnostique. *La Presse Médicale.* 40 (5) :470-485.
- Maguirgue K, Wangso H, Oksom J-BS, Bakaranga-Via I, Nadjiouroum NA, Otchom B (2022). Evaluation phytochimique, potentiels antioxydants et anti-inflammatoires in vitro des extraits des feuilles de *Commelina benghalensis* Linn. (Commelinaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 16(6): 2673-2684.
- Maroziene A, Kliukiene R, Sarlauskas J, Cenas N (2000). Inhibition of phthalocyanine-sensitized photohemolysis of human erythrocytes by polyphenolic antioxidants: Description of quantitative structure-activity relationships. *Cancer letters.* 157: 39-44.
- Morató J, Xicota L, Fitó M, Farré M, Dierssen M et Torre R (2015). Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Molecules* .20: 4655-4680.
- Merah O, Sayed-Ahmad B, Talou T, Saad Z, Cerny M, Grivot S, Evon P, Hijazi A (2020). Biochemical Composition of Cumin Seeds, and Biorefining Study. *Biomolecules.* 10(7):1054.
- Muster D (2005). Médicaments de l'inflammation. EMC – Stomatologie. 1(1) :11-29.
- Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB (2019). Inflammation and cancer. *Ann Afr Med.* 18(3):121-126.
- Ngbolua KH, Rafatro H, Rakotoarimanana RS, Urverg V, Mudogo PT, Mpiana DST, Tshibangu (2012). Pharmacological screening of some traditionally-used antimalarial plants from the Democratic Republic of Congo compared to its ecological taxonomic equivalence in Madagascar. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 1797-1804.
- Oyedapo OO, Akinpelu BA, Akinwunmi KF, Adeyinka MO, Sipeolu FO (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.
- Prozzi GR, Cañas M, Urtasun MA, Buschiazzi HO, Dorati CM, Mordujovich-Buschiazzi P (2018). Cardiovascular risk of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Medicina (B Aires).*78(5):349-355.

Références Bibliographiques

- Qamar M, Akhtar S, Ismail T, Yuan Y, Ahmad N, Tawab A, Ismail A, Barnard RT, Cooper MA, Blaskovich MAT, Ziora ZM (2021). *Syzygium cumini*(L.), Skeels fruit extracts: In vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *J Ethnopharmacol.* 271:113805.
- Ribeiro TB, Oliveira AL, Costa C, Nunes J, Vicente AA, Pintado M (2020). Total and Sustainable Valorisation of Olive Pomace Using a Fractionation Approach. *Appl. Sci.* 10(19): 6785.
- Sadique J, Al-Rqobah WA, Bughaith MF, et El-Gindy AR (1989). The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia.* 60: 525-532.
- Sesti-Costa R, Costa FF, Conran N (2023). Role of Macrophages in Sickle Cell Disease Erythrophagocytosis and Erythropoiesis. *Int J Mol Sci.* 24(7):6333.
- Shankaran KS, Ganai SA, K P A, P B, Mahadevan V (2017). In silico and In vitro evaluation of the anti-inflammatory potential of *Centratherum punctatum* Cass-A. *J Biomol Struct Dyn.* 35(4):765-780.
- Shen P, Wang W, Xu S, Du Z, Wang W, Yu B, Zhang J (2020). Biotransformation of Erythrodiol for New Food Supplements with Anti-Inflammatory Properties. *J Agric Food Chem.* 68(21):5910-5916.
- Shimazu K, Fukumitsu S, Ishijima T, Toyoda T, Nakai Y, Abe K, Aida K, Okada S, Hino A (2019). The Anti-Arthritis Effect of Olive-Derived Maslinic Acid in Mice is Due to its Promotion of Tissue Formation and its Anti-Inflammatory Effects. *Mol Nutr Food Res.* 63(3):e1800543.
- Sultana B, Anwar F, Ashraf M (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules.* 14(6):2167-80.
- Vieira Junior FU, Antunes N, Vieira RW, Alvares LM, Costa ET (2012). Hemolysis in extracorporeal circulation: relationship between time and procedures. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 27(4):535-41.
- Weill B, Batteux F, Dhainaut J (2003). Immunopathologies et réactions inflammatoires. De Boek Université, Paris. 12-23p.
- 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.

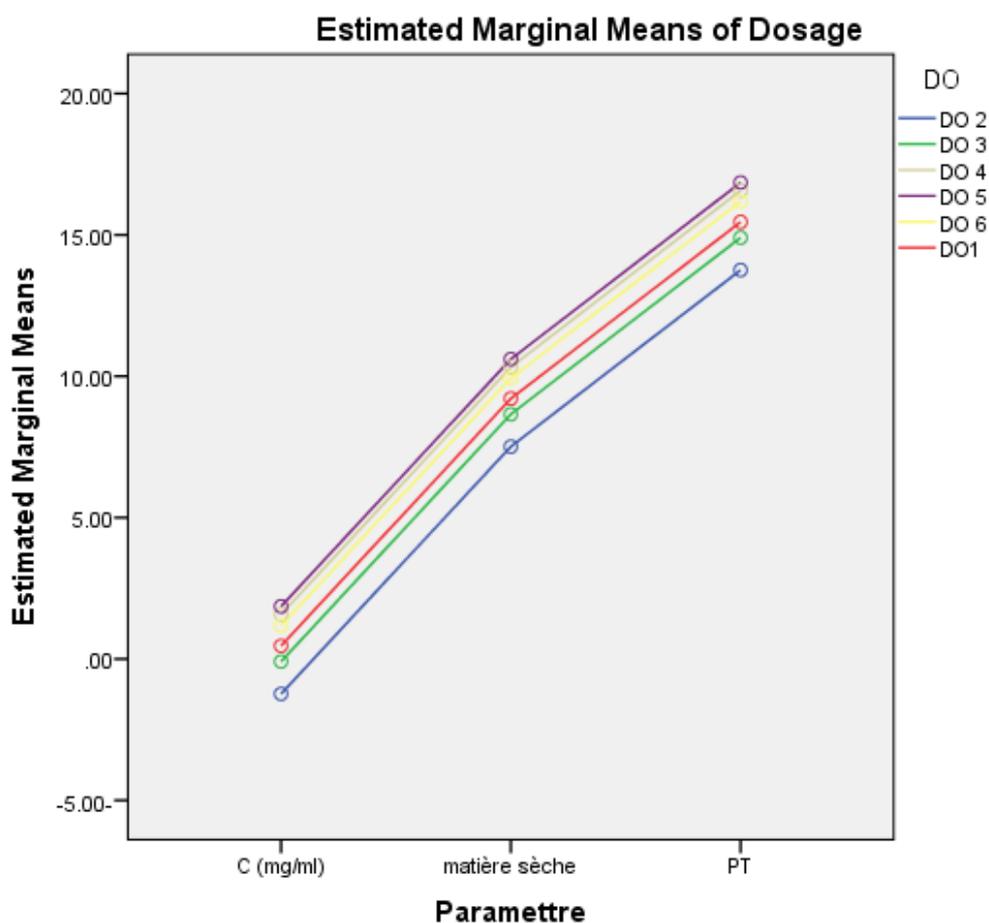


Annexes

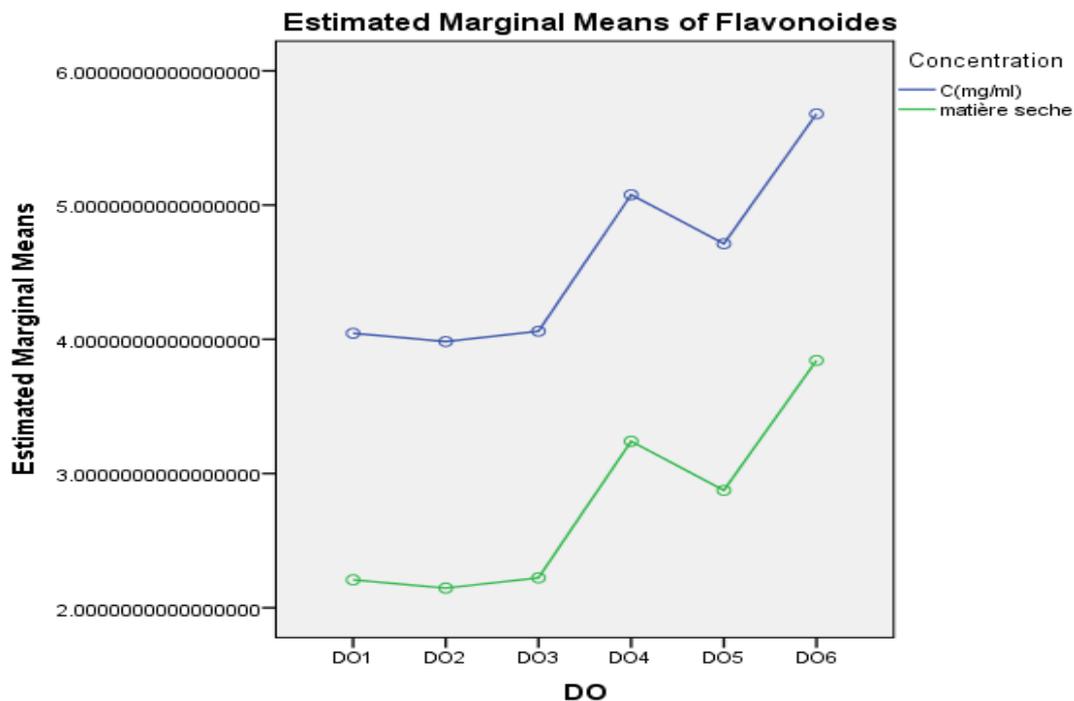
Tableau A1 : Teneurs des phénols totaux, flavonoïdes et tanins dans les deux extraits

Teneurs (mg/g)	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins
E. non délipidé	8.48±0.50	2.33±0.03	0.61±0.01
E. délipidé	10.36±0.76	3.17±0.36	0.34±0.03
P-value	0.027	0.004	0.015

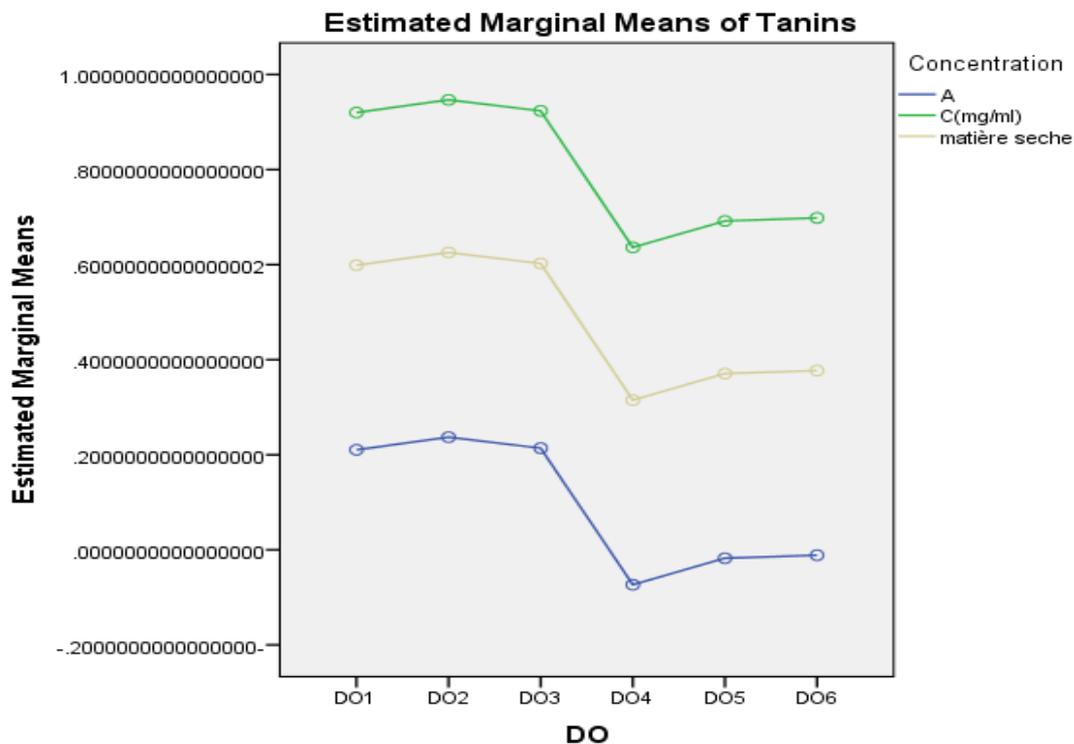
Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart type. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA et complétée par le test de Turkey. Un p -value inférieur à 0,05 a été considéré significatif. Chaque manipulation a été répétée 3 fois.



Annexe 02 : Estimation des absorbances en fonction de la concentration des polyphénols des deux extraits (délipidé et non délipidé) : Etude de corrélation



Annexe 03 : Estimation des absorbances en fonction de la concentration des flavonoïdes des deux extraits (délipidé et non délipidé) : Etude de corrélation



Annexe 04 : Estimation des absorbances en fonction de la concentration des tanins condensés des deux extraits (délipidé et non délipidé) : Etude de corrélation



Annexe 05 : La structure de Tyrosol et d' Hydroxytyrosol ; des composés phénoliques dans les grignons d'olive.

Tableau A6 : Poids corporel et gain de poids des rats témoins et expérimentaux.

Lots	Poids initial(g)	Poids final (g)	Gain de poids(g)	Nourriture ingérée (g/j/rat)
Témoins	110±2.13 ^a	190±1.25 ^c	81±1.05 ^d	19.04±0.12 ^b
T+200mg/kg	125±2.23 ^a	248±1.36 ^b	123±3.07 ^c	19.6±2.45 ^b
TC	117±2.13 ^a	220±3.41 ^c	104±2.03 ^{cd}	20.03±1.22 ^b
O	84±2.1 ^b	260±4.12 ^a	177±2.23 ^b	35±2.23 ^a
O+ 200mg/kg	83±1.23 ^b	271±1.26 ^a	186±2.45 ^a	34±0.23 ^a
P(ANOVA)	0.023	0.0001	0.0001	0.015

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. T: rats témoins; TG: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; OG: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A7 : Teneurs plasmatiques en paramètres biochimiques chez les rats expérimentaux comparés aux témoins.

Paramètres/ Lots	T	T+GO	O	O+GO	TC	P(ANOVA)
Glucose (mg/dl)	124.73±0.79 ^b	120.19±0.77 ^b	153.84±0.70 ^a	115.16±0.86 ^b	128.54±0.74 ^b	0.023
Triglycérides (mg/dl)	58.41±0.91 ^b	34.95±0.52 ^c	123.64±0.64 ^a	80.72±0.70 ^{ab}	84.61±0.39 ^{ab}	0.0001
Cholestérol (mg/dl)	34.94±0.35 ^b	29.69±0.96 ^b	178.76±0.70 ^a	100.25±0.78 ^{ab}	42.7±0.66 ^b	0.0001
HDLc (mg/dl)	63.35±0.99 ^b	62.15±2.20 ^b	53.31±0.74 ^c	78.09±1.01 ^a	66.27±1.19 ^b	0.0001
TGO (UI/L)	75.73±0.64 ^b	78.96±0.53 ^b	96.93±0.80 ^a	61.93±0.75 ^c	71.04±0.94 ^b	0.001
TGP (UI/L)	34.81±0.43 ^c	34.81±0.44 ^c	67.03±0.78 ^a	48.45±0.95 ^b	38.96±0.26 ^a	0.001
Urée (mg/dl)	30.20±1.05 ^b	32.08±2.96 ^b	66±0.42 ^a	40.22±1.36 ^b	14.96±1.12 ^b	0.015
Créatinine (mg/L)	5.80±0.42 ^c	6.76±0.89 ^{bc}	11.68±0.47 ^a	8.38±0.90 ^b	5.09±0.75 ^c	0.001
Protéines totales (g/dl)	3.73±0.66 ^c	6.31±0.57 ^b	11.01±0.87 ^a	5.94±0.44 ^b	4.41±0.98 ^b	0.0001

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± ET. T: rats témoins; T+Go: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; O+GO: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A8 : Marqueurs du statut oxydant chez les rats témoins et les différents lots traités par l'extrait des GO.

Paramètre/Lot	T	T+GO	O	O+GO	TC	P(ANOVA)
Vit c (µg/ml) (plasmatique)	33.34±0.91	34.02±0.20	32.36±0.28	33.92±1.74	29.35±1.02	0.38
MDA (µmol/L)	0.70±0.09 ^b	0.69±0.07 ^b	1.05±0.05 ^a	0.97±0.12 ^a	0.66±0.04 ^b	0.0001
SOD (mM/min/ml)	377.37±0.71 ^b	398.82±1.27 ^c	345.64±0.56 ^b	345.46±3.71 ^a	378.32±4.49 ^b	0.0001
GSH (µmol/L)	0.17±0.02	0.20±0.90	0.14±0.09	0.18±0.17	0.19±1.02	0.024
Protéines carbonylés (µmol/L)	0.30±0.07	0.29±0.08	0.38±0.09	0.32±0.17	0.28±0.03	0.371
Catalase (U/min/ml)	253.2±3.25 ^a	253.02±1.12 ^a	232.20±1.25 ^b	238.23±2.23 ^b	254.02±0.20 ^a	0.0001

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± ET. T: rats témoins; T+Go: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; O+GO: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A9 : Variation des poids des organes chez les rats témoins et les rats traités par l'extrait des GO.

Lot/poids d'organe (g)	Foie	Rein	Rate	Intestin	Muscle	TA
T	4.5±0.07 ^b	1.07±0.10 ^b	0.46±0.03	4.14±0.33 ^b	3.45±0.02 ^b	3.68±0.11 ^c
TG	4.58±0.28 ^b	0.95±0.18 ^b	0.48±0.25	4.05±0.64 ^b	3.54±0.4 ^b	3.51±0.14 ^c
O	6.55±0.14 ^a	2.55±0.01 ^a	0.55±0.03	6.23±0.84 ^a	4.54±0.33 ^a	7.42±0.14 ^a
OG	5.12±0.23 ^b	1.23±0.05 ^b	0.52±0.06	4.12±0.35 ^b	4.05±0.54 ^a	5.45±0.03 ^b
TC	4.39±0.12 ^b	1.06±0.03 ^b	0.50±0.33	4.35±0.12 ^b	3.66±0.48 ^b	3.57±0.21 ^c
P(ANOVA)	0.003	0.0001	0.235	0.0001	0.001	0.0001

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. T: rats témoins; TG: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; OG: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A10 : Teneurs en paramètres lipidiques, protéines totales (mg/g tissu) et les paramètres de statut oxydant au niveau du foie.

Paramètres	T	TG	O	OG	TC	P(ANOVA)
Cholestérol (mg/g)	13.19±0.73 ^d	13.03±0.06 ^d	20.05±0.52 ^a	15.38±0.52 ^b	14.08±0.03 ^c	0.0001
TG (mg/g)	19.99±0.33 ^{cd}	18.95±0.21 ^d	29.28±0.81 ^a	23.30±0.54 ^b	20.73±0.52 ^c	0.0001
Protéines totales (mg/g)	98.26±0.84 ^c	97.60±0.58 ^c	119.14±5.5 ^a	108.51±2.4 ^b	98.26±0.88 ^c	0.0001
MDA (µmol/g)	6.17±0.25 ^b	6.25±0.31 ^{bc}	9.05±0.29 ^a	9.02±0.18 ^b	6.68±0.38 ^b	0.0001
P. carbonylés (µmol/g)	1.18±0.15 ^b	1.18±0.09 ^b	3.13±0.25 ^a	3.08±0.09 ^a	1.27±0.14 ^b	0.0001
GSH (µmol/g)	3.28±0.24 ^{ab}	3.79±0.61 ^a	2.48±0.65 ^{bc}	2.49±0.18 ^c	3.55±0.51 ^a	0.001
Catalase (U/min/g)	1.04±0.07 ^{ab}	1.075±0.07 ^a	0.90±0.09 ^b	0.9±0.03 ^b	1.02±0.08 ^{ab}	0.014
SOD (U/g)	3.29±0.36	3.21±0.15	3.26±0.13	3.34±0.19	3.24±0.12	0.93

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. T: rats témoins; TG: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; OG: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A11 : Teneurs en paramètres lipidiques, protéines totales (mg/g tissu) et les paramètres de statut oxydant au niveau du rein.

Paramètres	T	TG	O	OG	TC	P(ANOVA)
Cholestérol (mg/g)	16.97±0.30 ^c	16.69±0.14 ^c	20.11±0.76 ^a	19.08±0.09 ^b	17.07±0.10 ^c	0.0001
TG (mg/g)	18.32±0.66 ^b	15.63±0.60 ^c	22.60±1.57 ^a	19.78±1.24 ^b	18.49±0.48 ^b	0.0001
Protéines totales (mg/g)	47.41±0.48 ^b	47.83±0.60 ^b	49.78±0.50 ^a	49.49±0.41 ^a	47.76±0.42 ^a	0.0001
MDA (µmol/g)	1.14±0.06 ^b	1.12±0.09 ^b	2.07±0.07 ^a	2.02±0.07 ^a	1.16±0.06 ^b	0.0001
P. carbonylés (µmol/g)	2.22±0.19 ^c	2.71±0.43 ^b	3.88±0.22 ^a	3.92±0.19 ^a	2.87±0.27 ^b	0.0001
GSH (µmol/g)	2.08±0.07 ^a	2.12±0.03 ^a	1.35±0.16 ^b	1.23±0.14 ^b	2.20±0.21 ^a	0.0001
Catalase (U/min/g)	4.05±0.07 ^a	4.21±0.08 ^a	4.09±0.05 ^a	4.16±0.11 ^a	3.33±0.18 ^b	0.0001
SOD (U/g)	3.51±0.10 ^a	3.47±0.02 ^a	3.50±0.09 ^a	3.62±0.40 ^b	3.22±0.17 ^a	0.0001

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. T: rats témoins; TG: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; OG: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A12 : Teneurs en paramètres lipidiques, protéines totales (mg/g tissu) et les paramètres de statut oxydant au niveau de la rate.

Paramètres	T	TG	O	OG	TC	P(ANOVA)
Cholestérol (mg/g)	12.24±0.16 ^{ab}	11.99±0.12 ^b	12.51±0.04 ^a	12.39±0.04 ^a	11.94±0.22 ^b	0.0001
TG (mg/g)	27.82±0.35 ^b	28.08±0.05 ^{ab}	29.33±1.04 ^a	28.68±0.57 ^{ab}	28.67±0.49 ^{ab}	0.024
Protéines totales (mg/g)	11.24±0.20 ^c	12.10±0.05 ^{ab}	12.28±0.03 ^a	12.03±0.08 ^b	11.23±0.08 ^c	0.0001
MDA (µmol/g)	4.73±0.08 ^b	4.71±0.07 ^b	4.90±0.08 ^a	4.91±0.05 ^a	4.80±0.04 ^{ab}	0.002
P. carbonylés (µmol/g)	3.70±0.05 ^a	3.1±0.03 ^c	3.32±0.15 ^b	3.09±0.05 ^c	3.11±0.02 ^c	0.0001
GSH (µmol/g)	5.02±0.02 ^b	5.15±0.03 ^a	4.32±0.08 ^c	4.30±0.04 ^d	5.08±0.04 ^{ab}	0.0001
Catalase (U/min/g)	9.77±0.07 ^a	9.07±0.03 ^c	9.18±0.02 ^b	9.17±0.04 ^b	9.22±0.02 ^b	0.0001
SOD (U/g)	3.55±0.04 ^a	3.37±0.15 ^{ab}	3.31±0.09 ^b	3.21±0.03 ^b	3.27±0.03 ^b	0.001

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. T: rats témoins; TG: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; OG: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A13 : Teneurs en paramètres lipidiques, protéines totales (mg/g tissu) et les paramètres de statut oxydant au niveau du tissu adipeux.

Paramètres	T	TG	O	OG	TC	P(ANOVA)
Cholestérol (mg/g)	26.08±0.20 ^{bc}	22.77±0.46 ^c	28.45±0.46 ^a	26.01±0.88 ^b	26.29±0.47 ^b	0.0001
TG (mg/g)	28.96±0.63 ^b	26.11±0.94 ^c	33.002±0.68 ^a	30.36±0.83 ^b	28.86±0.65 ^b	0.0001
Protéines totales (mg/g)	2.16±0.02 ^{bc}	2.13±0.02 ^c	3.11±0.02 ^a	3.13±0.01 ^a	2.19±0.02 ^b	0.0001
MDA (µmol/g)	1.63±0.13 ^c	1.65±0.04 ^c	2.47±0.30 ^a	2.05±0.18 ^b	1.65±0.04 ^c	0.0001
P. carbonylés (µmol/g)	0.02±0.002 ^b	0.02±0.001 ^b	0.03±0.002 ^a	0.03±0.001 ^a	0.02±0.001 ^b	0.0001
GSH (µmol/g)	3.71±0.21 ^a	3.83±0.12 ^a	2.30±0.28 ^b	2.32±0.16 ^b	3.60±0.18 ^a	0.0001
Catalase (U/min/g)	1.02±0.02 ^b	1.26±0.06 ^a	0.97±0.02 ^b	1.02±0.009 ^b	1.01±0.01 ^b	0.0001
SOD (U/g)	2.06±.03 ^b	2.21±0.07 ^a	2.05±0.01 ^b	2.11±0.01 ^b	2.09±0.001 ^b	0.001

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. T: rats témoins; TG: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; OG: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A14 : Teneurs en paramètres lipidiques, protéines totales (mg/g tissu) et les paramètres de statut oxydant au niveau de l'indistinct.

Paramètres	T	TG	O	OG	TC	P(ANOVA)
Cholestérol (mg/g)	6.03±0.05 ^c	6.02±0.05 ^c	7.24±0.11 ^a	7.10±0.08 ^a	6.39±0.22 ^b	0.0001
TG (mg/g)	23.1±0.04 ^b	20.37±0.76 ^c	25.00±0.32 ^a	22.86±0.56 ^b	23.35±0.08 ^b	0.0001
Protéines totales (mg/g)	10.11±0.34 ^c	11.09±0.37 ^{ab}	11.89±0.29 ^a	11.93±0.55 ^a	10.88±0.36 ^b	0.0001
MDA (µmol/g)	3.21±0.08 ^b	3.22±0.14 ^b	5.36±0.27 ^a	5.04±0.14 ^a	3.36±0.25 ^b	0.0001
P. carbonylés (µmol/g)	3.46±0.23 ^b	3.28±0.23 ^b	5.11±0.10 ^a	5.00±0.23 ^a	3.62±0.20 ^b	0.0001
GSH (µmol/g)	5.23±0.12 ^a	5.34±0.10 ^a	4.66±0.27 ^b	4.75±0.15 ^b	5.19±0.14 ^a	0.0001
Catalase (U/min/g)	6.02±0.22	6.36±0.29	5.41±0.30	5.37±0.46	6.05±0.11	0.23
SOD (U/g)	3.03±0.31 ^{ab}	3.33±0.25 ^a	2.91±0.25 ^{bc}	3.42±0.18 ^c	3.22±0.13 ^{ab}	0.043

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. T: rats témoins; TG: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; OG: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A15 : Teneurs en paramètres lipidiques, protéines totales (mg/g tissu) et les paramètres de statut oxydant au niveau du muscle.

Paramètres	T	TG	O	OG	TC	P(ANOVA)
Cholestérol (mg/g)	3.84±0.09 ^b	3.65±0.08 ^b	4.68±0.10 ^a	4.37±0.24 ^a	3.75±0.18 ^b	0.0001
TG (mg/g)	20.05±0.20 ^c	19.76±0.50 ^c	24.74±0.63 ^a	23.30±0.8 ^b	20.37±0.34 ^c	0.0001
Protéines totales (mg/g)	29.84±0.57 ^d	31.04±0.54 ^{bc}	32.56±0.61 ^a	32.04±0.35 ^{ab}	30.15±0.23 ^{cd}	0.0001
MDA (µmol/g)	4.55±0.25 ^{bc}	4.32±0.16 ^c	5.03±0.14 ^a	5.01±0.10 ^{ab}	4.52±0.32 ^c	0.001
P. carbonylés (µmol/g)	2.45±0.17 ^b	2.31±0.12 ^b	3.38±0.20 ^a	3.35±0.17 ^a	2.31±0.23 ^b	0.0001
GSH (µmol/g)	0.99±0.03 ^{bc}	1.06±0.07 ^{ab}	0.91±0.10 ^c	1.21±0.05 ^a	1.07±0.06 ^{ab}	0.0001
Catalase (U/min/g)	3.25±0.11	3.27±0.10	3.08±0.10	3.19±0.17	3.31±0.19	0.251
SOD (U/g)	3.35±0.18	3.35±0.23	3.36±0.22	3.37±0.27	3.39±0.22	0.998

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. T: rats témoins; TG: rats témoins traités par l'EMB des GO 200 mg/Kg; O: rats obèses; OG: rats obèses traités par l'EMB à 200 mg/Kg; TC : rats contrôle. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey. afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A16 : Evolution des poids corporels des rats témoins et expérimentaux au cours du test de la toxicité aiguë.

Evolution du poids	TM	L1	L2	L3	L4	P(ANOVA)
Poids initial(g)	203.66±4.16 ^b	251.33±7.57 ^a	194.33±8.38 ^b	192.33±6.80 ^b	185±5 ^c	0.0001
Semaine1(%)	5.82±0.86 ^a	4.8±0.49 ^{ab}	3.49±0.66 ^b	2.86±0.77 ^c	2.31±0.23 ^c	0.003
Semaine2(%)	8.12±0.71 ^a	6.72±0.52 ^b	6.12±0.38 ^b	4.95±0.93 ^c	4.61±0.34 ^c	0.003

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. TM : Témoins ; L1 : rates traitées par la dose 200mg/kg ; L2 : rates traitées par la dose 2000mg/kg ; L3 : rates traitées par la dose 3000mg/kg ; L4 : rates traitées par la dose 5000mg/kg. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A17 : Teneurs plasmatiques des transaminases et paramètres rénaux chez les rats témoins et les rats traités par l'extrait des GO au cours du test de toxicité aiguë.

Paramètres/Lot	T	L1	L2	L3	L4	P(ANOVA)
Urée (mg/dl)	18.42±0.79 ^b	16.34±0.21 ^b	25.81±0.56 ^a	29.77±0.94 ^a	30.82±0.45 ^a	0.001
Créatinine (mg/dl)	0.60±0.01 ^c	0.61±0.01 ^c	0.66±0.01 ^b	0.67±0.01 ^b	0.75±0.01 ^a	0.0001
TGO (UI/L)	99.50±1.42 ^a	99.28±1.08 ^a	97.5±0.90 ^{ab}	95.20±0.96 ^b	99.31±0.95 ^a	0.003
TGP (UI/L)	35.02±0.001 ^b	35.22±0.03 ^a	35.68±0.02 ^a	35.60±0.03 ^a	35.78±0.14 ^a	0.014

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. TM : Témoins ; L1 : rates traitées par la dose 200mg/kg ; L2 : rates traitées par la dose 2000mg/kg ; L3 : rates traitées par la dose 3000mg/kg ; L4 : rates traitées par la dose 5000mg/kg. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey, afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A18 : Evolution des poids corporel des rats témoins et expérimentaux au cours du test de la toxicité subaiguë.

	TM	L1	L2	L3	L4	L5	p-value
Poids initial(g)	233,33±2,08 ^a	198,33±3,06 ^b	184,67±6,81 ^c	184,33±9,45 ^c	138,67±7,02 ^{cd}	115,00±4,00 ^d	0,0001
Semaine1(%)	4,98±0,84 ^b	2,79±0,92 ^c	2,28±0,24 ^c	3,69±1,79 ^{bc}	8,94±0,28 ^a	2,14±0,61 ^c	0,0001
Semaine2(%)	8,64±0,33 ^b	0,58±0,17 ^d	2,05±0,82 ^c	2,53±0,31 ^c	14,18±2,91 ^a	9,71±1,31 ^b	0,0001
Semaine3(%)	17,07±0,21 ^b	3,69±0,55 ^c	5,20±0,76 ^b	5,57±0,07 ^b	19,68±1,98 ^a	19,04±1,27 ^a	0,0001
Semaine4(%)	23,20±0,98 ^b	4,93±0,38 ^e	7,38±1,49 ^d	11,01±1,24 ^c	27,27± 1,83 ^a	20,51±1,12 ^b	0,0001

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± S.D. TM : Témoins ; Lot1 : rates traitées par la dose 3.12mg/kg ; Lot2 : rates traitées par la dose 31.25mg/kg ; Lot3 : rates traitées par la dose 125mg/kg ; Lot4 : rates traitées par la dose 500mg/kg ; Lot5 : rates traitées par la dose 2000mg/kg. Après vérification de la distribution normale des variables, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test Tukey , afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d, ...) sont significativement différentes à P<0,05.

Tableau A19 : Analyse de régression et étude des corrélations des différents tests : cytotoxicité, anti-hémolytique et anti-inflammatoire des extraits des GO.

	Dose d'extrait éthanolique		Dose d'extrait méthanolique		Acide gallique		Diclofénac	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Cytotoxicité	0,973	0,0001	0,977	0,0001	0,972	0,0001		
Activité anti hémolytique	0,982	0,0001	0,869	0,0001	0,295	0,286	0,983	0,0001
Activité anti inflammatoire	0,953	0,0001	0,953	0,0001			0,957	0,0001



ASSESSMENT OF ACUTE AND SUB-ACUTE TOXICITY OF OLIVE POMACE IN FEMALE WISTAR RATS

Z. BADI¹, B. GUERMOUCHE¹, N. HADDAM¹, N. BELYAGOUBI², K. ROUIGUEB¹, H. BENZERJEB³, M. DALI-SAHI⁴, Y. KACHEKOUCHE⁴, H. MERZOUK¹

¹Department of Biology, Physiology, Physiopathology and Biochemistry of Nutrition Laboratory, Faculty of Natural and Life Sciences, Earth and Universe, University Abou-Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algeria.

²Department of Biology, Natural Products Laboratory, Analytical Chemistry and Electrochemistry Laboratory, Abou Bekr Belkaid University, Tlemcen, Algeria.

³Histopathology Laboratory, Faculty of Medicine, Abou Bekr Belkaid University, Tlemcen, Algeria.

⁴Department of Biology, Analytical Chemistry and Electrochemistry Laboratory, Abou Bekr Belkaid University, Tlemcen, Algeria

Abstract – Objective: Olive Pomace (OP) is considered to be a rich source of phenolic compounds. Recently many researches showed a broad biological activity of this by-product of the olive oil production process in addition to their emergence as value-added materials with potential applications in the pharmaceutical, food, and nutraceutical industries. The present study is aimed to evaluate in vivo toxicological activities of OP.

Materials and Methods: The qualitative phytochemical analysis aims to determine the key phytoconstituents found in OP. For the in vivo study, two types of tests are performed: acute and 28-day repeated oral toxicity studies in Wistar rats for evaluation of hematological, biochemical, and histological parameters.

Results: The qualitative phytochemical analysis has revealed the presence of polyphenols, flavonoids, tannins, saponins, quinones, anthraquinones, terpenoids, and compounds reduced in our methanol extract of OP. In acute oral toxicity, no treatment-related death or toxic signs are observed in female rats for 14 days in 200, 2000, 3000, and 5000 mg/kg doses, besides LD50 value is found to be up to 2000 mg/kg bodyweight. As for the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. 28-days sub-acute toxicity study is carried in female rats at four dose levels (3.12, 31.25, 125 and 500 mg/kg), no changes in observation related death and toxic signs when compared with control. The hematological and biochemical investigation shows a significant change ($p > 0.05$) in the high-level doses (500 mg/kg).

Conclusions: According to the findings of this study, OP extract has the potential to be used to generate new anti-cancer and antioxidant additives for pharmaceutical and food manufacturing. Long-term in vivo toxicological tests should also be conducted to determine a safe dosage of OP extract.

KEYWORDS: Olive pomace, Methanol extract, Acute toxicity, Sub-acute toxicity.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)



INTRODUCTION

Complementary and alternative medicine (CAM) is defined as the use of practices and biological substances in place and together with conventional medicine, including cancer patients¹⁻³. With the rapid development of the olive fruit processing industry around the world, Olive Pomace (OP) as a waste from the olive oil industry is respectively increasing, with massive quantities produced each year⁴. However, only small amounts of olive mill waste are re-used, mainly as fertilizers, biomass, or additive in animal food, while a large quantity remains without actual application⁵.

Recent research has demonstrated that OP has broad biological activities, such as anti-inflammatory, hepatoprotective, gastro protective, anti-ulcer, anti-HIV, anticancer, anti-diabetic, hypolipidaemic, antiatherosclerotic and immunoregulatory effects⁶. A wide range of phenolic compounds have been identified in virgin oil, including phenolic alcoholic, secoiridoid derivatives, phenolic acids and flavonoids. However, only about 2% of the total phenols found in olive fruits are transferred to the extracted olive oil, while the other 98% are retained in the olive cake. The analysis of these phenolic extracts has demonstrated their high antioxidant and anticancer activity and suggested their potential use as additives for the food industry⁷.

Olive cake has been considered to be an interesting biological source of phenolic compounds⁸, without Bisphenol A (additive for polycarbonate plastics), the main cause of endocrine disruption associated to cancer risk and cardiovascular diseases^{9,10}. Several researches focus on the extraction optimization of these secondary metabolites activities, proved by different *in vivo* pharmacological studies¹¹.

The use of small laboratory animals such as the rat is convenient and very essential to perform toxicological studies^{12,13} in order to identify adverse effects and to determine limits of exposure level at which such effects occur¹⁴. Some doses have beneficial effects but increasing exposure will, at some point, cause harmful effect and the substance is considered toxic at that level¹⁵. Toxicological research and testing help to live safely and predict benefit from synthetic and natural substance, avoiding harm¹³.

To validate the use of this phenolic extracts and to demonstrate their impact in the healthcare, toxicological studies are necessary. Conventionally in the presence of an unknown substance, the first step in the search for pharmacological activity begins with the study of toxicity and in particular by evaluation of the lethal dose 50 (DL 50)¹⁶.

The border between drug and toxic is vague. It is often a question of dose¹⁷. Despite the widespread

use of OP in pharmaceutical, food and nutraceutical industries and to ensure their safety, it's necessary to determine the application dose through the sub chronic toxicity study. There is a lack of experimental data on possible toxicity of OP. To avoid this situation, the present study aims to search for OP safety data focusing on acute toxicity and 28-day sub chronic toxicity of hydro methanolic extract of OP administered orally in female Wistar rat. The present study aims to test *in vivo* toxicological activities of hydromethanolic OP extract.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

OP WAS collected from Tlemcen in Northwest of Algeria; the plant has been identified in the Laboratory (PPABIONUT) of the Department of Biology, University of Tlemcen.

Preparation of extract

OP was dried in ambient air in the room, sheltered from the sun then finely powdered. 50 g of OP powder were macerated in 800 ml of methanol and 200 ml of distilled water for 24 h on a shaker at 100 rpm, the resultant extract filtered through a fine muslin cloth, and then a filter paper Whatman (Grade 1-Circles, 150 mm). The filtrate was dried by using Eyela rotary evaporator at 45°C until getting powder. This methanol extract dissolved in 5% of DMSO before use.

Phytochemical study

The qualitative phytochemical study was performed to identify the main phytoconstituents¹⁸ present in the OP by using standard procedures as described by Trease and Evans¹⁹ and Harborne et al²⁰.

Animals

Females Albino Wistar rats were used for the acute and sub-acute oral toxicology tests, obtained from Pasteur Laboratories (Alger, Algeria). The rats were adult (8-10 weeks) weigh between 140 g-200 g. They were raised at ambient temperature of 22±3°C with 40 to 50% moisture and a photoperiod of 12 hours light and 12 hours darkness¹⁸. Experimental protocols adopted were based on World Health Organization Guidelines for care and use of laboratory animals. The experimental usage of the

animals was approved by the Ethics Committee of the National Ethics Committee for Control and Supervision of Experiments on Animals. The animals were distributed into five groups of 3 rats each for acute oral toxicity and four groups of 5 rats each for sub-acute oral toxicity.

Acute oral toxicity

Healthy female Wistar rats were used in this study according to the instructions of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) for acute oral toxicity tests²¹. All animals were fasted overnight, but with free access to water and weighed before administration of the extract. 15 female SD rats were randomly divided into 5 groups of 3 rats each, group1 (negative control) was administered DMSO (5%) and saline solution. Four groups test was administered methanol OP extract at dose 200, 2000, 3000 and 5000 mg/kg body weight of OP extract respectively. The observations focused on mortality, convulsions, salivations, tremors, sleep and coma each day for 14 days. The body weights of animals recorded shortly before the administration of the tested substance and at the end of each week.

Sub acute oral toxicity

For this study, the rats (30 females) were divided into five groups of five each; four of these lots were treated with the different doses of the extract (3.12, 31.25, 125 and 500 mg/kg) and the fifth was administered with the vehicle (control) according to the OECD 407 guideline²². The OP extract was administered by gavage (1 ml/100 g) daily for 28 consecutive days. Mortality, food consumption and water, body weight and observation for general toxicity signs of the animals were recorded daily. At the end of the experiment, the animals were sacrificed to collect their blood for biochemical and hematological analyzes. Organs such as liver, kidneys and white adipose tissue were collected, washed immediately in NaCl (0.9%), weighed individually and examined macroscopically. The organs removed were weighed and the relative weight of the organs was calculated. The percentage of body weight change of the animals' model calculated according to the following equation:

$$\frac{\text{Body weight at the end of each week}-\text{initial body weight} \times 100}{\text{Initial body weight}}$$

After the blood collection, the vital organs (liver, kidney, spleen and pancreas were cleaned of fat and blotted with clean tissue paper, and then weighed on balance. The relative organ's weights (ROWs) were calculated and recorded in proportion to the body weight according to the following equation:

$$\text{ROW} = \frac{\text{Absolute organ weight}}{\text{Body weight at sacrifice}} \times 100$$

Blood analysis

Biochemical analyzes included glycemia, total cholesterol, triglycerides, HDL, liver function markers (AST, ALT), and nephrotic markers (urea, creatinine), using Spinreact Kit. Hematologic parameters included red and white blood cells, hemoglobin, hematocrit, MPV, MCH, MCHC, platelets, lymphocytes, monocytes, eosinophils, neutrophils and basophils, with the unit XN-1000 (Sysmex)¹⁸, according to the manufacturer's instructions (Wakohama-Kaigandori, Chuo-Ku, Kobe, Hyogo, Japan).

Histological examination

Tissue samples from kidney, liver and white adipose tissue were collected and fixed in 10% phosphate-buffered formalin (pH 7.0) for 24 h, routinely processed, embedded in paraffin wax, cut into 2–3 μm (μm) sections and stained with hematoxylin and eosin. All the stained sections were examined for optical microscopy using Olympus microscope (Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Statistical results are represented as mean \pm standard error of mean (SEM). The differences between groups of acute and sub-acute toxicity tests determined by one way analysis of variance ANOVA (Minitab 18). The value $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Phytochemical study

Results of phytochemical screening are presented in Table 1. The phytochemical screening of methanol extract of OP showed the presence of bioactive phytochemicals such as phenols, flavonoids, tannins, saponins, quinones, terpenoids and compounds reducing.



TABLE 1. Phytochemical screening of methanol extract of *Pomace Olive*.

Phytochemical compounds	Test used	Extract of Pomace Olive
Polyphénols	Ferric chloride FeCl ₃ (2%)	+++
Flavonoids	hydrochloric acid +magnésium	++
Tannins	Ferric chloride FeCl ₃ (1%)	++
Saponins	Foam test	+++
Quinones	Sodium hydroxide (1%)	++
Anthraquinones	ammonium hydroxide NH ₄ OH (10 %)	-
Terpenoids	Chloroform+Sulfiric acid	++
Compounds reducing	Fehling liqueur	+

(-): Absence ;(+): Trace ;(++): Low presence ;(+++): high presence

Acute toxicity test

The acute toxicity results showed no evidence of toxicity of the methanolic extract of OP administered at the 200 mg/kg, 2000 mg/kg, 3000 mg/kg and 5000 mg/kg dose limit in animals during the observation period (14 days). The rats survived until the end of the observation period. Physical observation of the groups treated rats for acute oral toxicity tests throughout this study indicated that there is no sign of toxic effects in all groups.

No abnormalities were found in the organs at autopsy, hematological and biochemical parameters. The body weight did change significantly ($p < 0.05$) during the 14 days period between the PO treated groups rats had and the control. In addition, the percentage changes in body weight of the PO treated groups were significantly different compared to the control rats as ($p < 0.05$) (Figure 1). The results on the relative weight of organs showed non-significant difference ($p > 0.05$) between the different doses administered and the control on the liver, the kidney and the spleen. However, there was significantly different ($p < 0.05$) on the pancreas (Figure 2).

Sub-acute toxicity test

Administration of various doses of methanol extract of OP (3.12, 31.25, 125 and 500 mg/kg) during 28 days of treatment had significant change ($p < 0.05$) on the body weight of treated rats compared to controls in sub-acute oral toxicity (Figure 3). The results on the relative organs weight showed non-significant difference ($p > 0.05$) in groups treated compared to control on the pancreas and the kidney. On liver, the analyses reveal a significant difference ($p < 0.05$) and on the spleen ($p > 0.05$) in all treatment doses compared to control (Figure 4). For the biochemical parameters of oral sub-acute toxicity recorded in Table 2. The results showed no significant difference in ALT and total protein ($p < 0.05$) between all treated groups and control. On the other hand, the parameters such as glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL, AST, urea and creatinine recorded significant differences ($p < 0.05$), depending on the dose administered. Statistical analyses of hematological parameters showed no significant difference on several parameters (hematocrit, hemoglobin, platelets, MPV, MCH, neutrophils, monocytes, lymphocytes and basophils.) in both control and treated groups.

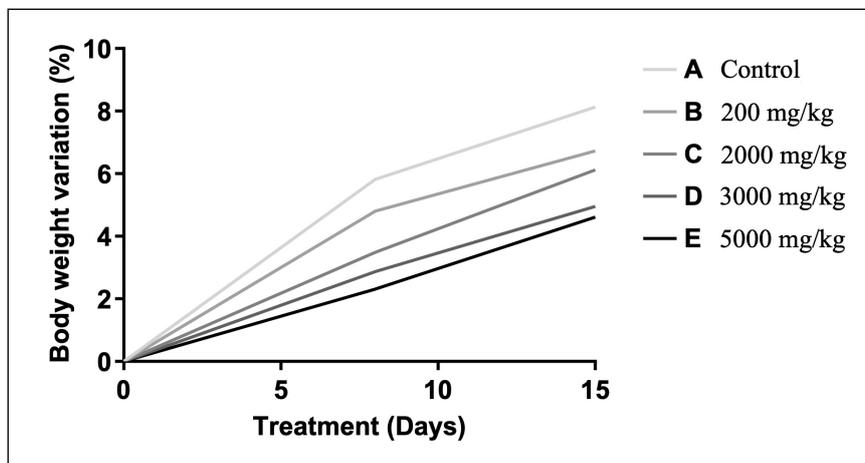


Fig. 1. Effect on the treatment with the methanol extract of olive pomace on the variation of body weight of rats in acute oral toxicity test.

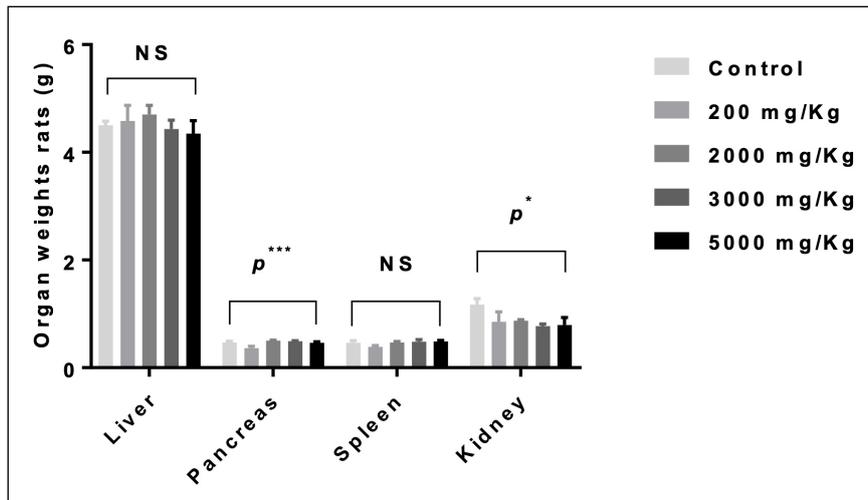


Fig. 2. Effect of methanol extract of Pomace Olive on organ weights rats (g) in the acute toxicity test.

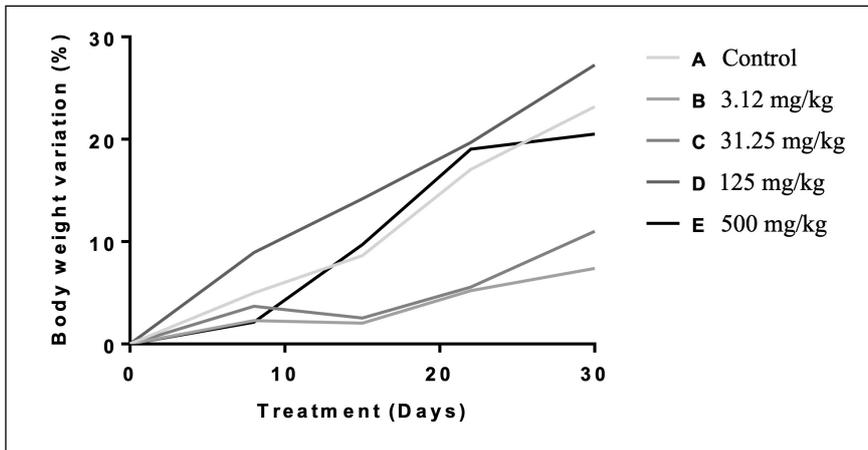


Fig. 3. Effect on the treatment with the methanol extract of olive pomace on the variation of body weight of rats in sub-acute oral toxicity test.

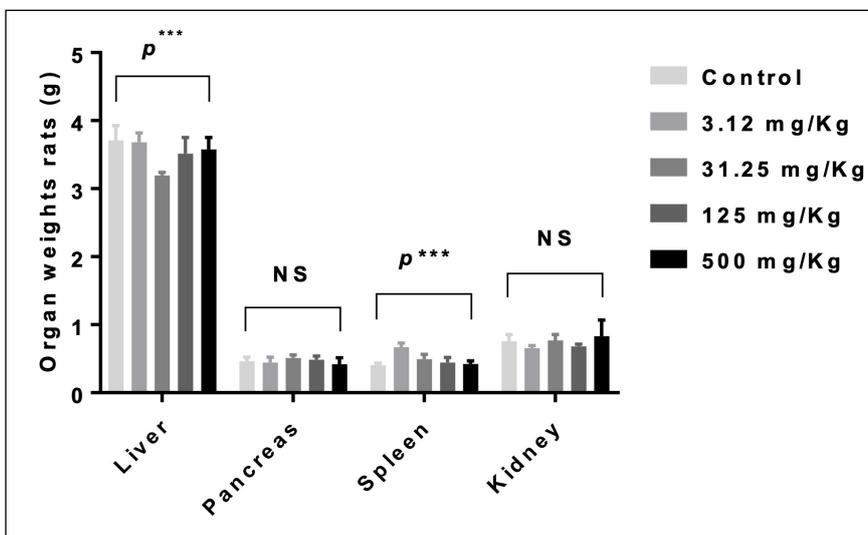


Fig. 4. Effect of methanol extract of olive pomace on organ weights rats (g %) in the sub-acute toxicity test.



TABLE 2. Effect of methanol extract of *Pomace Olive* on the biochemical parameters rats in the subacute toxicity study.

Biochemical parameters	Control (n= 4)	2000 mg/kg	500 mg/kg	125 mg/kg	31.25 mg/kg	3.12 mg/kg	p-value
Glucose (mg/dl)	144.977±0.76	125.200±1.00	132.449±1.154	144.14±3.99	144.08±1.79	143.70±2.21	0.0001
Total protein (g/dl)	4.013±0.444	3.717±0.197	3.213±1.075	3.923±0.231	4.7050±0.0450	3.513±0.960	0.1550
Triglyceride (mg/dl)	58.560±1.058	30.955±0.500	32.57±3.39	37.86±7.94	50.34±2.66	58.020±0.520	0.0001
Total cholesterol (mg/dl)	35.173±0.127	33.593±0.615	37.890±0.700	77.96±11.14	76.01±2.54	75.61±6.41	0.0001
AST (U/I)	75.640±0.753	179.350±1.15	159.51±9.09	70.62±9.69	54.420±0.516	72.25±4.55	0.0001
ALT (U/I)	34.737±0.491	141.873±1.62	97.00±7.09	49.900±0.600	37.76±1.74	27.63±2.07	0.3265
Urea(mg/dl)	31.48±2.33	140.963±0.77	121.73±6.27	63.4±21.9	48.303±0.415	31.94±2.02	0.0001
Creatinine (mg/l)	5.207±0.911	15.250±0.250	14.000±0.500	8.690±1.143	7.000±0.661	3.667±0.382	0.0001

For red blood cells, the results showed significant difference at dose 125 mg/kg and 31.25 mg/kg compared to control and the other treated groups; and on white blood cells had significant difference at doses 2000, 500 and 125 mg/kg ($p < 0.05$).

On MCHC, analyses showed significant differences at doses 2000 mg/kg compared to control and all treatment doses.

On the eosinophils, the results showed significant differences at all treatment doses (Table 3).

Histological studies

A histopathological study carried to confirm biochemical findings and to identify any structural changes. Light microscopic examination of the vital organs including liver, kidney, and white adipose tissue of the rats in all the OP treated and control groups for acute oral toxicity (2000 mg/kg) (Figure 5) and sub-acute oral toxicity (Figure 6) did not reveal any gross pathological lesions.

The photomicrographs of the liver, kidney and adipose tissue of the control and OP treated groups showed with normal morphological architecture. Under microscopic examination of the liver of OP a treated animal showed with normal cellular architecture and binucleation and was without any distortions similar to the control groups. In white adipose tissue histological study, showed no significant adipogenesis was observed in all groups. Morphology of the adipocytes was maintained in a continuous polyhedral pattern with no significant variations in the adipocyte morphology and adipocyte intensity in compared to normal control sections rendering devoid of any alteration in adipose tissue.

The appearance of the glomerular architecture in real section showed normal similar to the control groups. The glomerul, distal and proximal tubules in the kidney appeared normal and no degeneration or necrosis in nephron cells in acute toxicity and sub-acute toxicity in dose 3.12, 31.25 and 125 mg/kg, furthermore at dose 500 mg/kg we notice acute inflammation with the predominant infiltrating cells in the neutrophil and lymphocytes into the medulla.

TABLE 3. Effect of methanol extract of *Pomace olive* on hematological parameters of rats in the acute toxicity (2000mg/kg) and sub-acute toxicity study.

	Control	2000 mg/kg	500 mg/kg	125 mg/kg	31.25 mg/kg	3.12 mg/kg	p-value
RBC (10 ⁶ /μl)	9.24±0.62	8.580±0.44	7.57±1.002	7.79±0.02	8.653±0.982	9.850±1.043	0.0411
Hematocrit(%)	41.93±3.19	40.85±1.65	28.08 ±3.79	30.5±0.99	32.60± 7.95	40.90±4.88	0.021
Hemoglobin(g/dl)	13.36±1.13	9.35±1.25	9.36±0.89	10.5±0.1	11.07±2.42	13.45±2.35	0.0465
VGM	45.3± 0.0.52		37.09±0.32	39.15±0.045	37.68±0.12	41.5±0.16	0.035
Platelets (10 ³ /μl)	775 ± 9.0	693.0± 5 8.0	638± 8.00	641.0±7.00	675.3±14.9	642±1.73	0.1057
MCH (pg)	17.71±0.35	18.3±0.8	19.20±1.01	19.4±0.2	19.46±0.50	18.600±1.32	0.1367
MCHC (g/dl)	34.56±0.67	37.90±0.60	24.97±2.54	24.45±0.45	27.63±2.15	35.40±0.79	0.0128
WBC (10 ³ /μL)	8.66±0.82	7.56±0.27	4.86±0.3	4.705±0.30	5.60±0.5	6.62± 0.69	0.0115
Neutrophils%	12.03±0.68	13.85±0.65	11.47±1.47	10.2±0.84	13.83± 1.02	14.07±2.27	0.5173
Lymphocytes%	85.33±1.48	80.15±0.495	81.8±3.3	80.85± 1.20	82.17± 1.57	85.70±2.60	0.3635
Monocytes%	2.86±1.04	2.25±0.35	2.60±0.91	2.20±0.14	2.50±0.21	2.57±0.650	0.5351
Basophils%	0.33±0.03	0.38±0.005	0.35±0.082	0.35±0.005	0.32±0.042	0.33±0.052	0.4874
Eosinophils%	1.33±0.14	1.4±0.1	2.04±1.76	3.95±0.15	3.11±0.10	3.23±1.305	0.0071

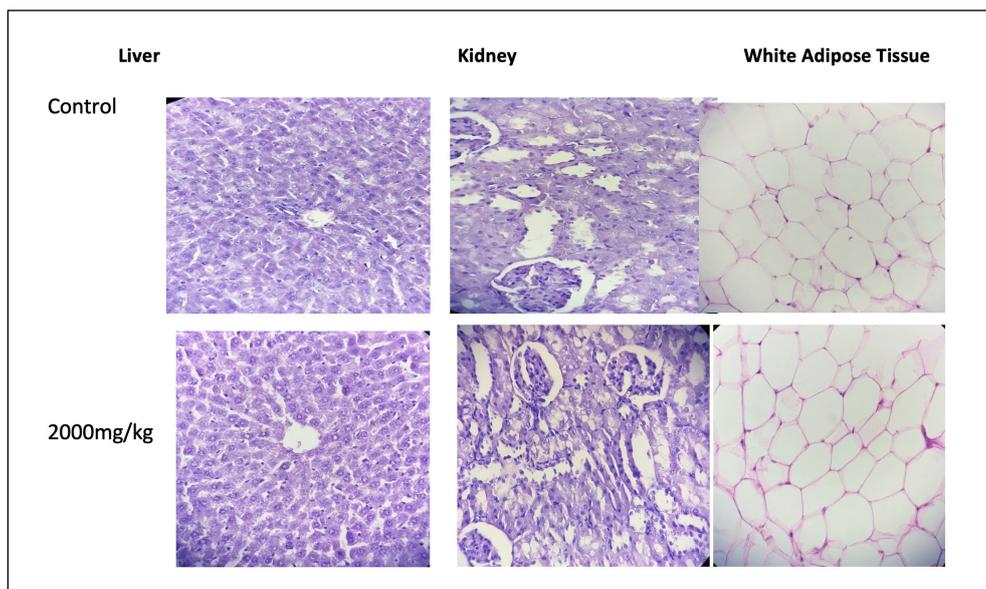


Fig. 5. Photomicrograph of vital organ (Liver, Kidney, White Adipose Tissue) in acute toxicity of Olive Pomace.

DISCUSSION

OP is considered to be a rich source of phenolic compounds²³⁻²⁵, given the importance of phenolic bioactive compounds and their emergence as value-added materials with potential applications in the pharmaceutical, food and nutraceutical industries, the valorization of the certain agro-industrial by-product OP has drawn a significant amount of attention²⁴.

Thus, the present study is assumed to focus on the acute and sub-acute toxicity of methanol extract of OP. The qualitative phytochemical analysis reveals the presence of polyphenols, flavonoids, tannins, saponins, quinones, anthraquinones, terpenoids and compounds reducing; these results are similar to those realized by Xie et al⁴.

These phytochemicals acted as many pharmacological activities, which have been proved antiviral, antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activities²⁶.

So, OP shows excellent results, and it is, therefore, necessary to perform the toxicity study of OP in order to evaluate its pharmacological safety *in vivo*.

The main objective of regulatory toxicology studies is to establish the potential hazards associated with the test item by identifying potential organ toxicity and are used to gather information on certain properties (e.g. pharmacokinetics) that, if inappropriate for humans, could prevent further development of the potential new medicine and, therefore, further animal use²⁷. When studying acute and sub-acute toxicity, the oral route administration is the most convenient and commonly used one, the absorption might be slow,

but this method costs less and is painless to the animals. Since the crude extract is administered orally, the animals should be fasted before taking the dose because food and other chemicals in the digestive tracts may affect the reaction (s) of the compound²⁸.

In the present study, oral administrations of methanol extract of OP in the dose 2000 mg/kg for the acute toxicity do not produce any significant physical and behavioral changes and no death is recorded in the extract of OP. In the present study, extract dose of 3.12, 31.25, 125 and 500 mg/kg body weight of methanolic extract of OP, do not expose rats to a single dose of methanolic extract of OP (up to 2000 mg/kg), do not produce any mortality and alterations in body weight, adverse clinical signs, and during 14 days of the acute oral toxicity testing. So, it can be classified the methanol extract of OP as Category 5 with low acute toxicity hazard²⁹. Since data obtained from acute toxicity is not sufficient to apply for clinical implication, sub-acute toxicity studies have significant importance in determining the safety profile of drugs or chemical moieties³⁰. Although most of the plant-derived medicines show low acute toxicity, repeated dose toxicity is required to ascertain the possible toxic effects of a substance likely to arise from repeated administration over a limited period. Hence, the present study is undertaken to investigate the effects of methanol extract of OP after the oral administration in rats for 4-weeks. In the present investigation, oral administration of OP extract for 28 days does not show any mortality in rats which received produce any alterations in feed and water consumption and this reveals

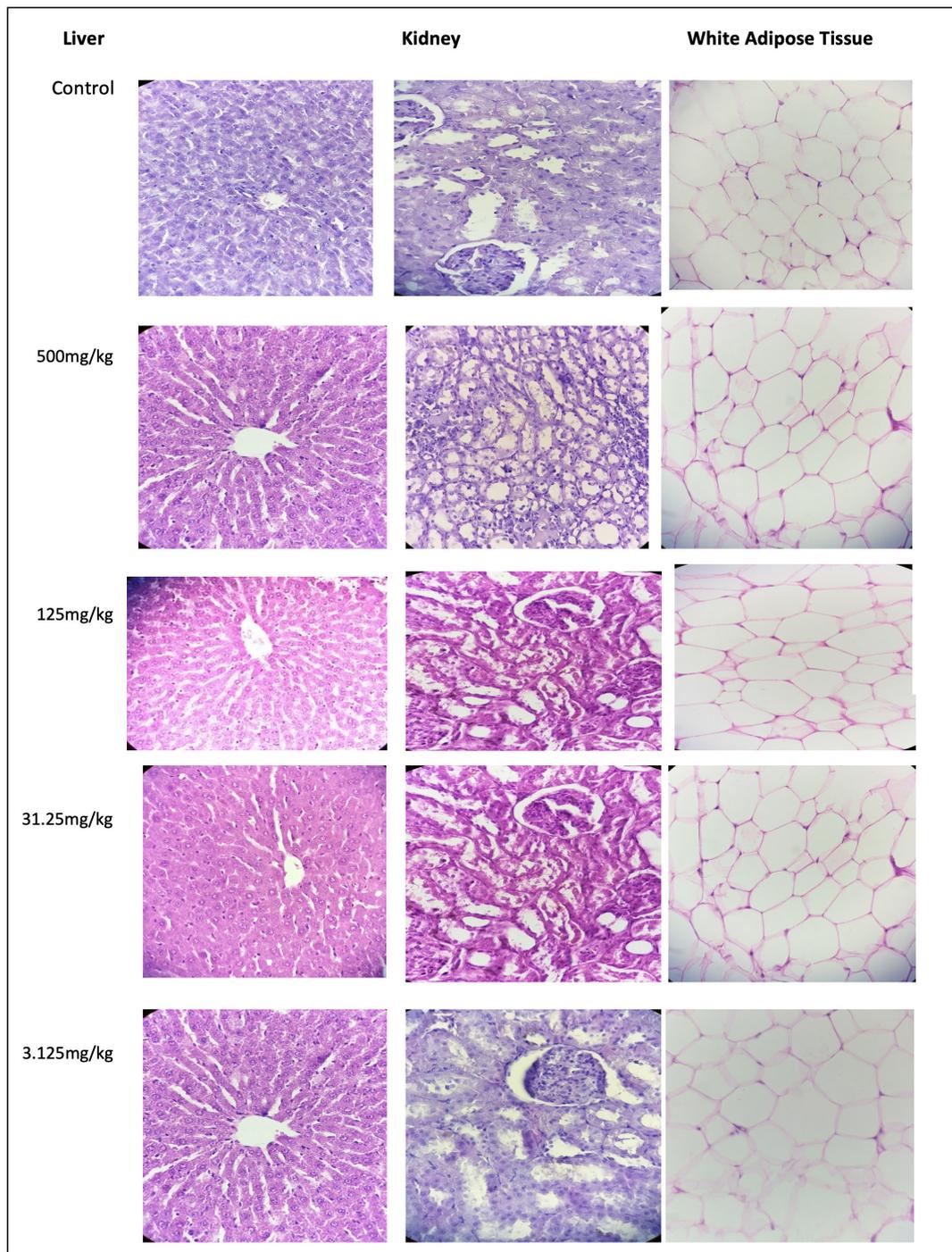


Fig. 6. Photomicrograph of vital organ (Liver, Kidney, White Adipose Tissue) in sub-acute toxicity of Olive Pomace.

that it does not adversely affect the basic metabolic processes of the experimental animals²⁸. Body weight changes are an indicator of adverse side effects as the animals that survive cannot lose more than 10% of the initial body weight³¹; in our study we note evolution of body weight of rats (control and all groups treated) in both acute and sub-acute oral toxicity test, in like manner study performs by Etame-Loe et al³² test acute and sub acute toxicity of the palm wine extract of seeds

of *Carica papaya* Linn. Organ weight also is an important index of physiological and pathological status in animals. The relative organ weight is fundamental to diagnose whether the organ is exposed to the injury or not; the heart, liver, kidney, spleen and lungs are the primary organs affected by metabolic reaction caused by toxicant³³. During the analysis of the various organs, no significant alteration notes in the organ weights compared to the normal control organ weight.

The evaluation of the hematological parameters is very important in the determination of the anomalies induced by a plant extract³⁴, blood serves as the main medium of transport for many drugs and xenobiotic in the body and for that reason components of the blood exposed to substantial concentrations of toxic compounds. Damage and destruction of the blood cells are inimical to normal functioning of the body both in humans and animals²¹. In the present study treatment with PO does not produce any alteration in hematological parameters (platelets, MPV, MCH, neutrophils, monocytes, lymphocytes and basophils); however, the results show a significant difference in RBC, hematocrit, hemoglobin, WBC, MCHC and eosinophils at dose 500 and 125 mg/kg. The decrease in erythrocytes, leukocytes and MCHC indicate microcytic hypochromic anemia of rats. This condition might lead to anemia that impairs erythropoiesis caused by a direct effect of metals on hematopoietic centers (kidney/spleen), accelerated erythroclasia because of the altered membrane permeability and/or increased mechanical fragility, and defective Fe metabolism or failure of intestinal uptake of Fe because of mucosal lesions³⁵. In herbal toxicity studies, increase in WBC may indicate the impact of plant extracts in inducing the 30 immune response of treated animals. On the other hand, significant decrease in the WBC of the blood indicates a decline in the production of leukocytes called leukopenia, means that the body is less able to fight off infections³⁶. Clinical biochemistry data hold significant role in determining the toxicity induced by drugs³⁷. The alterations in biochemical parameters in a toxicology study are described and analyzed using a reasonably standardized method and the fold-changes are usually described to indicate the extent of alterations, based on the degree of alterations of serum chemistry parameters, a biochemical interpretation is made, and additional tests recommended³⁸.

Liver and kidney are site of drug metabolism and elimination and most sensitive organs to be affected by chemical toxicity. Any alteration in liver or kidney functions result in the elevation of SGOT, SGPT, ALP, BUN, serum creatinine and electrolytes in blood³⁷. In sub-acute toxicity, our study demonstrates a significant decrease in serum glucose at high dose 500 mg/kg compared to control. These results are in agreement with Cherrad et al³⁹, who found the hypoglycemic effect of PO in diabetic rats. In animal models studies, the hypoglycemic effect could be facilitated by the reduction of starch digestion and absorption. Moreover, hydroxytyrosol, oleuropein major phenolic compounds of PO have a hypoglycemic and antioxidant activity *in vitro* and in rats⁴⁰. For transaminases which are good indicators of liver function and biomarkers to pre-

dict the possible toxicity, our results reveal rats that consumed high dose of PO (500 mg/kg) present a significant increase in serum AST and ALT compared to control rats. An increase of ALT suggests hepatocellular damage, while AST is less specific than ALT as an indicator of liver function. Altered permeability of the hepatocellular membrane caused by either injury or metabolic disturbance results in a release of soluble cytosolic enzymes. These enzymes generally escape out from the basal-lateral side of the hepatocytes facing the sinusoids causing their elevation in the blood^{29,41}.

Serum lipid profile shows a significant change compared to control; the data present a diminution of total cholesterol and triglycerides in rats administered with dose 500 mg/kg, these results are in accordance with Liu et al⁶ who examined the hypolipidemic effect of OP extract on cholesterol regulation and LDL cholesterol oxidation; also, the results show a decrease of HDL in rats administered with high dose 500 mg/kg and increase of this parameter at dose 125 mg/kg. However, increase concentration of HDL is associated with decrease accumulation of atherosclerosis within the walls of arteries. This is because atherosclerosis results in sudden plaque ruptures, cardiovascular disease, stroke and other vascular diseases. Additionally, the decrease in HDL cholesterol observed in this study across the treatments could be similar with the study conducted on mice that showed HDL-lacking mice still have the ability to transport cholesterol to bile, suggesting that there are alternative mechanisms for cholesterol to be removed from the blood⁴².

Proteins are the fundamental components of all living cells and include many substances such as enzymes, hormones and antibodies that are necessary for the proper functioning of an organism²⁷. Our findings show no significant change in total protein of treated groups compared to control.

Measurement of plasma urea and creatinine has been used for many years as an indicator of kidney function⁴³. In preclinical toxicity studies, renal changes are particularly liable to occur because of the high doses given and the fact that the kidneys eliminate many drugs and their metabolites⁴⁴. The current study presents a significant increase change in urea and creatinine compared to control. Urea is the metabolic product of protein catabolism and increases in serum urea might hamper the kidney function if it is not controlled accordingly⁴⁵. Elevations of serum urea and creatinine show poor clearance by kidney, indicating damage to the renal tissue⁴⁶. The evaluation of histopathological changes in organs remains a cornerstone in safety assessment of medicines³⁷. The histological inspection on the treated and control groups shows that the methanol extract of OP does not cause any toxic effect in liv-



er, kidney and adipose tissue in acute toxicity and sub-acute toxicity in the doses 125, 31.25, 3.12 mg/kg. Because hepatic and renal function are crucial, it is essential to know the state of these two vital organs to evaluate the toxicity of any new compound⁴³ and adipose tissue is a potential site of toxicant accumulation⁴⁷. However, we find that an acute interstitial inflammatory cell infiltrate is present in the renal medulla in 500 mg/kg. The toxicity observed in these studies could result from high dose of active organic constituents like saponins, tannins and flavonoids as shown by the result of phytochemistry⁴⁸.

CONCLUSIONS

The conclusion drawn from this study is that methanol OP extract in acute and sub-acute test causes any lethality and apparent toxicity. On the other hand, the results show alteration in some hematological parameters (glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL, AST, urea and creatinine) besides renal, hepatic parameters and histological modification at dose 500 mg/kg. Additional research into chronic toxicity test and *in vitro* cytotoxicity activity of OP extract should also be achieved in the future.

ACKNOWLEDGMENTS:

The authors would like to acknowledge Dr. F Taleb and Dr. Dib teams; histology and histopathology laboratory, Faculty of medicine, University ABOU-BEKR BELKAÏD, Tlemcen 13000, Algeria, for providing necessary facilities to carry out the histological study.

CONFLICT OF INTEREST:

The authors declare that there are no conflicts of interest related to the subject matter or materials discussed in this article.

ETHICS APPROVAL:

Experimental protocols adopted were based on World Health Organization Guidelines for care and use of laboratory animals. The experimental usage of the animals was approved by the Ethics Committee of the National Ethics Committee for Control and Supervision of Experiments on Animals.

FUNDING:

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

CONTRIBUTIONS:

Badi Zouleykha: study design, data collection, data interpretation and wrote the manuscript. Guermouche Baya: collected data, searched literature and revised the manuscript critically. Haddam Nahida: established toxicological study design, data collection and helped draft the manuscript. Belayagoubi Nabila: performed the study design. Benzerjeb Hajira: performed histological study. Kechkouche Youcef: performed statistical study. Merzouk Hafida and Dali- Sahi Majda: participated in the study design, data interpretation, manuscript preparation. All authors declare that they contributed to this article and that they read and approved final version.

REFERENCES

1. National Institutes of Health. National Center for Complementary and Integrative Health, Complementary, alternative, or integrative health: what's in a name? (homepage on Internet). 2015. Online document at: <https://nccih.nih.gov/health/integrative-health> Accessed . 2017.
2. Berretta M, Della Pepa C, Tralongo P, Fulvi A, Martellotta F, Lleshi A, Nasti G, Fischella R, Romano C, De Divitiis C, Taibi R, Fiorica F, Di Francia R, Di Mari A, Del Pup L, Crispo A, De Paoli P, Santorelli A, Quagliariello V, Iaffaioli RV, Tirelli U, Facchini G. Use of Complementary and Alternative Medicine (CAM) in cancer patients: an Italian multicenter survey. *Oncotarget* 2017; 8: 24401-24414.
3. Rossi P, Difrancia R, Quagliariello V, Savino E, Tralongo P, Randazzo CL, Berretta M. B-glucans from *Grifola frondosa* and *Ganoderma lucidum* in breast cancer: an example of complementary and integrative medicine. *Oncotarget* 2018; 9: 24837-24856.
4. Xie P, Huang L, Zhang C, Deng Y, Wang X, Cheng J. Enhanced extraction of hydroxytyrosol, maslinic acid and oleanolic acid from OP: Process parameters, kinetics and thermodynamics, and greenness assessment. *Food Chem* 2018; 276: 662-674.
5. Cepo DV, Radic k, Jurmanovic S, Jug M, Rajkovic M, Pedisic S, Moslavac S, Albahari P. Valorization of OP-Based Nutraceuticals as Antioxidants in Chemical, Food, and Biological Models. *Molecules* 2018; 23: 2070.
6. Liu J, Sun H, Shang S, Yong Y, Zhang L. Effect of OP extracts on hyperlipidaemia. *Nat Prod Res* 2011; 25:1190-1194.
7. Alhamad M, Rababah TM, Al-u'datt M, EreifejK, Esoh R, FengH, Yang W. The physicochemical properties, total phenolic, antioxidant activities, and phenolic profile of fermented olive cake. *Arab J Chem* 2012; 10: 136-140.
8. Suarez M, Romero MP, Ramo T, Macia A, Motilva MJ. Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 1105-1654.
6. Shafei A, Ramzy MM, Hegazy AI, Husseny AK, El-Hadary UG, Taha MM, Mosa AA. The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. *Gene* 2018; 20: 235-243.
10. Quagliariello V, Coppola C, Mita DG, Piscopo G, Iaffaioli RV, Botti G, Maurea N. Low doses of Bisphenol A have pro-inflammatory and pro-oxidant effects, stimulate lipid peroxidation and increase the cardiotoxicity of Doxorubicin in cardiomyoblasts. *Environ Toxicol Pharmacol* 2019; 69: 1-8.
11. Granato D, Mocan A, Câmara JS. Is a higher ingestion of phenolic compounds the best dietary strategy? A scientific opinion on the deleterious effects of polyphenols in vivo. *Food Sci Technol* 2020; 98: 162-166.
12. Rodriguez-Rodriguez R, Herrera MD, de Sotomayor MA, Ruiz-Gutierrez V. Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Hypertens* 2007; 20: 728-734.
13. Aneela S, Somnath DE, Kanthal LK, Choudhury N, Lohi B, Vidya Sagar K. Acute oral toxicity studies of *Pongamia Pinnata* and *Annova Squamosa* on albino Wistar rats. *Int J Res Pharm Chem* 2011; 1: 820-824.
14. Ifeoma O and Oluwakanyinsola S. Screening of Herbal Medicines for Potential Toxicities. In: Gowder, S., editor. *New Insights into Toxicity and Drug Testing* [Internet]. London: IntechOpen; 2013 [cited 2022 Jul 08]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/42020> doi: 10.5772/54493

15. Sharwan G, Jain P, Pandey R, Shukla SS. Toxicity profile of traditional herbal medicine. *JAHM* 2015; 1: 81-90.
16. Paré D, Hilou AJ, N'do, Guenne S, Ernest SN, Kpemissi M. Protective effect of bioactive fractions of *C. Dalzielii* against weight gain in mice feed with high fat-diet. *Int J Recent Sci Res* 2019; 10: 34144-34153.
17. Fleurentin J, Cabalion P, Mazars G, Santos J, Younos C. *Ethnopharmacologie: Sources, Méthodes, Objectifs, Ethnopharmacology: Sources, Methods, Objectives* 1991; pp. 495.
18. Affy ME, Kouakou KR, Douhoure GT, Kouakou K. Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Amaranthus viridis* (Amaranthaceae) leaves in rats. *J Phytopharmacol* 2018; 7: 366-372.
19. Harborne JB. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman & Hall Thomson Science (UK) 1998; 3rd ed; pp. 203-234.
20. Trease GE, Evans WC. *A textbook of Pharmacognosy* (13th edition) Bacilluere Tinal Ltd, London 1989.
21. OECD: OECD Guideline for testing of chemicals. Acute oral toxicity-acute toxic class method, guideline no. 423. adopted 2001 Organisation for Economic Cooperation and Development, Rome 2001.
22. OECD: Test no. 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. Adopted: 3 October 2008: OECD Publishing 2008.
23. Akay F, Kazan A, Celiktas MS, Yesil-Celiktas O. A holistic engineering approach for utilization of OP. *J Supercrit Fluids* 2015; 99: 1-7.
24. Chanioti S, Tzia C. Extraction of phenolic compounds from OP by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative FSET* 2018; 48: 228-239.
25. Chanioti S, Tzia C. Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from OP using response surface technology: oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. *Food Sci Technol* 2017; 79: 178-189.
26. Shobana S, Vidhya R. Evaluation in vitro hemolytic activity of different parts of *Abutilon Inducum* (Linn). *JPPS* 2016; 5: 1182-1196.
27. Variya BC, Bakrania AK, Madan P, Patel SS. Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018; 10: 71-78.
28. Ramaswamy RS, Prathyusha N, Saranya R, Sumathy H, Mohanavalli KT, Priya RJ, Venkatesh JR, Babu CS, Manickavasakam K, Thanikachalam S. Acute toxicity and the 28-day repeated dose study of a Siddha medicine Nuna Kadugu in rats. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 190.
29. Al-Afifi NA, Alabsi AM, Bakri MM, Ramanathan A. Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats. *BMC Complement Altern Med* 2018; 18: 50.
30. Aniagu S, Nwinyi O, Akumka FC, Ajoku DD, Dzarma GA, Izebe S, Ditse KS, Nwaneri M, Wambebe PEC, Gamaniel K. Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. *Afr J Biotechnol* 2005; 4: 72-78.
31. Richard W, Billington LR, Debryune E, Gamer A, Carpanini F. Recognition of Adverse and Nonadverse Effects in Toxicity Studies 2002. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 66-74.
32. Etame-Loe G, Dibong S D, Yinyang J, Elimbi M, Ngoule CC, Kidik PC, Ngen JP, Tankeu SE, Ocalla EC, Ngaba GP, Nda MJ, Nnanga N. E. Study of acute and subacute toxicity of extract from the palm wine of rhizomes of *Curcuma longa* Linn. *J Appl Biosci* 2018; 132: 13452-13460.
33. Robinson S, Chapman K, Hudson S, Sparrow S, Spencer-Briggs D, Danks A, Hill R, Everett D, Mulier B, Old S. *Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals*. London: NC3Rs/LASA, 2009.
34. Gebrehiwot S. *In Vivo Acute and Sub-Acute Toxicity Study Of Root Extract Of Carissa*. *Spinorum Linn* 2019; 11: 62-65.
35. Yuan G, Dai S, Yin Z, Lu H, Jia R, Xu J, Song X, Li L, Shu Y, Zhao X. Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats. *Food Chem Toxicol* 2014; 65: 260-268.
36. Horiguchi H, Oguma E, Kayama F. Cadmium Induces Anemia through Interdependent Progress of Hemolysis, Body Iron Accumulation, and Insufficient Erythropoietin Production in Rats. *Toxicol Sci* 2011; 122: 198-210.
37. Chitra B, Ramaswamy RS, Suba V. Toxicity Evaluation of Purna Cantirotaya Centuram, a Siddha Medicine in WistarRats. *Int Sch Res Notices* 2015; 473296: 10.
38. Jothy SL, Zakaria Z, Chen Y, Lau YL, Latha LY, Sasidharan S. Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice. *Molecules* 2011; 16: 5268-5282.
39. Cherrad H, Bouderbala S. The glycans reduce the glycemia and amyloid activating the active antioxidant tissue, which causes the rats to respond to the injection of the streptozotocine. *Clin Nutr Metab* 2019; 33: 3.
40. Hedya J, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 804.
41. Rhiouani H, El-Hilay J, Israili ZH, Lyoussi B. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniariaglabra* in rodents. *J Ethnopharmacol* 2008; 118: 378-386.
42. Debelo N, Afework M, Debella A, Makonnen E, Ergete W, Geleta B. Assessment of Hematological, Biochemical and Histopathological Effects of Acute and Sub-chronic Administration of the Aqueous Leaves Extract of *Thymus schimperii* in Rats. *JCT* 2016; 6: 1-9.
43. Abdulmumin TM, Abdulmumin Y, Ibrahim AM, Sarki S and Murtala M. Acute Toxicity Study and Serum Lipids Profile of Pet-Ether Extract of Leave, Stem Bark and Root of *Jatropha curcas* in Wistar Rats. *Saudi J Biomed Res* 2020; 5: 1.
44. Krache I, Boussoualim N, Ouhida S, Amraoui N, Baghiani A, Arrar L. Acute and Chronic Effects of Methanolic Extract of *Teucrium polium* on Blood Parameters and Histopathology of Liver and Kidney in Female Rats. *AJRMPS* 2018; 2: 1-11.
45. Amin KA, Abdel Hameid H, Abdelsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 2994-2999.
46. Awotunde OS, Adewoyeb SO, Dhanabal P, Hawumbad J. Subacute toxicity study of aqueous root extract of *Terminalia schimperiana* in male Wistar rats. *Toxicol Rep* 2019; 6: 825-832.
47. Jackson E, Shoemaker R, Larian N, Cassis L. Adipose Tissue as a Site of Toxin Accumulation. *Compr Physiol* 2017; 7: 1085-1135.
48. Adeneye AA, Ajagbonna OP, Adeleke TI, Bello SO. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musangacecropioides* in rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 105: 374-379.

ملخص

يسبب تصريف النفايات السائلة الناتجة عن صناعات إنتاج زيت الزيتون، مثل بقايا الزيتون ومياه مطاحن الزيتون، مشكلة كبيرة، خاصة في بلدان حوض البحر الأبيض المتوسط. حيث يؤدي هذا التصريف الملوث بشدة إلى أضرار بيئية خطيرة.

ويتركز هذا العمل على إبراز التأثير الأيضي والنشاط المضاد للأكسدة لمستخلص بقايا الزيتون داخل الجسم الحي (دراسة تجريبية) لتثمين هذه النفايات القيمة. ولإنجاز هذا العمل، تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص بقايا الزيتون بواسطة عدة تقنيات: القدرة الكلية لمكافحة الأكسدة، 2,2- ثنائي فينيل-1- بيكريل هيدرازيل، القدرة الحديدية الاختزالية. علاوة على ذلك، تم قياس مستويات البوليفينول الكلية، والفلافونويدات، والتانينات المكثفة باستخدام تقنيات طيف الأشعة فوق البنفسجية. تم تحديد تأثير الأيض لمستخلص بقايا الزيتون في جردان ويستار الذين أصيبوا بالسمنة بواسطة النظام الغذائي للكافيتريا من خلال إعطاء جرعة 200 ملغ/كغ من وزن الجسم من مستخلص بقايا الزيتون، وتقييم المعايير البيوكيميائية (الجلوكوز، الكوليسترول، الدهون الثلاثية، ناقلة أمين الأسيارات، ناقلة أمين الألانين، الكرياتينين، واليوريا) ومعايير الحالة الاختزالية (فيتامين ج، الصوديوم، غلوتاثيون، الكاتالاز، دراسة تغيرات المرسم الدهني والمالون ثنائي الليهايد، والبروتينات الكربونيلية) على مستوى الخلايا الحمراء والأنسجة. بالإضافة إلى ذلك، تمت دراسة السمية الحادة والفترة الفاصلة لمستخلص بقايا الزيتون في فئران ويستار بجرعات مختلفة من خلال تحديد جرعة التأثير السام من خلال تحليل المعايير البيوكيميائية، ومعايير الإجهاد التأكسدي، والتأثير على الأعضاء (الكبد، الكلى، والأنسجة الدهنية) من خلال إجراء قسمين تشريحيين.

وأخيراً، تم تقييم بعض الأنشطة البيولوجية للمستخلص خارج الجسم الحي، مثل النشاط المضاد للالتهاب والنشاط المضاد للهيموليتيك. تظهر نتائجنا أن مستخلصات بقايا الزيتون الهيدرو-ميثانولية المنزوعة الدهون وغير المنزوعة الدهون غنية بالبوليفينولات والفلافونويدات وتظهر نشاطاً مضاداً للأكسدة ملحوظاً في اختبري 2,2- ثنائي فينيل-1- بيكريل هيدرازيل والقدرة الحديدية الاختزالية. ويظهر المستخلص داخل الجسم الحي تأثيراً أيضاً هاماً خلال السمنة من خلال تقليل مستويات الجلوكوز والكوليسترول والدهون الثلاثية. علاوة على ذلك، تمت ملاحظة تحسن في النشاط المضاد للأكسدة على مستوى الخلايا الحمراء والأنسجة. وتشير اختبارات السمية إلى أن مستخلص بقايا الزيتون له تأثير سام على المعايير البيوكيميائية عند جرعة 500 ملغ/كغ وعلى الأعضاء ابتداء من الجرعة 2000 ملغ/كغ. ومن ناحية أخرى، تظهر كل من مستخلصات بقايا الزيتون المنزوعة الدهون وغير منزوعة الدهون نشاطاً معتبراً مضاداً للالتهاب ومضاداً للهيموليتيك.

وفي الختام، يظهر مستخلص بقايا الزيتون الهيدرو-ميثانولي نتائج ممتازة داخل الجسم الحي وخارج الجسم الحي، ويمثل مصدراً قيماً للمركبات النشطة بشكل كبير ويستحق إعادة الاستخدام في التطبيقات الغذائية والصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: بقايا الزيتون ؛ مستخلص هيدرو-ميثانولي ؛ السمنة ؛ مستخلص منزوع الدهون ؛ مستخلص غير منزوع الدهون ؛ البوليفينولات ؛ المعايير البيوكيميائية ؛ المعايير للإجهاد التأكسدي - السمية الحادة والفاصلة - الأنشطة البيولوجية.

Summary

The discharge of effluents from olive oil-producing industries, such as olive pomace and olive mill wastewater, poses a major problem, especially in Mediterranean Basin countries. These heavily polluted discharges cause serious environmental damage.

This work focuses on highlighting the metabolic effect and antioxidant activity of olive pomace extract in vivo (experimental study) to valorize this valuable waste. To do this work, the antioxidant activity of the hydro-methanolic extract of olive pomace was evaluated using several techniques: total antioxidant capacity, DPPH, Ferric Reducing Power (FRAP). Furthermore, the levels of total polyphenols, flavonoids, and condensed tannins were measured using spectrophotometric techniques. The metabolic effect of olive pomace extract was determined in Wistar rats made obese by a cafeteria diet through the administration of a dose of 200mg/kg of body weight of olive pomace extract. Biochemical parameters (glucose, cholesterol, triglycerides, AST, ALT, creatinine, and urea) as well as Redox status parameters (vitamin C, SOD, GSH, catalase, MDA, and protein carbonyls) at the erythrocyte and tissue levels were evaluated. Additionally, acute and subacute toxicity of olive pomace extract in Wistar rats at different doses was studied by determining the toxic effect dose through the analysis of biochemical parameters, oxidative stress parameters, and the impact on organs (liver, kidney, and adipose tissue) by conducting histological sections.

Finally, some biological activities of the extract were evaluated in vitro, such as anti-inflammatory and anti-hemolytic activities. Our results show that both de-lipidated and non-de-lipidated hydro-methanolic extracts of olive pomace are rich in polyphenols and flavonoids and exhibit significant antioxidant activity in both DPPH and FRAP tests. In vivo, our extract demonstrates a significant metabolic effect during obesity by reducing glucose, cholesterol, and triglyceride levels. Furthermore, an improvement in antioxidant activity at the erythrocyte and tissue levels was observed. Toxicity tests indicate that the olive pomace extract has a toxic effect on biochemical parameters at a dose of 500mg/kg and on organs from the dose of 2000mg/kg. On the other hand, both de-lipidated and non-de-lipidated olive pomace extracts show significant anti-inflammatory and anti-hemolytic activities.

In conclusion, the hydro-methanolic extract of olive pomace shows excellent results in vivo and in vitro and represents a valuable source of bioactive compounds worthy of reuse in nutritional and pharmaceutical applications.

Keywords: olive pomace; hydro-methanolic extract; obesity ; de-lipidated extract ; non-de-lipidated extract ; polyphenols ; biochemical parameters ; oxidative stress parameters ; acute and subacute toxicity ; biological activities.

Résumé

Le rejet des effluents des industries productrices d'huile d'olive tels que les grignons d'olives et les margines pose un problème majeur surtout dans les pays du Bassin Méditerranéen. Ces rejets fortement pollués causent de sérieux dégâts environnementaux.

Ce travail se focalise sur la mise en évidence l'effet métabolique et l'activité antioxydante de l'extrait des grignons d'olive in vivo (étude expérimentale) à la fin de valoriser ce déchet précieux. Pour faire ce travail on a évalué l'activité antioxydante de l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive ceci a été fait par plusieurs techniques : la capacité antioxydante totale, DPPH, Pouvoir de réduction du Fer (FRAP). En outre, les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés ont été mesurées par des techniques spectrophotométriques. L'effet métabolique de l'extrait des grignons d'olive est déterminé chez les rats Wistar rendus obèses par un régime cafeteria par l'administration d'une dose de 200mg/kg du poids corporel d'extrait des GO en évaluant les paramètres biochimiques (glucose, cholestérol, triglycérides, TGO, TGP, créatinine et l'urée) aussi les paramètres de statut Redox (vitamine C, SOD, GSH, catalase, MDA et protéines carbonylés) au niveau érythrocytaire et tissulaire. De plus on a étudié la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait des grignons d'olive chez les rats Wistar à différents doses en déterminant la dose à effet toxique par l'étude des paramètres biochimiques et des paramètres de stress oxydatif et même l'effet de la dose sur les organes (foie, rein et tissu adipeux) en réalisant des coupes histologiques. Finalement on a évalué quelques activités biologiques de notre extrait in vitro, tel que l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique. Nos résultats montrent que l'extrait hydro-méthanolique des grignons d'olive délipidé et non délipidé sont riches en polyphénols, flavonoïdes et présentent une activité antioxydante importante dans les deux tests DPPH et FRAP. In vivo notre extrait montre un effet métabolique très important au cours d'obésité en diminuant le taux de glucose, cholestérol et TG. De plus une amélioration de l'activité antioxydante au niveau érythrocytaire et tissulaire. Les tests de toxicité montrent que l'extrait des GO a un effet toxique sur les paramètres biochimiques à la dose 500mg/kg et au niveau des organes à partir de la dose 2000mg/kg. D'autre part l'extrait des GO délipidé et non délipidé montrent une activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique très importantes.

En conclusion l'extrait hydro-méthanolique des GO montre des résultats excellents *In vivo* et *In vitro* et présente une source précieuse des composés bioactifs qui méritent d'être réutiliser au niveau nutritifs et pharmaceutiques.

Mots clés : grignons d'olive- extrait hydro-méthanolique- obésité- extrait délipidé- extrait non délipidé- polyphénols-paramètres biochimiques- paramètres de stress oxydatif- toxicité aiguë et subaiguë- activité biologiques.