



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie appliquée

Réf :

Présenté et soutenu par :
BENLAGHA Rania et KHELIL Yasmine

Le : Mardi 9 juillet 2019

Thème

Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux obtenus par trois méthodes d'extractions à partir des feuilles d'*Olea europaea*

Jury :

Mme. SAIDI Asma

MAA Université de Biskra

Président

Mlle. CHOUIA Amel

MAA Université de Biskra

Rapporteur

Mme. HALIMI Chahrazed

MAA Université de Biskra

Examineur

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciements

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination, ces cinq années nous ont permis de comprendre la signification de cette phrase, ce parcours en effet ne s'est pas réalisé sans défit et soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail. Nous tenons à la fin de ce travail à remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la foi et de nous avoir permis d'en arriver là.

Nous remercions infiniment notre promotrice de ce travail, M^{elle} CHOUIA Amel, pour son assistance et ses conseils afin d'assurer le succès de ce travail.

Un grand merci pour les membres du jury, à tous nos professeurs qui n'ont ménagé aucun effort pour nous transmettre leur savoir faire durant notre cursus universitaire. On remercie également tous nos amis et collègues de la promotion de biologie 2018/2019.

L'équipe du laboratoire de notre Département, l'équipe de la bibliothèque de biologie, les travailleurs de l'administration. Nous remercions également l'ensemble du personnel ainsi que toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Rania & Yasmine

Dédicace

A ceux qui nous ont donné sans rien en retour, A ceux qui nous ont encouragé et soutenu dans nos moments les plus difficiles, Et ceux à qui on doit tant

A nos chers parents ♥ pour leur amour et toute l'affection qu'ils nous ont donné et leur soutien moral, on vous doit tous notre succès, bonheur et notre grande joie. On est très heureuses et fières de votre présence à nos côtés.

♥ *A nos très chères sœurs* ♥

« *Minouche, Mimiti, Himy, Maghey* »

« *Lila, Sana, Abir* »

♥ *A nos chers frères* ♥

« *Chakib, Dali, Sifou* »

« *Charefeddine* »

♥ *A nos adorables nièces et neveu* ♥

« *Assinate, Maria, Maya, Nizou* »

« *Layane, Elyana* »

♥ *A toute la famille* ♥

♥ *A tous nos ami(e)s* ♥

Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de notre profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour nous Que Dieu le tout puissant vous procure continuellement santé, bonheur et tranquillité.

Rania & Yasmine

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Table des matières	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Première partie : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. OLEA EUROPAEA

1.1. Description botanique	3
1.2. Répartition géographique	3
1.3. Classification botanique	4
1.4. Composition chimique.....	5
1.5. Utilisation	6
1.5.1. Domaine médicinale	6
1.5.2. Domaine alimentaire	6

Chapitre 2. POLYPHENOLS ET LEURS ACTIVITES

2.1. Les métabolites secondaires	7
2.2. Polyphénols.....	7
2.2.1. Les principales classes des composés phénoliques.....	7
2.2.1.1. Les flavonoïdes	8
2.2.1.2. Les Tanins	9
2.3. Les activités biologiques des polyphénols.....	9
2.4. Activité Antioxydante.....	9
2.5. Radical libre	9
2.6. Stress oxydatif.....	10
2.7. Antioxydants et système de défense	10

Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Matériel	12
----------------------------	-----------

3.1.1. Présentation géographique de la région d'étude.....	12
3.1.2. Matériel végétale.....	12
3.1.2.1. Collection des échantillons.....	12
3.2. Méthodes.....	13
3.2.1. Préparation de la plante.....	13
3.2.2. Préparation de l'extrait aqueux	13
3.2.3. Rendement d'extraction	16
3.3. Analyse quantitative	16
3.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	17
3.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	18
3.4. Détermination de pouvoir antioxydant du composé phénolique.....	18
3.4.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	18
3.4.2. Réduction du fer (FRAP) : FerricReducing Antioxydant Power.....	19

Chapitre 4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Le rendement des extraits bruts.....	21
4.2. Dosage des métabolites secondaires	22
4.2.1. Dosage des polyphénols.....	22
4.2.2 Dosage des flavonoïdes.....	23
4.3. Evaluation de l'activité antioxydante	25
4.3.1. Effet de piégeage du radical DPPH•	25
4.3.2. Test du pouvoir réducteur FRAP	28
Conclusion.....	31
Références bibliographiques	32
Annexes.....	40
Résumés	

Liste des Tableaux

Tableau 1. Composition chimique des feuilles d'oliviers (exprimés en g/100g).....	5
Tableau 2. Structure des squelettes des polyphénols (Crozier et al., 2006).....	8
Tableau 3. Principaux radicaux libres et leur structure chimique (Haton, 2005).....	10
Tableau 4. la plante étudiée et la date de récolte.....	12
Tableau 5. Teneurs en polyphénols totaux des extraits aqueux.	22
Tableau 6. Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits aqueux.	24
Tableau 7. Les valeurs d'IC50 des extraits aqueux et de l'acide ascorbique.....	27

Liste des Figures

Figure 1. Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin méditerranéen. (Carrion, et al., 2010).	4
Figure 2. Olea europaea L -Originale-	4
Figure 3. Structure de base des polyphénols (Manallah, 2012).	7
Figure 4. Structure de base du noyau des flavonoïdes (Heim et al., 2002).	8
Figure 5. Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant (Nkhili, 2009).	11
Figure 6. La partie aérienne de la plante (originale).	12
Figure 7. Schéma général d'extraction aqueuse par Macération des feuilles d'oliviers.	14
Figure 8. Schéma général d'extraction aqueuse Décoction des feuilles d'oliviers.	15
Figure 9. Schéma général d'extraction aqueuse Infusion des feuilles d'oliviers.	16
Figure 10. Rendement des trois extraits de la plante Olea europaea.	21
Figure 11. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage de polyphénols totaux. ...	22
Figure 12. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage de flavonoides totaux.	23
Figure 13. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.	25
Figure 14. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait d'infusion.	26
Figure 15. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de décoction.	26
Figure 16. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de macération.	27
Figure 17. Pouvoir réducteur des extraits Infusion, macération et décoction de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP.	29

Liste des abréviations

A : Absorbance

A C : Absorbance du contrôle

A E : Absorbance de l'extrait.

AAR : Activité anti-radicalaire

AG : Acide gallique.

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

DPPH : Radical scavenging assay (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

Fe²⁺ : Ions ferreux

Fe³⁺ : Ions ferriques

FeCl₃ : Chlorure de fer

FRAP : Ferric ion Reducing Antioxidant Power

H₂O : Eau distillée

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HHDP : Hexahydroxydiphénique

HO• : Le radical hydroxyle

HOCl : Acide hypochloreux

I % : Inhibitions

IC₅₀% : Concentration inhibitrice.

M_{ech} : La masse sèche de l'échantillon végétal en g

Me : Est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g

Mg EQ / (100g MS) : Mg équivalent de quercitine par 100g de matière sèche

O₂ : L'anion superoxyde

ONOO⁺ : Peroxynitrite

PI : Le pourcentage d'inhibition

R(%) : Rendement en %

RLO : Radicaux libres dérivés de l'oxygène

ROO : Radical alkoxyde

RPM : Tour par minute

UV : Ultraviolet

Introduction

Depuis des milliers d'années l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter traditionnellement toutes sortes de maladies ce qu'on appelle « la PHYTOTHERAPIE ». Ces dernières représentent une source naturelle importante de métabolites secondaires qui possèdent une très large activité biologique (Chevallier, 2001).

Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant qui est à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le cancer et indirecte sur la peroxydation des denrées alimentaires (Mata et al., 2007)

En effet, les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses recherches et une nouvelle haleine vers l'exploitation de métabolites secondaires (Pan et al., 2008) qui sont largement utilisés en thérapeutique, comme des agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, diurétiques, Mais essentiellement antioxydants qui défendent contre le stress oxydatif (Bourgaud et al., 2001). Des études faites sur ce dernier via des plantes médicinales ont augmenté de façon remarquable pour leur potentiel en tant que source d'antioxydants riche et naturel. Parmi ces plantes : *Olea Europea*, *Limoniastrum feei*, *Pistacialentiscus* et bien d'autres (Atmani et al., 2009 ; El Haci et al., 2012 ; Benariba et al., 2013).

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes naturelles qui agissent comme capteurs de radicaux libres. Ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme. Ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaires à des mécanismes vitaux. La surproduction de ces radicaux peut être néfaste pour l'organisme. En effet, ils endommagent de nombreux composants cellulaires aussi divers tels que les protéines, les lipides ou l'ADN à l'origine de ce stress oxydatif. Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt dans le traitement de pas mal de pathologies, ils sont aussi utilisés pour la conservation des denrées comestibles pour l'industrie agroalimentaire (par exemple empêcher l'oxydation des lipides) (Pan et al., 2008).

Olea europaea L., appartenant à la famille des Oléacées , est l'un des plus vieux arbres cultivés au monde et une culture typique de la région méditerranéenne (Scognamiglio et al., 2012).

Communément appelé olivier, *O. europaea*, est cultivé depuis des siècles pour ses fruits et son huile. De nos jours, les cultures d'*O. Europaea* se trouvent dans différentes régions du

monde et existent dans différents cultivars , certains spécifiques à certaines régions (Di Donna *etal.*, 2010).

Notre étude est portée sur l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux obtenu par trois méthodes d'extraction à partir des feuilles d'*Olea europea sylvestris*.

Notre travail est divisé en deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique qui est composée de deux chapitres :

Chapitre 1 : généralité sur la plante *Olea europaea*

Chapitre 2 : représentation générale des polyphénols et leurs activités

La deuxième partie une étude expérimentale qui comprend :

Chapitre 3 : décrivant le matériel et les méthodes expérimentales utilisés pour le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes et sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de l'olivier sauvage

Chapitre 4 : les résultats obtenus et leurs discussions avec des études ultérieures.

Partie bibliographique

-Chapitre 1-
Olea europaea

L'olivier (*Olea europaea*) est l'un des arbres les plus importants dans les pays méditerranéens, il recouvre ainsi environ 8 millions d'hectares ce qui représente environ 98% de la récolte du monde, (Guinda *et al.*, 2004 ; Tabera *et al.*, 2004).

1.1. Description botanique

L'olivier est un arbre vivace au feuilles persistantes, dur, gris-vert et ayant une forme allongée (Metzidakis, 1997). Le limbe est lancéolé et se termine par un mucron. Les bords du limbe s'enroulent sur eux-mêmes. La face supérieure de la feuille est lisse et brillante (Argenson *et al.*, 1999). Les fleurs sont déposées en grappes sur une longue tige (l'olivier produit deux sortes de fleurs, une parfaite qui contient les deux sexes mâle et femelle et une staminée) (Bernie *et al.*, 2006) elles s'épanouissent en petites grappes blanches, chaque grappe donnera un seul fruit. Son fruit ovoïde (drupe), il a un noyau fusiforme. Son bois très dur est imputrescible et est utilisé en ébénisterie, fleurissent en Mai - Juin (Boucher *et al.*, 2011). Le tronc est gris-vert et lisse jusqu'à sa dixième année, il prend une couleur grise foncée (Rugini *et al.*, 1998). Le système racinaire s'adapte à la structure des sols, il reste à une profondeur de 500 à 700 cm et se localise principalement sous le tronc (Maillard, 1975 ; Loussert et Brousse, 1978).

1.2. Répartition géographique

L'olivier (*Olea europaea subsp europaea var europaea*) est l'une des plus anciennes cultures d'arbres agricoles dans le bassin méditerranéen avec une importance culturelle et économique remarquable. A ce jour, plusieurs travaux se sont concentrés sur l'évaluation de la distribution et de la variabilité entre les olives cultivées et sauvages (Lavee, 2013).

Pour les botanistes, l'aire de répartition de l'olivier est synonyme de "région méditerranéenne". L'olivier (*Olea europaea L.*) est cultivé depuis très longtemps autour de la méditerranée et surtout en : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, France, Tunisie, Algérie et Croatie. Aujourd'hui si l'on trouve des plantations en Californie, Australie, Afrique du Sud, cette répartition géographique est influencée par des facteurs climatiques et pédologiques (Gaussorgues, 2009 ; Carrion, *et al.*, 2010), où le pollen peut être distribué par le vent et les oiseaux (Lumaret *et al.*, 2004). (Figure 1)

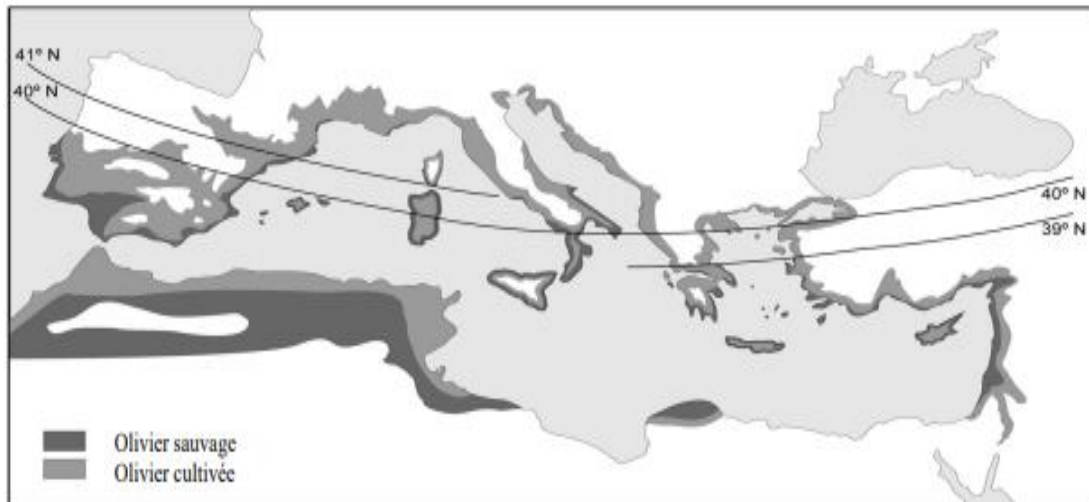


Figure 1. Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin méditerranéen. (Carrion, et al., 2010).

1.3. Classification botanique

L'olivier appartient à la famille des Oléacées. Son genre, *Olea* se compose de 33 espèces. L'olivier cultivé et l'oléastre coexistent aujourd'hui dans le bassin méditerranéen, L'oléastre (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) est la forme sauvage (Breton et Bervillé, 2012).

La classification botanique de l'olivier, selon Ghedira (2008). Est la suivante :

- Embranchement : Magnoliophyta
- Sous-embranchement : Magnoliophytina
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Dialypétales
- Ordre : Lamiales
- Famille : Oleaceae
- Genre : *Olea*
- Espèce : *Olea europaea* L
- Sous-espèce :

O. europaea subsp. *europaea* var. *sylvestris*

O. europaea subsp. *europaea* var. *europaea*



Figure 2. *Olea europaea* L -Originale-

1.4. Composition chimique

La composition chimique des feuilles de l'olivier varie en fonction de nombreux facteurs :

La variété, conditions climatiques, l'âge des plantations ainsi que l'époque de récolte (Nefzaoui, 1995). Les différents composés chimiques sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1. Composition chimique des feuilles d'oliviers (exprimés en g/100g).

Composition en %	Garcia- Gomez et al., (2003).	Martin-Garcia et al., (2006).	Boudhrioua et al.,(2009).	Erbayet Icier (2009).
Eau	Nd	41.4	46.2- 49.7 a	49.8 a
Protéines	Nd	Nd	5.0- 7.6 a	7.0 b
Lipides	6.2 b	3.2 b	1.3 a	6.5 a
Minéraux	26.6 b	16.2 b	2.8- 4.4 a	3.6 b
Glucides	Nd	Nd	37.1- 42.5 a	27.5 a
Fibres brutes	Nd	Nd	Nd	7.0 a
Cellulose	19.3 b	Nd	Nd	Nd
Hémicellulose	25.4 b	Nd	Nd	Nd
Lignine	30.4 b	Nd	Nd	Nd
Polyphénols totaux	Nd	2.5 b	1.3- 2.3 b	Nd
Tanins solubles	Nd	Nd	Nd	Nd
Tanins condensés	Nd	0.8 b	Nd	Nd

a : correspond aux valeurs exprimés par rapport à la masse fraîche des feuilles d'oliviers

b : correspond aux valeurs exprimés par rapport à la masse sèche des feuilles d'oliviers

Nd : valeur non déterminée

1.5. Utilisation

1.5.1. Domaine médicinale

Les feuilles de l'olivier ont été largement répandues dans la médecine folklorique pour plusieurs années dans les îles méditerranéennes et les pays européens. Historiquement, cette matière végétale a été utilisée comme remède de la fièvre (Lee et *al.*, 2009). Au cours du dix-neuvième siècle les anglais y avaient recours pour traiter les maladies tropicales, telle la Malaria (Lee et *al.*, 2009) dans l'antique Égypte, on servait de la feuille d'olivier pour momifier les pharaons. Elles sont utilisées pour faciliter les fonctions d'élimination urinaire et digestives (Bruneton, 2009).

Plusieurs rapports ont montré que l'extrait de feuille d'olivier avait la capacité d'abaisser la tension artérielle chez les animaux (Samuelsson, 1951) et d'augmenter le débit sanguin dans les artères coronaires (Zarzuelo, 1991), de soulager les arythmies et de prévenir les spasmes musculaires intestinaux (Garcia, 2000).

1.5.2. Domaine alimentaire

Olea europaea L. est largement étudiée pour son utilisation alimentaire (les fruits et l'huile sont des composants importants de l'alimentation quotidienne d'une grande partie de la population mondiale) (Hansen et *al.*, 1996).

-Chapitre 2-
Polyphénols et leurs
activités

2.1. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules nécessaires à la défense de la plante contre les agressions extérieures. Ils sont produits en très faible quantité, et présentent une grande variété structurale (plus de 200 000 structures définies) (Hartmann, 2007)

Les métabolites secondaires comportent trois types de composés

- Les composés phénoliques ou aromatiques: tanins, quinones, coumarines, flavonoïdes
- Les composés azotés : alcaloïdes
- Les composés terpénoides et leurs dérivés.

2.2. Polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (fleuri, 1982 ; Yusuf, 2006)

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a une multitude d'activités biologiques dépendant de sa structure chimique. Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules (Lhuillier, 2007).

2.2.1. Les principales classes des composés phénoliques

Une classification de ces substances a été proposée par Harborne (1980).

On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base (Figure 3). Deux principales classes sont largement répandues :

- Flavonoïdes
- Tanins et lignines

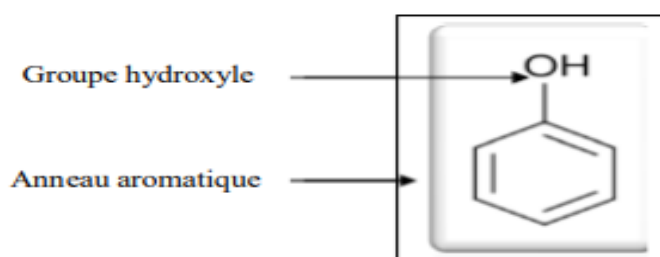

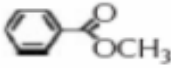
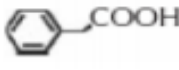
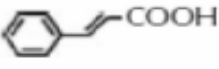
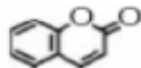
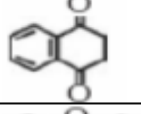
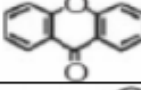
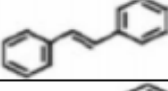
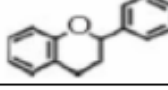


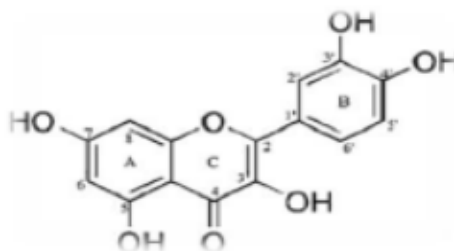
Figure 3. Structure de base des polyphénols (Manallah, 2012).

Tableau 2. Structure des squelettes des polyphénols (Crozier et al., 2006).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	Acétophénone	Gallacétophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide p - Hydroxyphénylacétique	
9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinamiques	Acide p - coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiférine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

2.2.1.1. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet plus de 6500 structures ont été identifiées (Bruneton, 1999 ; Harborne et Williams, 2000).

**Figure 4.** Structure de base du noyau des flavonoïdes (Heim et al., 2002).

2.2.1.2. Les Tanins

Le terme " Tanin " (ou Tannin) vient du mot tannage. Les tanins sont des composés poly-phénoliques hydrosoluble ayant une masse moléculaire entre 500 et 3000, et qui présentent, à côté des réactions des phénols des propriétés de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Bruneton, 2009)

2.3. Les activités biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme : Les activités antiallergiques, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépato-protective, Antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton et *al.*, 2000 ; Ksouri et *al.*, 2007).

2.4. Activité Antioxydante

L'oxydation est l'un des processus les plus producteurs des radicaux libres dans les aliments et les tissus vivants. Ces radicaux causent des dégradations majeures dans les macromolécules et l'acide nucléique (Bubonja-Sonje et *al.*, 2011).

2.5. Radical libre

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (« libre») en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable (Goudable et Favier, 1997)

Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO). Dans certaines conditions pathologiques, ces RLO ainsi que leurs dérivés sont produits de façon excessive. Parmi les RLO, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) joue un rôle clé dans l'inflammation en général, et dans les maladies rhumatismales en particulier. L'anion superoxyde constitue la première forme radicalaire capable d'agresser les composantes cellulaires et matricielles. Il est également un précurseur d'autres espèces radicalaires plus réactives comme le radical HO^{\bullet} formé par l'interaction de l' $O_2^{\bullet-}$ avec les

ions métalliques libres (fer ou cuivre). Les RLO possèdent une forte réactivité et une courte demi-vie (Afonso et *al.*, 2007).

Tableau 3. Principaux radicaux libres et leur structure chimique (Haton, 2005)

Radicaux libres (nomenclature)	Structure chimique
Radical hydroxyle	OH^\bullet
Radical hydroperoxyde	HOO^\bullet
Radical peroxyde	ROO^\bullet
Radical alkoxyde	RO^\bullet
Peroxyde d'hydrogène*	H_2O_2
Peroxynitrite	$ONOO^\bullet$
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$

* *Espèce active de l'oxygène, non radicalaire.*

2.6. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est une circonstance anormale qui traverse parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à un déséquilibre entre la production des radicaux libres ou pro-oxydants et les systèmes de défenses antioxydantes (figure 5). ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires (Gammoudia et *al.*, 2013). Comme exemple, l'exposition chronique au stress oxydatif peut favoriser l'apparition de cancers et maladies cardiovasculaires (Favier, 2006 ; Nkhili, 2009).

2.7. Antioxydants et système de défense

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose a un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Shimizu H, 2004).

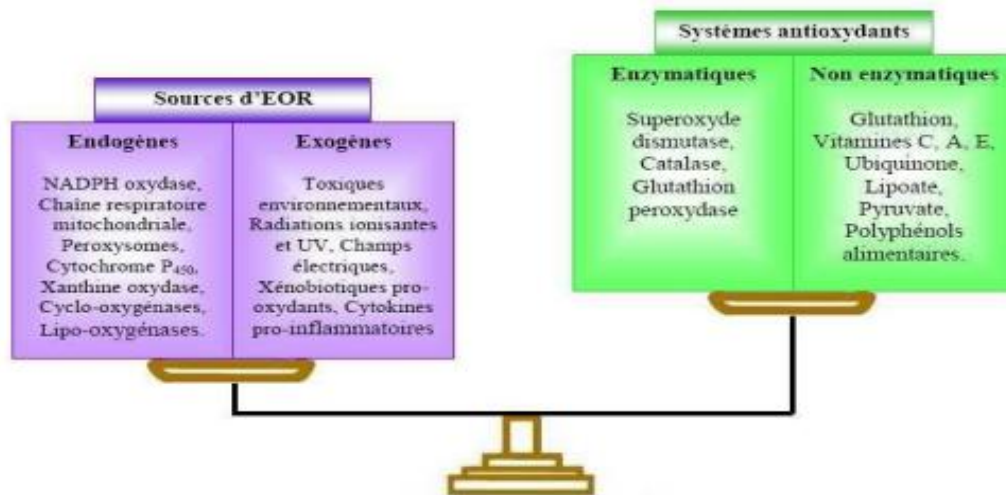


Figure 5. Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant (Nkhili, 2009).

Ils agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Haton, 2005).

Partie expérimentale

-Chapitre 3-
Matériel et méthodes

3.1. Matériel

3.1.1. Présentation géographique de la région d'étude

La wilaya de Biskra est située au Sud- Est Algérien, qui se caractérise par un climat aride .La récolte de la plante *Olea europaea* a été réalisée dans la région d'Oumache de la wilaya du Biskra. Cette région est délimitée par Sidi Okba et El haouch à l'Est, Ourlel et Tolga à l'Ouest, Biskra au Nord et Still au Sud.

3.1.2. Matériel végétale

3.1.2.1. Collection des échantillons

Tableau 4. la plante étudiée et la date de récolte

Echantillon	Date de prélèvement	Partie récoltée	Quantité (g)
<i>Olea europaea</i>	Mars 2018	Aérienne	500g



Figure 6. La partie aérienne de la plante (originale).

3.2. Méthodes

3.2.1. Préparation de la plante

Dans cette étude, l'échantillon du matériel végétal utilisé a été récolté pendant la saison de floraison. Après la récupération de la plante, les feuilles sont lavées puis laissées sécher à l'ombre et à température ambiante dans un endroit aéré, pendant 20 jours, Les feuilles sèches ont été broyées à l'aide d'un moulin électrique et le broyat obtenu a été conservé dans un flacon à température ambiante, dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité et de la lumière jusqu'à son utilisation.

3.2.2. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux de cette plante a été préparé par trois méthodes d'extraction : macération, décoction et infusion.

- **Extraction par macération**

L'extrait aqueux par cette méthode de la partie aériennes (feuilles) a été préparé selon la méthode décrite par (Boubakeur et *al.*, 2017) avec une légère modification : 50 g du matériel végétal broyé est mis à macérer dans 500 ml d'eau distillée sous agitation magnétique et à une température ambiante. Cette macération est répétée trois fois successivement avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Les macérats aqueux obtenus sont soumis à la double filtration sur coton hydrophile et sur papier-filtre Whatman n3. Après séchage à l'étuve (45°C) pendant 48 heures, l'extrait obtenu est conservés à 4°C pour les travaux ultérieurs.

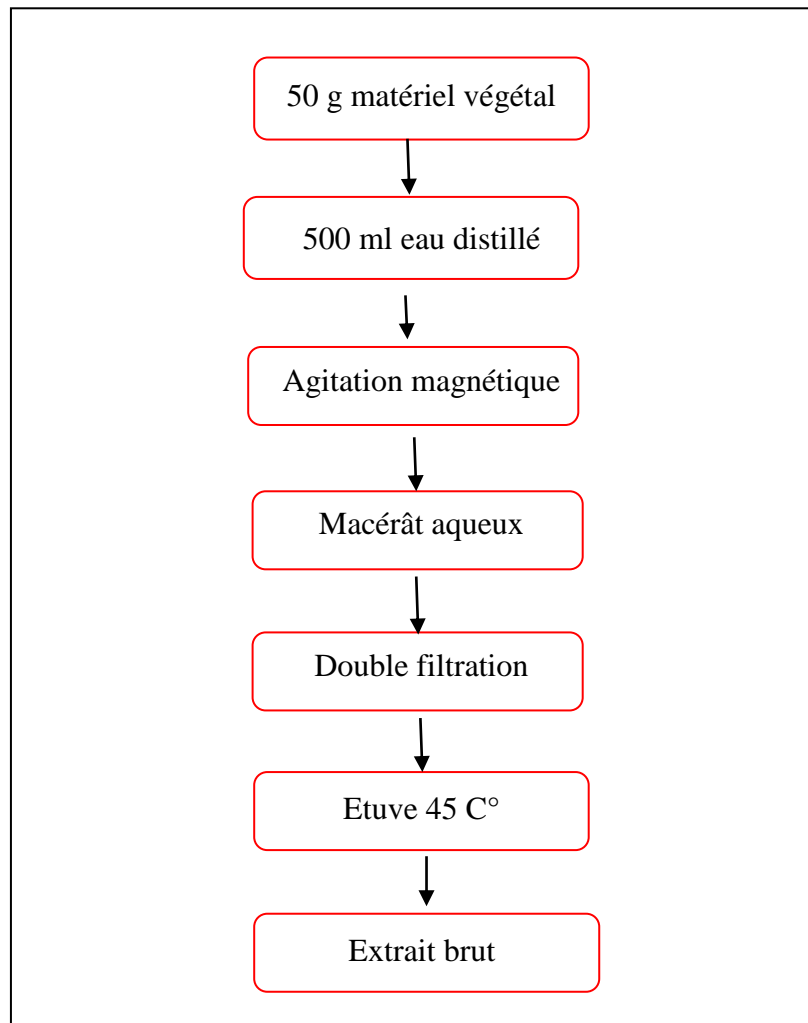


Figure 7. Schéma général d'extraction aqueuse par Macération des feuilles d'oliviers.

- **Extraction par décoction**

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par (Boubakeur et *al.*, 2017). Une quantité de 50 g du matériel végétal broyé est mise à bouillir pendant 15 minutes dans 500 ml d'eau distillée. Après filtration sur papier-filtre Whatman no3, les filtrats ont été ensuite récupérés et séchés dans l'étuve conservés à 4°C pour les travaux ultérieurs.

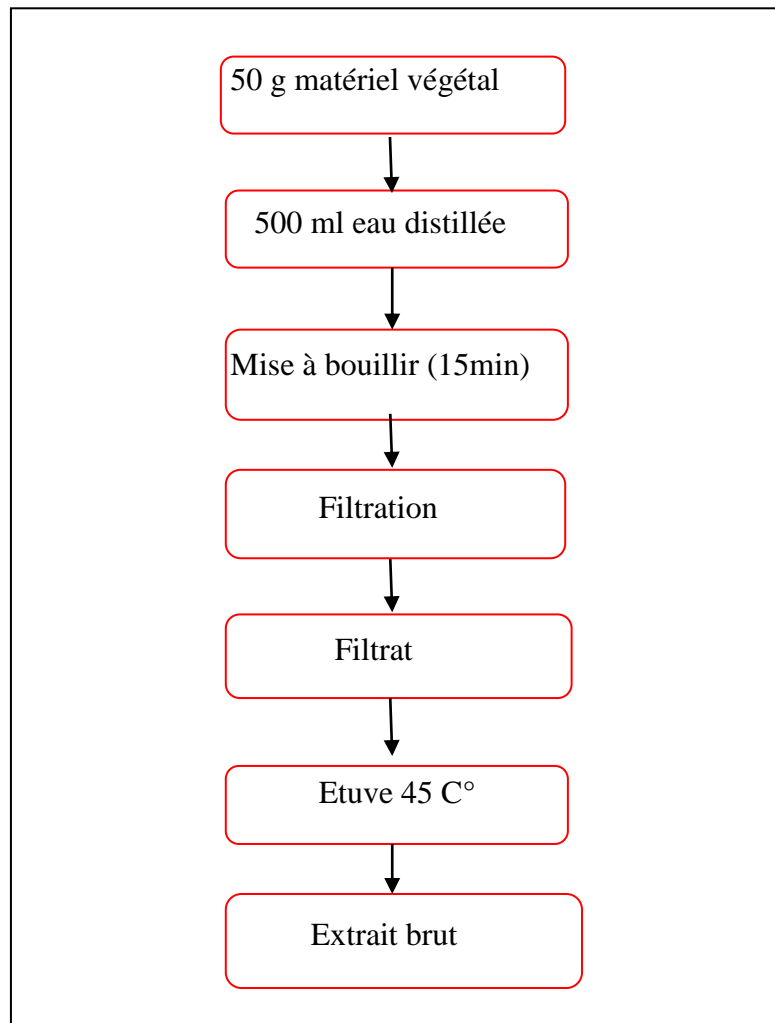


Figure 8. Schéma général d'extraction aqueuse Décoction des feuilles d'oliviers.

- **Extraction par Infusion**

L'extrait aqueux de poudre des feuilles que nous faisons infuser 50g dans 500ml d'eau distillée chauffée à 100°C. Ce mélange est agité pendant 24 heures par un agitateur magnétique. Ensuite la solution est filtrée sur papier Wattman (3 mm), l'extrait obtenu a été conservé à 4°C pour les travaux ultérieurs (Soro et *al.*, 2009)

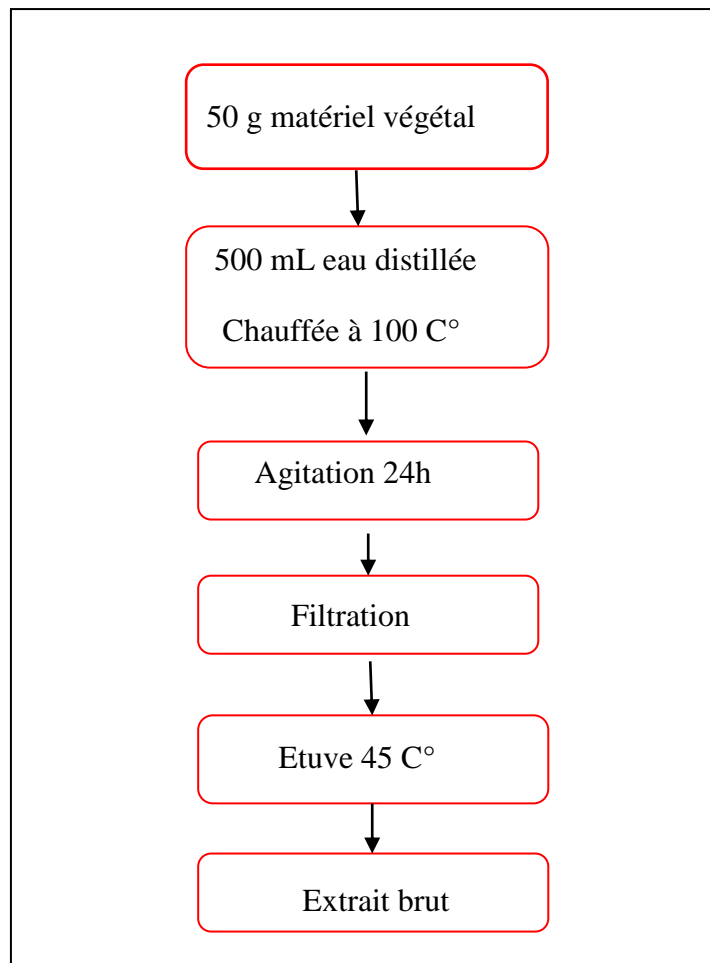


Figure 9. Schéma général d'extraction aqueuse Infusion des feuilles d'oliviers.

3.2.3. Rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction est calculé via la formule suivante :

$$R (\%) = (Me / M \text{ ech}) \times 100$$

Où

R (%) : rendement en %

Me : est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g

M ech : la masse sèche de l'échantillon végétal en g (Mahmoudi et *al.*,2013).

3.3. Analyse quantitative

3.3.1. Dosage des polyphénols totaux

- Principe

La teneur en polyphénols totaux est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et *al.*, 1999) qui est considérée parmi les meilleures méthodes de quantification des polyphénols totaux des extraits de plantes (Robards, 2003).

L'oxydation des composés phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu résulte de la réaction entre l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PM₁₂O₄₀) en milieu alcalin. Cette réduction se traduit par l'apparition d'une coloration bleue formée d'un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (M₈O₂₃) qui sont proportionnels à la concentration en polyphénols dans le mélange (Blouin et *al.*, 1972).

- Mode opératoire

0.5ml de chaque extrait de *Olea europea* (1mg/ml) sont ajoutés à 5 ml d'eau distillée puis on ajoute 0.5ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois .Après 3min, 0.8 ml de carbonate de sodium (7.5%) sont ajouté, Les tubes sont agités et incubés à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 1h d'incubation, les absorbances des mélanges sont mesurées à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS, contre un blanc qui comporte les mêmes composants a l'exception de l'extrait testé. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Le taux de polyphénols dans nos extraits, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique (20 – 200 µg/ml).

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait de feuilles (µg EAG/mg).

3.3.2. Dosage des flavonoïdes

- Principe

La formation d'une liaison covalente entre le trichlorure groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes produit un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430nm (Rezzaghi, 2012).

- Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes des extraits aqueux a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ décrite par (Ayoola et *al.*, 2008 ; Mbaebie, 2012) avec des modifications : Le chlorure d'aluminium forme des complexes jaunâtres avec les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

Brièvement, 1 ml de l'échantillon (1mg/ml) est ajouté à 1 ml de la solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) établie par la quercétine, réalisée dans les mêmes Conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de Quercétine par un milligramme d'extrait de feuilles (μg EQ/mg).

3.4. Détermination de pouvoir antioxydant du composé phénolique

3.4.1. Piégeage du radical libre DPPH

- Principe

L'évaluation de l'aptitude du composé (extrait) à piéger des radicaux libres consiste donc à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber la création de radicaux libres (Hemmami et Guezei, 2013). Les tests proposés pour la mise en évidence du pouvoir antioxydant et anti-radicalaire de nos extraits phénoliques ont été réalisé par de test DPPH. Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune (Parejo et *al.*, 2002).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



- Mode opératoire

Le protocole expérimental utilisé est celui de BRAND-XILLIAMS *et al.* (1995).

La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 50 µl des extraits à différentes concentrations (20 – 200 µg/ml), contre un blanc qui contient 2ml méthanol et 50 µl des extraits.

Le contrôle négatif est préparé, en parallèle, en mélangeant 50µl de méthanol avec 2 ml de la solution méthanolique de DPPH , contre un blanc qui contient 2ml méthanol +50µl de méthanol

Pour le contrôle positif on a utilisé l'acide ascorbique comme un témoin dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Après incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant une heure, l'absorbance est mesurée à 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition PI est calculé selon la formule suivante :

$$PI \% = \frac{A C - A E}{A C} \times 100$$

Avec :

A C : absorbance du contrôle.

A E : absorbance de l'extrait.

IC50 : Concentration inhibitrice médiane.

3.4.2. Réduction du fer (FRAP) : FerricReducing Antioxydant Power

Le pouvoir réducteur d'une molécule est relatif à sa capacité de transfert des électrons et peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante. Dans cette technique, la couleur jaune de la solution change au vert et bleu selon le pouvoir réducteur de l'échantillon testé. Basée sur la réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺. Et, une absorbance élevée à 700 nm indique un pouvoir réducteur élevé (ZovkoKončić *et al.*, 2010).

- Principe

Les substances ayant un potentiel de réduction, réagissent avec le ferricyanure de potassium pour former le ferrocyanure de potassium, qui réagit à son tour avec le chlorure ferrique pour donner lieu à un complexe qui a une absorption maximale à 700 nm (Jayanthi et Lalitha, 2011).

- Mode opératoire

1 ml de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%.

- L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 30 minutes.
- Ensuite 2,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction.
- Les tubes sont centrifugés à 3000 gravité pendant 10 minutes. 2,5ml du surnageant sont mélangés à 2,5ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de : Chlorure ferrique $FeCl_3$ fraîchement préparé à 0,1%
- La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006). Toutes ces opérations sont répétées 3 fois (triplicata).

-Chapitre 4-

Résultats et discussion

4.1. Le rendement des extraits bruts

L'extraction et la préparation de l'extrait aqueux des feuilles de l'olivier sauvage *Olea europea var. sylvestrisa* été réalisée par les méthodes suivantes : Macération, Infusion et Décoction.

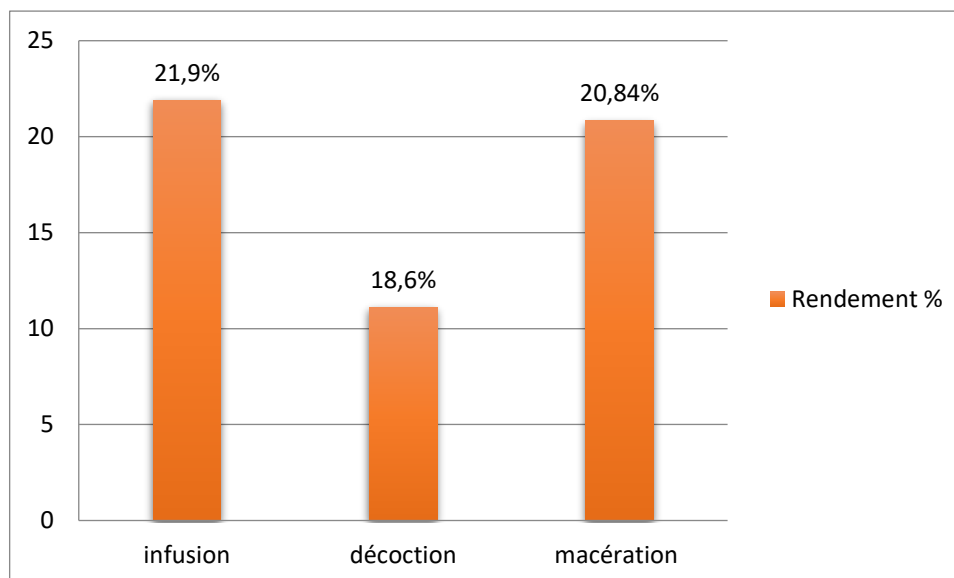


Figure 10. Rendement des trois extraits de la plante *Olea europaea*.

D'après les résultats obtenus et qui sont résumés dans l'Histogramme ci-dessus (Figure10), nous remarquons que l'infusion a permis d'obtenir le meilleur rendement avec une valeur de 21.9 %, ensuite la macération avec un rendement de 20.84% et enfin la décoction avec 18,6%.

Dans l'étude de Madani (2017) qui a travaillé sur la même plante « *Olea europaea* » en utilisant les 3 méthodes : Décoction, Infusion, et Macération, il a respectivement obtenu un rendement d'extraction de 20,4%, 19,08 %, 16,04%. Cette différence est due de plusieurs paramètres : le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon (Santos et *al.*, 2012).

Aussi on peut citer que la période et le lieu de récolte influent sur le rendement d'extraction (Touaibia et *al.*, 2014).

4.2. Dosage des métabolites secondaires

4.2.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols de trois extraits a été réalisé par l'utilisation de réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de JUNTACHOTE et *al.* (2006). Les concentrations d'acide gallique ont été variées entre 20 μ g/ml à 200 μ g/ml ce qui a permis de tracer la courbe d'étalonnage. Les tests sont réalisés en triplicata.

La teneur des polyphénols totaux est déterminée par l'équation $y = 0,0023x$, avec un coefficient de corrélation $R^2=0,978$ (Figure 10).

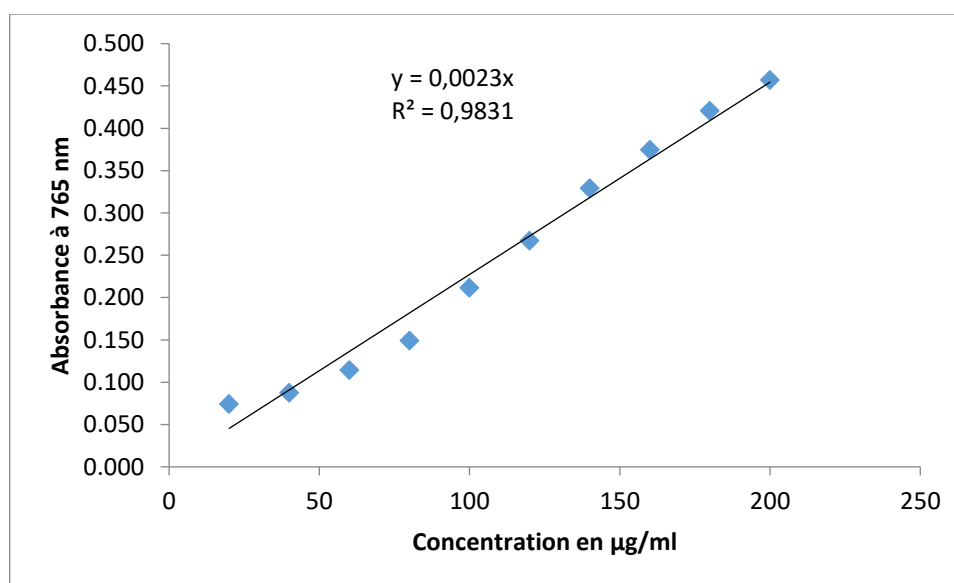


Figure 11. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage de polyphénols totaux.

Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent en acide gallique par milligramme d'extrait sec (μ g EAG/mg d'extrait). (Tableau 5).

Tableau 5. Teneurs en polyphénols totaux des extraits aqueux.

Extraits	Teneur en μ g EAG/mg Extrait
	(Moyenne \pm écart type)
Infusion	287,39 \pm 0,05
Décoction	244,78 \pm 0,007
Macération	123,91 \pm 0,010

Selon les résultats présentés dans le (tableau 04), nous avons enregistré que l'extrait préparé par infusion présente des teneurs élevées en polyphénols ($287,39 \pm 0,05 \mu\text{g EAG/mg MS}$), suivi par l'extrait préparé par décoction ($244,78 \pm 0,007 \mu\text{g EAG/mg MS}$), et la fraction la plus faible correspondant donc à l'extrait préparé par macération ($123,91 \pm 0,010 \mu\text{g EAG/mg MS}$).

Ces résultats sont supérieurs à ceux rapporté par Madani et al. (2017) qui ont réalisé des dosages des polyphénols et recherche d'activité anti radicalaire de feuilles d'olives, ils ont montrés que les teneurs en polyphénols totaux de l'infusion, Décoction, Macération sont ($150,26 \pm 0,023 \mu\text{g EAG/mg MS}$, $91,73 \pm 0,074 \mu\text{g EAG/mg MS}$, $124,90 \pm 0,049 \mu\text{g EAG/mg MS}$ respectivement)

4.2.2 Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes est également estimé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (Bahorum T, 1997;Djeridane et al.,2006) .

La Quercétine considérée comme contrôle positif, qui a permis de réaliser la courbe d'étalonnage et les calculs de la teneur de flavonoïde dans notre extrait, Les résultats sont exprimés en μg équivalent quercétine par mg d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$) (Tableau6).

La courbe d'étalonnage suit une équation de type : $y = 0,0027x$. Sachant que le coefficient de corrélation est : $R^2 = 0,9992$ (Figure 12)

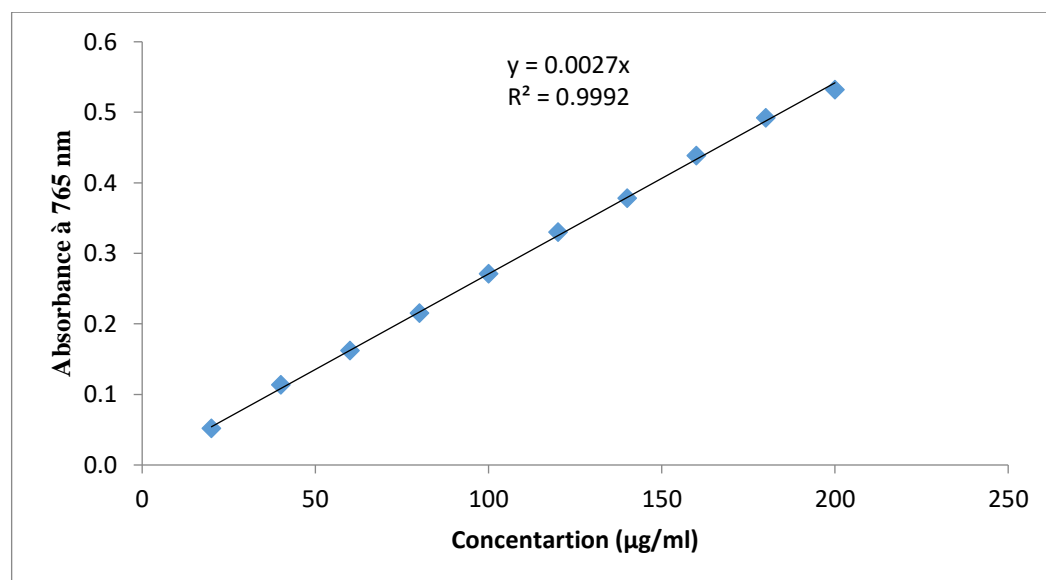


Figure 12. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage de flavonoïdes totaux.

Tableau 6. Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits aqueux.

Extraits	Teneur en $\mu\text{g EQ/mg Extrait}$ (Moyenne \pm écart type)
Infusion	88 \pm 0.005
Décoction	98,5 \pm 0.002
Macération	59 \pm 0.005

Selon les résultats présentés dans le (tableau 6), nous n'avons enregistré que l'extrait préparé par décoction présente des teneurs élevées en flavonoïdes (98,5 \pm 0.002 $\mu\text{g EQ/mg MS}$), suivi par l'extrait préparé par infusion (88 \pm 0.005 $\mu\text{g EQ/mg MS}$), et la fraction la plus faible correspondant donc à l'extrait préparé par macération (59 \pm 0.005 $\mu\text{g EQ/mg MS}$).

Ces résultats sont inférieurs à ceux rapporté par Madani (2017) sauf ceux d'infusion qui sont plus élevés, qui ont réalisé des dosages des polyphénols et recherche d'activité anti radicalaire de feuilles d'olives, ils ont montrés que les teneurs en flavonoïdes totaux de l'infusion, Décoction, Macération sont (77,5 \pm 0,052 $\mu\text{g EQ/mg MS}$, 112,5 \pm 0,024 $\mu\text{g EQ/mg MS}$, 98,75 \pm 0,017 $\mu\text{g EQ/mg MS}$. respectivement) Mais les deux résultats montrent que la décoction présente des teneurs élevées en flavonoïdes totaux par rapport à l'infusion et la macération.

Certains auteurs ont montré que la feuille d'olivier est caractérisée par sa richesse en composés bioactifs : les polyphénols totaux (25,3 mg/g) (Gracia et *al.*, 2003), flavonoïdes (58 mg/g) (Lee et *al.*, 2009).

La composition des feuilles d'oliviers en composés bioactives change selon son origine, conditions climatiques, le mode de séchage, le temps, les types de solvants d'extraction et les conditions de stockage (Altiok, 2010).

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes varient qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs : Facteurs climatiques et environnementaux ...etc. (Ebrahimi et *al.*, 2008) ; Le patrimoine génétique (Miliauskas et *al.*, 2004) ; la période de la récolte (Miliauskas et *al.*, 2004) ; le stade de développement de la plante (Miliauskas et *al.*, 2004) et la méthode d'extraction (Lee et *al.*,

2003). La méthode de quantification peut également influencer l'estimation de la teneur des polyphénols totaux et flavonoïdes (Lee et al., 2003)

4.3. Evaluation de l'activité antioxydante

4.3.1. Effet de piégeage du radical DPPH•

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits de plantes (Laguerre et al., 2007).

Après 1 heure d'incubation de la solution DPPH-extrait (à différente concentration), la coloration violette vire vers une coloration jaune dans les 03 extraits, ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH, ce qui montre que les échantillons ont un effet de piégeage du radical DPPH. Les résultats du pouvoir anti-radicalaire par le DPPH des différents extraits de *Olea europaea* sont dans les figures suivantes :

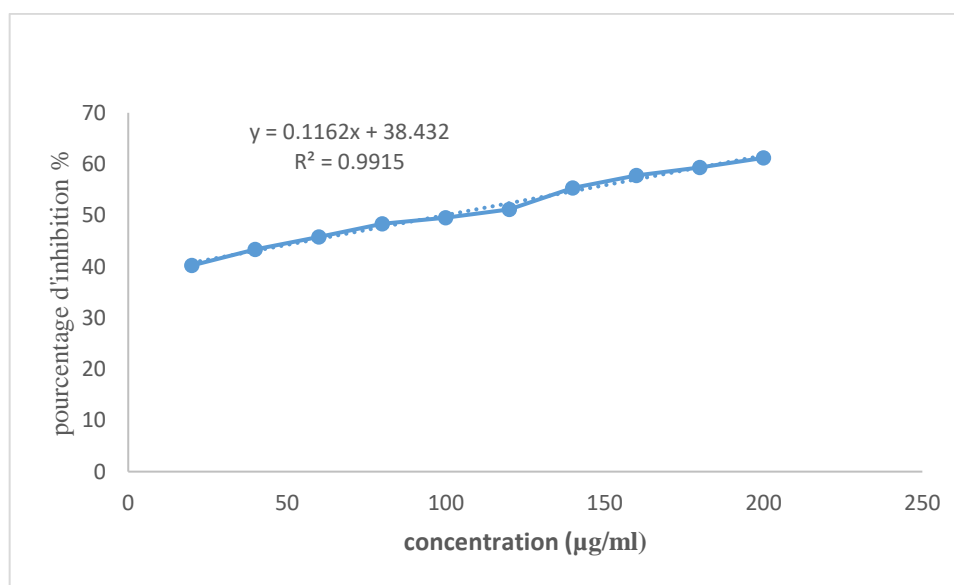


Figure 13. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

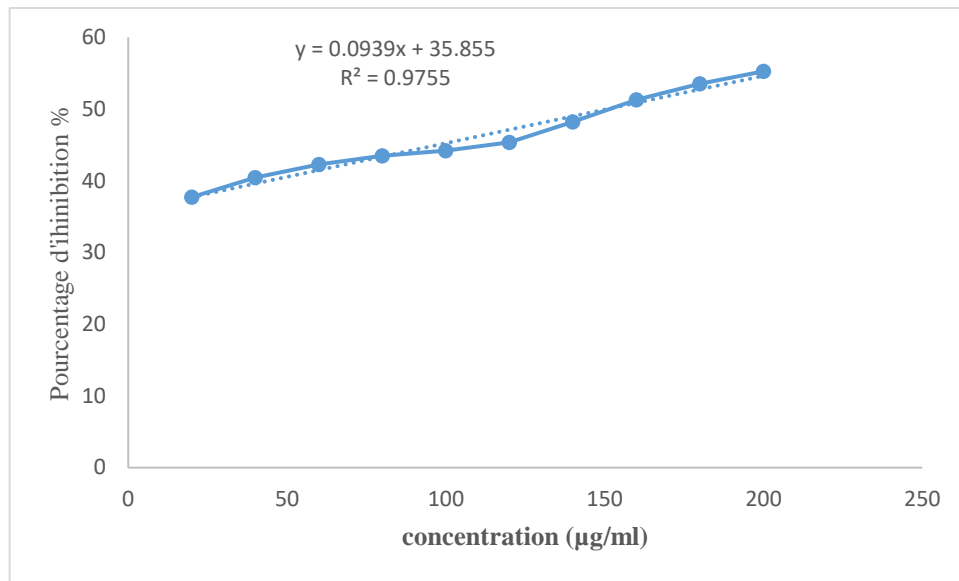


Figure 14. Pourcentages d’inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l’extrait d’infusion.

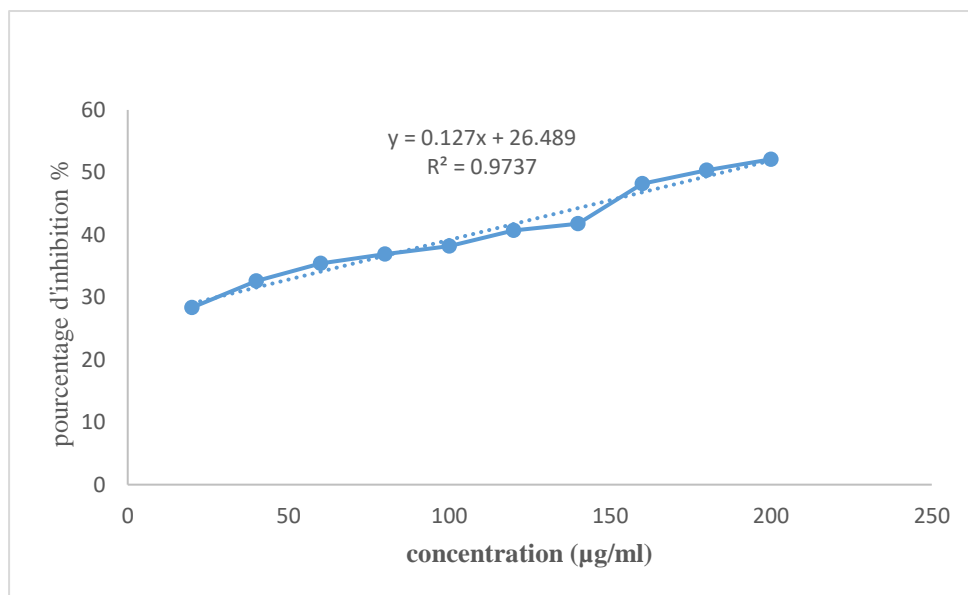


Figure 15. Pourcentages d’inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l’extrait de décoction.

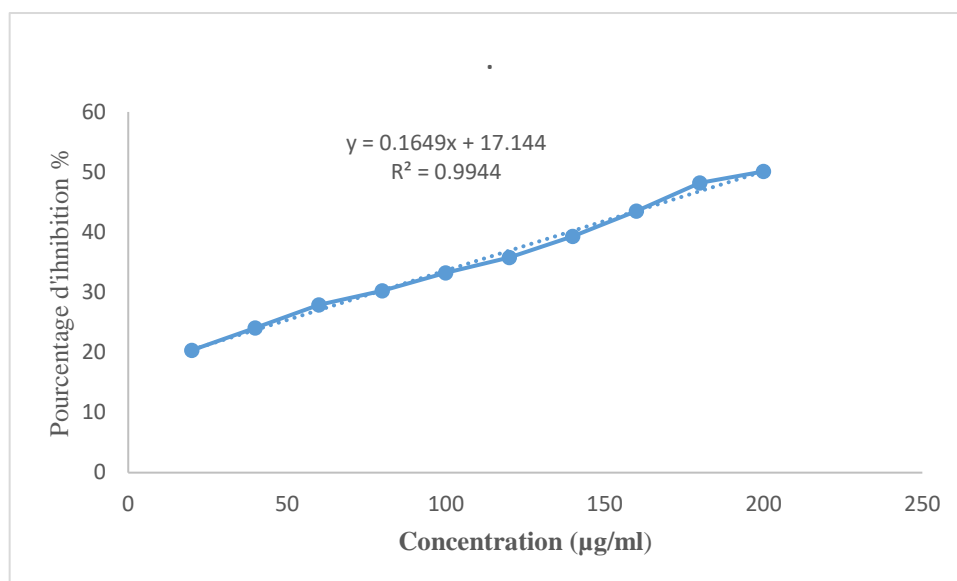


Figure 16. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de macération.

L'activité antioxydante évaluée pour les différents extraits ainsi que le standard (contrôle positif) utilisés, dont les résultats sont exprimés en IC50 (concentration inhibitrice 50) ; c'est la concentration d'extrait qui neutralise (réduit) 50% de radical libre (DPPH), plus L'IC50 est faible plus l'extrait est avec un potentiel antioxydant puissant. L'ensemble des résultats de l'activité antioxydante exprimée en IC50 est représenté dans le tableau ci-dessous

Tableau 7

	Molécule de référence	Les extraits aqueux de l'Olea europaea		
	AC. Ascorbique	Infusion	Décoction	Macération
IC50 (µg/ml)	145.5	153.8	179.9	189.2

D'après les valeurs obtenues, l'extrait préparé par infusion a présenté une activité anti radicalaire meilleure (IC50 d'ordre de 153,8 µg/ml) par rapport aux autres extraits préparés par macération et décoction qui ont présenté des IC50 d'ordre de 189,2 et 179,9 µg/ml, respectivement.

Ces valeurs sont largement supérieures par rapport à IC50 obtenus par l'acide ascorbique (145,52µg/ml) utilisé comme molécule de référence et donc une activité anti-radicalaire plus faible (Tableau 07).

Une étude de l'activité antioxydante des feuilles d'une variété de l'olivier cultivé de chemlali en Tunisie a été réalisée par Bensallah *et al.* (2012) a permis d'estimer une IC50 est de 7,90 µg/ml en utilisant l'eau/méthanol (30/70) (v/v) comme solvant d'extraction.

Selon Hayes *et al.* (2011) l'activité anti-radicalaire dépend généralement du nombre et de la position des groupements hydroxyles par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels. La structure des composés phénoliques est un facteur déterminant de leur piégeage des radicaux libres qui sont des pathogènes dans de nombreuses maladies. Certains de ces composés sont capable de chélater le fer, et donc de réduire son excès.

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (Fuhrman *et al.*, 1995).

L'action antioxydante de ces phyto-nutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS (Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001).

Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Rice-Evans et ses collaborateurs (1996) ont démontré l'importance de ce dernier.

4.3.2. Test du pouvoir réducteur FRAP

Comme son nom l'indique, cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺. En effet, le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. (Karagozler *et al.*, 2008).

L'évaluation du pouvoir réducteur du fer à différentes concentration des extraits d'*Olea europaea* sont représentée dans la Figure ci-dessous. Les valeurs obtenues sont comparées avec l'absorbance d'un témoin qui est l'acide ascorbique usuellement. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

On a choisi une concentration commune entre les extraits et le standard pour une meilleure comparaison.

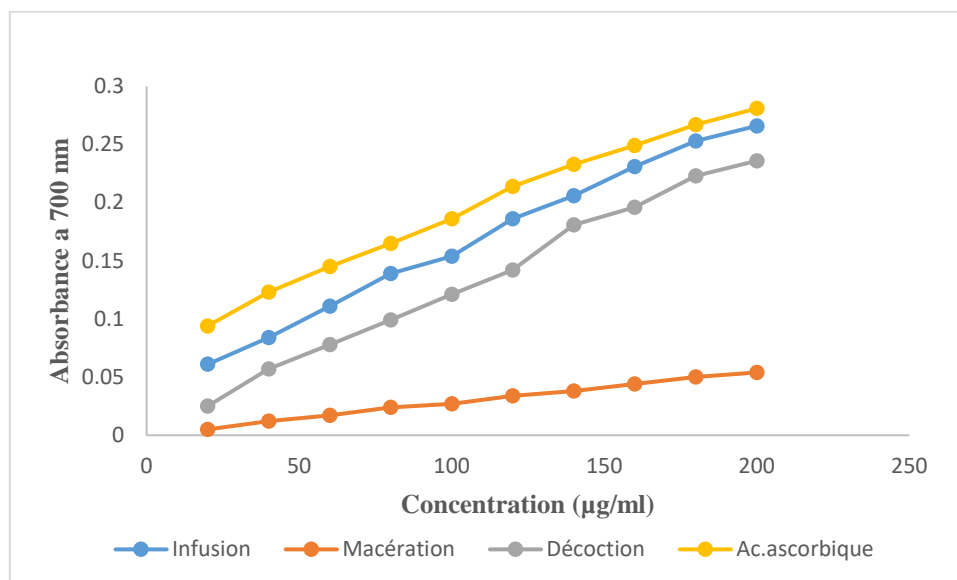


Figure 17. Pouvoir réducteur des extraits Infusion, macération et décoction de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP.

D'après (la figure17), nous constatons que l'extrait d'infusion qui représente le pouvoir le plus élevé pour réduire le fer, suivi par l'extrait de décoction, alors que l'extrait de macération a présenté un pouvoir réducteur inférieur par rapport aux autres extraits.

L'acide ascorbique qui est employé dans cette méthode comme un contrôle positif, a montré un pouvoir réducteur plus élevé avec les mêmes concentrations utilisées.

Ainsi, nous remarquons que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration des extraits des feuilles de l'olivier sauvage.

A la concentration de 100 µg/ml, le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux par infusion est largement supérieur ($A=0,154$) par rapport aux extraits obtenus par décoction et macération ($A=0.121$, $A=0.027$), respectivement. Mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique ($A=0.186$).

Le pouvoir réducteur de l'espèce *Olea europea* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir

réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Bougandoura et Bendimerad, 2012).

La présence de réducteurs (comme antioxydants) provoque la conversion du complexe Fe^{3+} ferricyanure à la forme ferreuse Fe^{2+} . Bien que le fer soit essentiel pour le transport d'oxygène pour la respiration et l'activité des enzymes, il s'agit d'un métal réactif qui catalyse des dommages oxydatifs dans les tissus vivants et les cellules. (Bourgou et *al.*, 2008).

Conclusion

A la lumière des résultats obtenus dans ce mémoire nous avons conclu que :

Les extraits bruts aqueux des feuilles d'olivier (*Olea europea*) récoltées au mois de juin dans la région d'Oumache, wilaya de Biskra, sont riches en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux. L'analyse quantitative des extraits préparés a montré que l'extrait préparé par décoction s'est révélé plus riche en flavonoïdes totaux par rapport aux autres extraits ($0.197 \pm 0.002 \mu\text{g EQ/mg MS}$).

L'extrait préparé par infusion a présenté le taux le plus élevé en polyphénols totaux ($0.661 \pm 0.05 \mu\text{g EAG/mg MS}$).

L'extrait préparé par infusion de feuilles d'olivier a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée avec IC₅₀ de 153.8 $\mu\text{g/ml}$ par rapport aux autres extraits et cette activité est presque similaire à l'acide ascorbique qui a présenté une IC₅₀ d'ordre de 145,52 $\mu\text{g/ml}$ dans les mêmes conditions.

Aussi, l'activité antioxydante a été évaluée par la technique de réduction du fer FRAP, qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes. Les résultats montrent que la capacité réductrice de l'extrait préparé par infusion ($A=0,154$) est plus élevée que les extraits préparés par décoction et macération ($A=0.121$, $A=0.027$), respectivement.

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer la richesse des feuilles d'*Olea europea* en substances chimiques et qui pourraient représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives en thérapeutique.

Il est souhaitable de compléter et d'approfondir ce travail par :

→ L'isolement et l'identification des principes actifs responsables à l'activité antioxydante par des techniques chromatographiques et spectrales.

→ L'étude *in vivo* de l'activité antioxydante.

→ Elargir le panel des activités anti-oxydantes, dont l'activité antidiabétique, anti tumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire.

Références bibliographiques

A

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. 2007. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydesdismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7), 636-643.
- Altiok, E. 2010. Recovery of phytochemicals (having antimicrobial and antioxidant characteristics) from local plants.
- Argenson C., Regis S., Jourdain J.M. and Vaysse P. 1999. L'olivier. Eds .Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (Ctifl), Paris, pp .204.
- Atmani, D., Chafer, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., ... & Atmani, D. 2009. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2), 303-309
- Ayoola, G. A., Ipav, S. S., Sofidiya, M. O., Adepoju-Bello, A. A., Coker, H. A., & Odugbemi, T. O. 2008. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (Guttiferae). *International journal of healthresearch*, 1(2), 87-93.

B

- Bahorum T. 1997. Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne. Une source d'approvisionnement potentielle Food and Agricultural Research Council Mauritius. P 83-94.
- Benariba, N., Djaziri, R., Bellakhdar, W., Belkacem, N., Kadiata, M., Malaisse, W. J., & Sener, A. 2013. Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(1), 35-40.
- Boubakeur H., Rebbas K., Belhattab R. 2017 . Activités antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas* (L.) Moench Phytothérapie : 1-11 p.
- Boucher, Ch., Yves, D., Chaux, D et Nestlé, S. 2011 . Guide des arbres et arbustes de méditerranée. Paris, 291p.
- Boudhrioua, N., Bahloul, N., Slimen, I. B., & Kechaou, N. 2009 . Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products*, 29(2-3), 412-419.
- Bougandoura, n., & Bendimerad, n. 2012 .antifungal activity of aqueous and methanol extracts of *Satureja calamintha* sp. (Nepeta) briq. *Revue des bio ressources*, 2(1), 7-7.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. 2001 . Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.

- Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., & Marzouk, B. 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 48-55.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. 1995 . Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Breton C. et Bervillé A., 2012 : Histoire de l'olivier : arbre des temps. Ed. Quae. RD 10 : 160 p.
- Bruneton J, 1999 : Pharmacognosie Phytochimie des plantes médicinales, Lavoisier Tec & Doc Paris – 3^{ème} édition
- Bruneton J. 2009 : Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales. 4^e éd., revue et augmentée. Paris, France : Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.
- Bruneton, J. 2009 . pharmacognosie. phytochimie. plantes médicinales. 4^{ème} édition. Lavoisier ., 117-119 p.
- Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127.p 1821–1827.
- Burnie, G., Forrester, S., Greig, D., & Guest, S. 2006 . Botanica: Encyclopédie de botanique et d'horticulture. *Menges, Paris*.

C

- Carrion, Y., Ntinou, M., Badal, E. 2010 . *Olea europaea* L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early–Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews* 29.p 952–968
- Chavan UD, Shahidi F, Naczki M 2001. extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *J. Food Chem* 75 p 509-12 Cross Ref Google Scholar
- Chevallier A. 2001 . Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. p.6
- Cotelle, N. 2001 . Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*. 1.p 569-590
- Coulibaly B, N'Guessan KR, Aka N, et al 2001 . Activité antimycobactérienne in vitro des extraits de *Phyllanthus amarus* (Schum et Thonn) sur les souches de *Mycobacterium ulcerans* en Côte-d'Ivoire. *Bulletin de la société royale des sciences de Liège* 80 p 759-71 Google Scholar
- Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. 2006 . Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. 1^{ère} Edition, Blackwell Publishing Ltd, Royaume-Uni, 384p.

D

Di Donna, P., Olivotto, I., Delcrè, S. D. L., Caponi, D., Scaglione, M., Nault, I., ... & Gaita, F. 2010 . Efficacy of catheter ablation for atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: impact of age, atrial remodelling, and disease progression. *Europace*, 12(3), 347-355.

Djeridane A., Yousfi M., Nedjemi B., Boutassouna D., Stocker P., et Vidal N. 2006 .Antioxydant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *J. Food Chem.* 97 : 654-660.

E

Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., et Yousefadi M., 2008 . Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*. 110(4) p 927-931.

El-Haci, I. A., Atik-Bekkara, F., Didi, A., Gherib, M., & Didi, M. A. 2012 .Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie*, 10(5), 280-285.

Erbay, Z., & Icier, F. 2009 . Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of food engineering*, 91(4), 533-541.

F

Favier, A. (2006, November). Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396). Elsevier Masson.

Fleuriet, A., & Deloire, A. 1982. Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrisation des fruits de Tomate blessés: Histochemical and Biochemical Aspects of Cicatrization of Tomato Fruit Lesions. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 107(3), 259-268.

Fuhrman, B., Lavy, A., & Aviram, M. 1995 . Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American journal of clinical nutrition*, 61(3), 549-554.

G

Gammoudia, A. Dandanaa, H. Chaheda, S. Ferchichia, S. Ernezb, A. Mileda. 2013. Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. Immuno-analyse et biologie spécialisée ,p 39–42

Garcia, OB; Castillo, J .; Lorente, J .; Ortuno, A . 2000 . Del-Rio, JA Activité antioxydante de composés phénoliques extraits de feuilles d' *Olea europaea* L..*FoodChem.* , 68 , 457–462. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

Garcia-Gómez, A., Roig, A., & Bernal, M. P. 2003 . Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology*, 86(1), 59-64.

Gaussorgues, R., 2009 . L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique ? *Revue française d'allergologie*, 49 .p 2–6.

Ghedira, K. 2008 .L'olivier phytothérapie.6. p 83-89 springer

Goudable, J. & Favier, A. 1997 . Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 11. p 115-120.

Guinda,A.; Albi,T .; Camino, MCP; Lanzón, A. 2004. Supplémentation d'huiles en acide oléanique de feuille d'olivier (*Olea europaea*). *EUR. J.LipidSci.Technol.* , 106 , p 22-26. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

H

Halliwell B. 1994 .Freeradicals and antioxydants. *Nutr.Rev.* 52. p 253-265.

Hemmami H., GuezeiN. 2013 .Evaluation de l'activité antioxydante d'extrait de *Capsicumannuum* L de la région d'el-oued. Mémoire de master académique, Université de HammaElkhader, El oued.

Hansen, K .; Adsersen, A .; Christensen, BS; Broeegger, S .; Rosendal, JS;Nyman, U .; Wagner Smitt, U. 1996. Isolement d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) provenant d' *Olea europaea* et d' *Olea lancea* . *Phytomedicine* , 2, p 319–324. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Harborne J. B., Williams C. A. 2000 .advances in flavonoidresearchsince 1992.*Phytochemistry*. 55. p 481-504

Harborne J.B., 1980 . Plant Phenolics:Encyclopedia of Plant Physiology, New series ,8, p 329-402.

Hartmann, T. 2007 . From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846.

Haton C., 2005 .Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale.Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, p : 43.

Hayes J.E., Allen P, Brunton N., O'Grady M.N., Kerry J.P (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidantcapacity of four commercial phytochemicalproducts: Olive leafextract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagicacid. *Food Chemistry* 126(3) 948-955.

Heim E.K., Tagliaferro A.R. & Bobilya D.J. 2002 . Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional biochemistry*, 13(10): 572-584

Hubert, J. 2006 . Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja : étude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse).

K

Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygun, D. A. 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., & Abdelly, C. 2007 . Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3-4), 244-249.

L

Lavee, S. 2013. Evaluation of the need and present potential of olive breeding indicating the nature of the available genetic resources involved. *Scientia Horticulturae*, 161, 333-339.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7292-7295.

Lee, O. H., Lee, B. Y., Lee, J., Lee, H. B., Son, J. Y., Park, C. S., ... & Kim, Y. C. 2009. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresourcetchnology*, 100(23), 6107-6113.

Lhuillier, A. 2007 . Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauriasalicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauriapolyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissatrichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embeliaconcinna* Baker (Myrsinaceae) (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse).

Loussert R . et Brousse G .1978 .L'olivier .Ed . Maisonneuve et Larose , Paris .447 .

Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M. F., & Di Giusto, F. 2004. Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity*, 92(4), 343.

M

Madani Yousfi M .2017. Dosage des polyphénols et recherche d'activité antiradicalaire de feuilles d'olives. Département de Biologie. universite de tlemcen .P28.

Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*). *Nature & Technology*, (9), 35

Maillard R., 1975 .L'olivier .Maison des agriculteurs .Ed .Invuflec . Paris, 147

Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. 2007 .Antioxidant and antiacetylcholinesteraseactivities of five plants used as Portuguesefoodspices. *Food chemistry*, 103(3), 778-786.

Martín-García, T., & Baizán, P. 2006. The impact of the type of education and of educational enrolment on first births. *European sociological review*, 22(3), 259-275.

Metzidakis I T, 1997 .Proceedings of the third international symposium on Olive growing: Acta Horticulture, Crete, Chania&Greece. 1(474).

Middleton, E., Kandaswami, C., &Theoharides, T. C. 2000 . The effects of plant flavonoids on mammaliancells: implications for inflammation, heartdisease, and cancer. *Pharmacologicalreviews*, 52(4), 673-839.

Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. 2004 . Screening of radical scavengingactivity of somemedicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.

N

Nefzaoui, A. 1995.Feeding value of Mediterranean ruminant feedresources. *Advanced course. Syria*, 12-23.

Nkhili, E. Z. 2009 . Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. *Diplôme de Doctorat. Université Cadi Ayyad-Marrakech*.

O

Ong, K. C., & Khoo, H. E. 2000.Effects of myricetin on glycemia and glycogenmetabolism in diabetic rats. *Life sciences*, 67(14), 1695-1705.

Oyaizu, M. 1986 .Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.

P

Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., ... & Huang, F. 2008. Antioxidantactivity of microwave-assistedextract of longan (*DimocarpusLonganLour.*) peel. *Food Chemistry*, 106(3), 1264-1270.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6882-6890.

R

Rezzagui A. 2012. Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut et de l'activité antioxydante des différents extraits des graines de *Peganum harmala* L. Thèse de magistère, Biochimie et physiologie Expérimentales. Université Farhat Abbas. Sétif. p78.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996 : Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20. p 933- 956.

Robards, K. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of chromatography A*, 1000(1-2), 657-691.

Rugini, E. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 14(3), 207-214.

S

Salah, M. B., Abdelmelek, H., & Abderraba, M. 2012. Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Med chem*, 2(5), 107-11.

Samuelsson, G. Facteur abaissant la pression artérielle dans les feuilles d'*Olea europaea*. *Farmaceutisk Revy* 1951, 15, 229-239. [[Google Scholar](#)]

Santos R. D., Shetty K., Lourenco A., Miglioranza L. 2012. Phenolic compound and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extract. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n2p655.

Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., & Balansard, G. 2001. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 618-621.

Scognamiglio, B., D'Abrosca, S., Pacifico, V., Fiumano, P., DeLucab, P., Monaco, A., Fiorentino. Caractérisation des polyphénols et évaluation des antioxydants des variétés *Olea europaea* cultivées dans le parc national du Cilento (Italie) *Food Res. Int.*, 46(1) (2012), pp. 294 – 303 [Google Scholar](#).

Shimizu, H., Kiyohara, Y., Kato, I., Kitazono, T., Tanizaki, Y., Kubo, M., ... & Iida, M. 2004. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*, 35(9), 2072-2077.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic Press.

Soro, T. Y., Traore, F., & Sakande, J. 2009. Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *Comptes Rendus Biologies*, 332(4), 371-377.

T

Tabera, J. ; Guinda, A. ; Ruiz-Rodriguez, A. ; Sénorans, JF; Ibanez, E. ; Albi, T. ; Reglero, G. Extraction à l'aide d'un fluide supercritique à contre-courant et fractionnement de composés à haute valeur ajoutée extraits d'un extrait à l'hexane de feuilles d'olivier. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4774-4779. [Google Scholar]

Touaibia, M., & Chaouch, F. Z. 2014. Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt et Trab. (Myrtaceae) [Evaluation of the antioxidant activity of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of the Sahara-endemic species *Myrtus nivellei* Batt and Trab. (Myrtaceae)]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 6(3), 407.

Y

Yusuf, Y. 2006. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 64-71.

Z

Zaruelo, A. ; Duarte, J. ; Jimenez, J. ; Gonzales, M. 1991. Utrilla Effet vasodilatateur de la feuille d'olivier. *Planta Med.* 57, 417 à 419.

Zovko Cončić M, Kremer D, Karlović K, Kosalec I. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:2176–2180.

Annexes

Annexe I : matériels et produits chimiques

Appareillages	Produits	Verreries	Autres matériels
- Moulin électrique	-Eau distillée	- Erlenmeyer	-Papier filtre whatman
-Agitateur Magnétique	-Méthanol	- Entonnoir	-Coton hydrophile
-Plaque chauffante	-Folin-Ciocalteu	-Büchner	-Papier aluminium
-Balance de précision	- Chlorure ferrique (FeCl ₃)	-Boite pétri	-Papier absorbant
-Etuve	-Trichlorure d'aluminium (AlCl ₃)	-Flacon	-Entonnoir
-Bain marie	-Acide gallique	-Tube à vis	-Spatule
-Centrifugeuse	-Quercitine	-Tube à essai	-Eprouvette
-Spectrophotomètre	-Acide ascorbique	-Bécher	-Tube eppendorf
-Vortex	- Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃)		-Micropipettes
-Ph mètre	-Tampon Phosphate		
	-DPPH		
	- Le ferricyanure de potassium (K ₃ Fe(CN))		
	- Acide trichloracétique (TCA)		

Annexes II : Préparation des solutions

Solution	Préparation
Réactif de Folin-Ciocalteu à (10%).	1ml de folin dans 9ml eau distillée.
Carbonate de sodium Na ₂ CO ₃ à (7.5%).	7.5 g dans 100ml d'eau distillée.
L'acide gallique	4mg dans 10ml de méthanol (400 µg/ml).
Acide ascorbique	1mg préparé 1ml eau distillée.
Chlorure d'aluminium AlCl ₃ a (2%)	2g préparé dans 100ml de méthanol.
Quercétine	2g préparé dans 100ml de méthanol.
Acétate de sodium.	5g préparé dans 100ml d'eau distillée.
Tampon phosphate à 0.2M, PH 6.6	2,4g NaH ₂ po ₄ préparé dans 100ml d'eau distillée + 2,4g Na ₂ HPO ₄ préparé dans 100ml d'eau distillée.
Ferricyanure de potassium (K ₃ Fe(CN) 6) à (1%)	1g préparé dans 100ml d'eau distillée
Acide trichloracétique(TCA) (10%)	10g préparé dans 100ml de méthanol.
Chlorure ferrique (FeCL ₃) à (0.1%)	0,1g préparé dans 100ml de méthanol.
DPPH	4mg préparé dans 100ml méthanol

Résumés

الملخص: كان الهدف من هذا العمل هو إجراء اختبارات كيميائية نباتية وتقييم نشاط مضادات الأكسدة في المستخلصات المائية لأوراق شجرة الزيتون المصنوع بثلاث طرق: *décoction*، *macération*، *infusion* الذي تم حصاده في منطقة أوماش بولاية بسكرة.

تم إجراء تحليل كمي للبوليفينولفي المستخلصات وأظهرت أن المستخلص المحضر بطريقة *Infusion* يحتوي على الكمية الأكبر ($287.39 \pm 0.05 \mu\text{g EAG/mg MS}$) بالنسبة للمستخلصات الأخرى
تم إجراء تحليل كمي للفلافونويداتفي المستخلصات وأظهرت أن المستخلص المحضر بطريقة *décoction* يحتوي على الكمية الأكبر ($98.5 \pm 0.002 \text{ mg EAG/mg MS}$) بالنسبة للمستخلصات الأخرى
تمت دراسة قدرة مضادات الأكسدة بواسطة تقنية *Dpph* و *Frap* حيث توصلت هاتان الأخيرتان إلى نفس النتائج التي أظهرت أن المستخلص المحضر بواسطة *infusion* يحتوي على نشاطاً مضاداً للأكسدة بشكل أفضل مقارنة بالطريقتين الأخرتين من *Décoction* و *Macération*
الكلمات المفتاحية: *Olea europaea*, المستخلصات المائية، البوليفينولات الكلية، نشاط مضاد للأكسدة (DPPH ,FRAP)

Résumé : Ce présent travail a eu pour but les tests phytochimiques, le dosage et l'activité antioxydante des extraits bruts aqueux des feuilles d'*Olea europea* réalisés par trois méthodes : infusion, macération et décoction récoltées dans la région d'Oumèche Biskra.

Une analyse quantitative des polyphénols totaux des extraits a démontré que l'extrait de l'infusion qui nous donne la teneur la plus élevée ($287.39 \pm 0.05 \mu\text{g EAG/mg MS}$) par rapport aux autres extraits.

Une analyse quantitative des flavonoïdes totaux des extraits a démontré que l'extrait de décoction qui nous donne la teneur la plus élevée ($98.5 \pm 0.002 \text{ mg EAG/mg MS}$) par rapport aux autres extraits.

Le pouvoir antioxydant a été évalué par deux techniques : le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer FRAP. Ces deux dernières ont abouti aux mêmes résultats qui montrent : l'extrait préparé par infusion a présenté une activité antioxydante meilleure par rapport aux deux autres extraits

Mots clés : *Olea europea*, extraits aqueux, polyphénols totaux, activité antioxydante (DPPH/FRAP).

Abstract : The purpose of this work was to carry out phytochemical tests, dosage and antioxidant activity of aqueous crude extracts of *Olea europea* leaves using three methods: infusion, maceration and decoction collected in Oumeche Biskra region.

A quantitative analysis of the total polyphenol extracts showed that the extract of the infusion which gives us the highest content ($287.39 \pm 0.05 \mu\text{g EAG / mg MS}$) compared to the other extracts.

A quantitative analysis of the total flavonoids of the extracts demonstrated that the decoction extract which gives us the highest content ($98.5 \pm 0.002 \text{ mg EAG / mg MS}$) compared to the other extracts.

The antioxidant power was evaluated by two techniques : trapping of the free radical DPPH and reduction of FRAP iron. These last two have resulted in the same results which show : the extract prepared by infusion has a better antioxidant activity compared to the other two extracts.

Key words: *Olea europea*, aqueous extracts, total polyphenols, antioxidant activity (DPPH / FRAP)

