

Dédicace

Je dédie ce travail ;

A ma mère...

A mon père...

A ma sœur Basma et à mes frères Rabii et Bassam.

Remerciements

Ce travail a été initié en 2010 au sein de l'Equipe Transdisciplinaire des Sciences Analytiques pour le Développement Durable et au laboratoire de Génie Biologique au sein de l'Equipe des Substances Naturelles, Immunopharmacologie Cellulaire et Moléculaire. Je remercie ceux qui m'ont confié ce sujet et qui l'ont guidé: Professeur Mohamed Mbarki et Professeur Abdelmajid Zyad. Je tiens, par ces quelques mots, à leur témoigner ma sincère reconnaissance pour leur disponibilité, leur investissement et leurs encouragements bienveillants.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury pour leur collaboration à l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance. Messieurs Mohamed Najimi et Aziz Hasib de la FST de Béni Mellal et Monsieur Abderrahman Chait de la FSS de Marrakech ont accepté d'être rapporteurs, Madame Zhor Ait Yassine et Monsieur Abderrafia Hafid de la FST de Béni Mellal en tant qu'examineurs et Monsieur El Mostapha Rakib a présidé ce jury. L'intérêt que vous avez porté à ce travail a permis une discussion enrichissante. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Merci aux membres de l'ESNIPCM qui se sont investis dans cette thèse : Pr. Hassan Ait Mousse, Dr. Mounir Tilaoui et Dr. Abdeslam Jaafari. Votre implication dans ce travail a été décisive. Je remercie tout particulièrement Najat Bouchmaa, Houda Ayad, Moulay Ali Oukerrou et Younes Harassi, merci pour votre soutien et votre bonne humeur. Najat, je te remercie d'avoir relu le manuscrit. Je vous souhaite bonne chance pour la fin de vos thèses, j'espère que l'avenir vous sourira à la mesure de vos talents de futurs chercheurs!

Merci à tous les membres actuels et anciens de l'ESNIPNCM et de l'ETSADD tout particulièrement Dr. El Mostapha El Bir pour ton soutien et ton amitié. Au-delà de l'expérience professionnelle, ces cinq années ont été humainement riches. Cela aura été un vrai plaisir de partager la vie quotidienne avec vous. J'espère retrouver cette ambiance de travail dans le futur.

Je remercie les membres du laboratoire de Chimie organique sous la direction du Pr. El Mostapha Rakib pour m'avoir accueillie dans le laboratoire et qui en premier m'ont appris les techniques chimiques d'extraction.

Avant propos

Ce travail a été réalisé au sein de l'Equipe Transdisciplinaire des Sciences Analytiques pour le Développement Durable sous la direction du professeur Mohamed Mbarki et au laboratoire de Génie Biologique au sein de l'Equipe des Substances Naturelles, Immunopharmacologie Cellulaire et Moléculaire sous la direction du professeur Abdelmajid Zyad.

Publications et communications scientifiques

Articles publiés dans des journaux internationaux :

Inass Leouifoudi, Mohamed Mbarki, Mounir Tilaoui, Ali Amechrouq, El Mostapha Rakib, Hassan Aït Mouse, Abdelmajid Zyad, 2014. Study of the *in vitro* anticancer activity of Moroccan phenolic olive cake extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (6): 154-165.

Inass LEOUIFOUDI, Abdelmajid ZYAD, Ali AMECHROUQ, Moulay Ali OUKERROU, Hassan Ait MOUSE, Mohamed MBARKI, 2014. Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater. *Food Science and Technology*, 34(2): 249-257.

Autres articles (en cours)

I. Leouifoudi, M. Mbarki, H. Harnafi, M. Tilaoui, A. Zyad. Antioxidant and antimicrobial activity of the phenolic extracts from Moroccan olive cake and olive wastewaters. *Journal of phytotherapy*, Springer.

I. LEOUIFOUDI, M. MBARKI, E. RAKIB, A. AMECHROUQ, H. AIT MOUSE, A. ZYAD. In vitro cytotoxic and apoptotic activities of biophenols extracted from Moroccan olive cake and olive wastewaters. *International journal of farmacognosy and phytochemical research*.

Communications en congrès internationaux

I. Leouifoudi, M. Mbarki, E. Rakib, J. A. Zyad. Extraction and identification of phenolic compounds extracted from olive by-products in the Tadla Azilal Moroccan area. La quatrième Rencontre de la Chimie Moléculaire (RICM4) » en Novembre 2010 à Marrakech.

Résumé

Les sous-produits de l'extraction d'huile d'olive (margines et grignons) constituent une source majeure de pollution dans les pays producteurs d'huile comme le Maroc. Néanmoins, ces déchets sont riches en principes actifs naturels, les polyphénols. L'intérêt porté à ces composés phénoliques s'est beaucoup accentué dans le monde de la recherche scientifique en raison de leurs propriétés biologiques prouvées.

Dans ce travail de thèse, une première partie a été consacrée à la caractérisation chimique des extraits phénoliques des margines et des grignons d'olives marocaines par le couplage des techniques de chromatographie (HPLC-MS), de colorimétrie (Folin-Ciocalteu) et de spectroscopie (MIR). L'analyse spectrométrique a révélé la présence de groupements chimiques relatifs aux structures des composés phénoliques, des protéines, d'acides gras et de la cellulose. Le dosage de la teneur totale en polyphénols a montré que les extraits des margines sont plus riches en polyphénols que ceux des grignons et que les extraits des zones montagneuses possèdent les teneurs les plus élevées par rapport à ceux de la zone de plaine. En utilisant la technique de HPLC-MS, 45 composés ont été identifiés dans les extraits des margines et 34 dans ceux des grignons appartenant à 5 familles phénoliques : les phénols simples, les dérivés sécoïridoïdes, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les lignanes.

Dans une seconde partie, une évaluation des activités antioxydante et antibactérienne a été effectuée. Le test au DPPH et le test de BCBT ont montré que les extraits phénoliques des margines, en particulier ceux originaires des régions montagneuses, sont plus actifs que ceux des grignons dans les réactions d'inhibition de l'oxydation. Nos résultats ont montré une activité antioxydante dose-dépendante ainsi qu'une bonne corrélation entre le pouvoir antioxydant et la teneur totale en polyphénols dans les extraits. Nous avons montré également que ces extraits, aux concentrations testées, étaient capables d'inhiber le développement de certaines souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*). Cependant, ces concentrations n'ont pas suffi à inhiber le développement de *Streptococcus faecalis* et *Escherichia coli*.

Ces résultats ont été complétés par une troisième partie consacrée à l'étude *in vitro* de l'activité antitumorale des extraits phénoliques des grignons et des margines contre les deux lignées P815 et MCF7. Le test MTT de cytotoxicité a montré que ces extraits ont un effet cytotoxique dose-dépendant. La fragmentation de l'ADN et le marquage à l'Annexine-V-Biotine des cellules tumorales ont indiqué une implication du processus apoptotique dans l'effet cytotoxique, à l'origine d'une activité antitumorale. Du point de vue de l'effet cytotoxique de ces extraits sur les cellules saines, nos résultats ont révélé un effet immunostimulant des lymphocytes (PBMC). Ces résultats préliminaires pourraient constituer une base scientifique pour la recherche de nouvelles molécules antitumorales et présenter ainsi une alternative naturelle aux agents anticancéreux conventionnels dans le domaine pharmacologique et biomédical.

Mots-clés: Margines, Grignons, Composés phénoliques, Activité antioxydante, Activité antitumorale *in vitro*.

ملخص

تعتبر المنتجات الثانوية لزيت الزيتون (ثقل و مياه عصر الزيتون) مصدرا رئيسيا للتلوث في البلدان المنتجة لزيت الزيتون كالمغرب. ومع ذلك فهذه المخلفات هي غنية بمركبات طبيعية نشطة ألا وهي المركبات الفينولية. وقد زاد الاهتمام بهذه المركبات كثيرا في مجال البحث العلمي لما لها من خصائص بيولوجية مثبته.

خصص الجزء الأول لهذه الأطروحة للتمييز الكيميائي للمركبات الفينولية المستخلصة من ثقل و مياه عصر الزيتون المغربي وذلك باستخدام تقنيات الكروماتوغرافي (HPLC-MS)، قياس الألوان (فولين سيوكلتو) والتحليل الطيفي بالأشعة (الأشعة تحت الحمراء). و قد كشف تحليل مطيافية الأشعة تحت الحمراء على وجود بعض المجماميع الفعالة تساعد على تحديد البنى الكيميائية لبعض العناصر مثل المركبات الفينولية، البروتينات، الأحماض الدهنية والسليولوز. وهكذا، أظهرت نتائج قياس كمية البوليفينول أن المستخلصات المنحدرة من المناطق الجبلية تحتوي على أعلى النسب من هذه المركبات مقارنة مع مستخلصات المناطق السهلية. من جهة أخرى وباستخدام تقنية الكروماتوغرافي المقترنة بمطيافية الكتلة، تم تحديد 45 مركبا فينوليا في مستخلصات مياه عصر الزيتون و 34 مركبا فينوليا في مستخلصات ثقل الزيتون تنتمي إلى خمس مجموعات فينولية وهي الفينولات البسيطة، المشتقات الجليكوسيدية، الفلافونيدات، الأحماض الفينولية والقشور.

في الجزء الثاني من البحث، أجرينا تقييم للأششطة المضادة للاكسدة والمضادة للجراثيم. وقد أظهر الاختباران DPPH و BCBT ان المستخلصات الفينولية لمياه عصر الزيتون، وخاصة تلك المستخلصة من المناطق الجبلية هم أكثر نشاطا من تلك المستخلصة من ثقل الزيتون في منع تفاعلات الأكسدة. وأظهرت النتائج التي توصلنا إليها عل وجود علاقة جيدة بين كمية البوليفينول المتوفرة في المستخلصات و الأششطة المضادة للاكسدة. وقد تم التوصل أيضا الى أن هذه المستخلصات، واعتمادا على التركيزات المستعملة، باستطاعتها منع نمو بعض السلالات البكتيرية المسببة للأمراض (ستافيلوكوكيس اوربوس) الا انها عجزت على منع نمو سلالات بكتيرية اخرى مثل ستريبتو كوكيس فيكليس و إشيريشيا كولي.

و قد استكملت هذه النتائج بجزء ثالث من هذا البحث والذي ركز على دراسة مختبرية للأششطة المضادة للسرطان للمركبات الفينولية المستخلصة من ثقل و مياه عصر الزيتون المغربي ضد الخلايا السرطانية P815 و MCF7 باستخدام اختبار MTT. و قد أظهرت نتائج هذا الاختبار أن هذه المستخلصات الفينولية بإمكانها التأثير على نمو الخلايا السرطانية وتدميرها وذلك بعلاقة وطيدة بالجرعة المستعملة. كما أبان اختبار تجزيء الحمض النووي للخلايا السرطانية واختبار وسم الخلايا السرطانية بمادة الأوكسين بيوتين على أن الطريقة المعتمدة للمستخلصات الفينولية في تدمير الخلايا السرطانية P815 هي طريقة قتل الخلايا المنهجة (أو الأپوتوز) اعتمادا على الكمية الإجمالية للمحتوى الفينولي و التركيبية الفينولية لهذه المستخلصات. ومن المثير للاهتمام، و مقارنة بالتأثيرات و الأعراض الجانبية للأدوية الكيماوية لمعالجة السرطان، لم يلاحظ أي تأثير سمي لهذه المستخلصات الطبيعية على الخلايا المناعية السليمة لجسم الانسان (كريات الدم البيضاء). وهكذا، يمكن القول أن هذه النتائج بإمكانها أن تقدم بديلا طبيعيا للأدوية المضادة للاكسدة والمضادة للسرطان التقليدية في المجالات الصيدلانية والطبية الحيوية.

كلمات البحث: ثقل الزيتون، مياه عصر الزيتون، المركبات الفينولية، الأششطة المضادة للاكسدة، الأششطة المضادة للسرطان.

Abstract

The olive oil by-products (olive wastewaters and olive cake) constitute a major pollution source in the oil producing countries such as Morocco. However, these wastes are rich in natural active ingredients, the polyphenols. The interest of these phenolic compounds has been accentuated in the scientific research community because of their proved biological properties.

In the present work, the first part was devoted to the chemical characterization of olive cake and olive wastewaters phenolic extracts by coupling chromatographic (HPLC-MS), colorimetric (Folin Ciocalteu) and spectroscopic (FT-MIR) techniques. The FT-MIR spectra of the tested extracts revealed the presence of chemical functions corresponding to the phenolic compounds, aromatic compounds, fatty acids and cellulose. The colorimetric assay showed a richness of the olive wastewater extracts compared to olive cake extracts and the mountainous areas extracts contain the highest polyphenols content than plain areas extracts. Additionally, the HPLC-MS analysis showed olive cake and olive wastewaters extracts were rich in biophenols mainly composed of simple phenols, phenolic acids, secoiridoids, flavonoids and lignans. Generally, 45 and 34 compounds were identified in the wastewaters and the olive cake extracts, respectively.

In the second part, the antioxidant and antibacterial activities was evaluated. The DPPH test and the BCBT test showed that the phenolic olive wastewaters extracts, especially those originating from the mountainous areas, were more active than the phenolic olive cake extracts in the inhibition of the oxidation reactions. Our results showed a dose-dependent antioxidant activity and a good correlation between antioxidant capacity and total polyphenols content. We have also shown that these extracts, in the concentrations tested, were able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, but were unable to inhibit the growth of *Streptococcus faecalis* and *Escherichia coli*.

These results were complemented by a third part which was focused to the study of the *in vitro* antitumor activity of Moroccan phenolic olive cake and olive wastewaters extracts against P815 and MCF7 cell lines using the MTT assay. The results showed that these extracts exerted a cytotoxic effect in a dose-dependent manner. The tumor cells DNA fragmentation and labeling with Annexin-V-Biotin showed an apoptotic effect of these extracts against P815 cell line depending on the dose and the extract's phenolic content. Interestingly, compared to the conventional antitumor drug methotrexate, no cytotoxic effect of these extracts was observed on the normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Thus, our results could present a natural alternative to the conventional antioxidants and anticancer drugs in the pharmacological and biomedical domains.

Keywords: Olive wastewaters, Olive cake, Phenolic compounds, Antioxidant activity, *In vitro* antitumor activity.

Sommaire

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : Etude bibliographique	4
I. Les grignons et les margines, sous produits de l'industrie d'huile d'olive	4
I.1. Procédés d'extraction d'huile d'olive et régénération des margines et des grignons	5
I.2. Composition chimiques des grignons et des margines	7
I.2.1. Composition chimique des grignons	7
I.2.2. Composition chimique des margines	8
I.3. Facteurs influençant la composition chimique des sous-produits d'huile d'olive	10
I.3.1. La maturité des olives.....	10
I.3.2. Le mode et la durée de stockage des olives.....	10
I.3.3. Le système d'extraction d'huile.....	10
I.3.4. Les conditions climatiques	11
I.4. Impact des margines et des grignons sur l'environnement, traitements, valorisation.....	11
I.4.1. Pouvoir polluant des grignons et des margines	11
I.4.2. Traitement des margines	13
I.4.3. Traitement des grignons	14
I.4.4. Valorisation des grignons et des margines	15
I.4.4.1. Valorisation des margines.....	15
I.4.4.2. Valorisation des grignons	15
II. Les polyphénols, Structure, Classification et Propriétés.....	17
II.1. Présentation générale sur les polyphénols.....	17
II.2. Classification des polyphénols	18
II.2.1. Les phénols simples	19
II.2.2. Les acides phénoliques.....	19
II.2.3. Les flavonoïdes	20
II.2.4. Les anthocyanes.....	23
II.2.5. Les lignanes.....	24
II.2.6. Les stilbènes.....	24
II.2.7. Polyphénols sous forme de polymères.....	25
II.3. Propriétés chimiques des polyphénols	26
II.4. Importance des polyphénols dans les plantes	27
II.5. Rôle nutritionnel des polyphénols.....	27

Abréviations

°C : Degré Celsius

% : Pourcentage

(m, μ) g : (milli, micro) gramme

(m, μ) L : (milli, micro) : litre

ADN : Acide désoxyribonucléique

ACN : Acetonitrile

BCBT : β -Carotene bleaching test

BHT : Butylhydroxyanisol

BDE : Bond dissociation energy

CTL : Lymphocytes T cytotoxiques

DCO : Demande chimique en oxygène

DBO : Demande biologique en oxygène

DMEM : Dulbecco Medium Eagle's Modified

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

EAG : Equivalant d'acide galique

EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique

FCS : Fetal calf serum (sérum de veau foetal)

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

G2/M : Phases G2 et M du cycle cellulaire

GC : Chromatographie en phase gazeuse

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IC₅₀ : Concentration d'inhibition

LC-MS : Chromatographie Liquide à haute performance couplée à la spectroscopie de masse

LDL: Low density lipoprotein ou lipoprotéines de basse densité

mn : Minute

MS : Spectroscopie de masse

MTT : Méthyl Tetrazolium Test

MTX : Méthotrexate

Liste des figures

Figure 1 : Les sous produits de l'huile d'olive. A: les grignons, B: les margines	4
Figure 2 : Schéma du procédé d'extraction d'huile d'olive et la régénération des grignons et margines selon le modèle discontinu à trois phases	6
Figure 3 : Grignons secs à la sortie de la presse	7
Figure 4 : Centrifugeuse. A droite sortie de l'huile d'olive, à gauche sortie des margines.....	7
Figure 5 : Décharge sans traitement des grignons et des margines dans la nature	12
Figure 6 : Structure du catéchol.....	19
Figure 7 : Exemple d'acides phénoliques.....	20
Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes	21
Figure 9 : Structures chimiques des flavones et flavonols.....	22
Figure 10 : Structure chimique des flavanones et flavanonols	22
Figure 11 : Structure chimique des flavanols	23
Figure 12 : Structure chimique des anthocyanes.....	23
Figure 13 : Structure des lignanes.....	24
Figure 14 : Structure des stilbènes.	24
Figure 15 : Formes mésomère du phénol.....	26
Figure 16 : Stabilisation des radicaux libres par l'hydroxytyrosol.....	29
Figure 17 : Incidence de tous les sites de cancers dans le monde.....	41
Figure 18 : Accumulation d'anomalies génétiques et épigénétiques.....	44
Figure 19 : Evolution du processus de la carcinogénèse	44
Figure 20 : Schéma récapitulatif des voies de l'apoptose	51
Figure 21 : Effet des polyphénols sur les voies de signalisation de l'apoptose des cellules cancéreuses.....	52
Figure 22 : Carte de la région Tadla-Azilal montrant les points de collectes des échantillons (les sites) avec l'altitude de chaque point.	53
Figure 23 : Extraction des composés phénoliques des margines.....	56
Figure 24 : Électrophorèse sur gel d'agarose.....	65
Figure 25 : Spectres FT-MIR typiques de deux échantillons de grignons.....	67
Figure 26 : Spectres FT-MIR typiques de deux échantillons de margines.....	68
Figure 27 : Effet du temps d'extraction sur la teneur totale en polyphénols.	69
Figure 28 : Effet du solvant d'extraction sur la teneur totale en polyphénols	69

Liste des tableaux

Tableau 1: Bilan matière en grignons et margines obtenus par différents procédés de trituration des olives.....	7
Tableau 2: Composition chimique des grignons et des margines.....	9
Tableau 3: Technologies de traitement des margines.....	14
Tableau 4: Principales classes des composés phénoliques	18
Tableau 5: Principales familles de composés phénoliques identifiés dans les grignons et les margines.....	31
Tableau 6: Teneur totale en polyphénols dans les extraits des grignons et des margines.....	71
Tableau 7: Composition phénolique des extraits des grignons.	79
Tableau 8: composition phénolique des extraits des margines.	82
Tableau 9: Activité anti-radicalaire des extraits phénoliques des grignons et des margines d'olive.....	95
Tableau 10: Effet anti-radicalaire (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) des extraits phénoliques des grignons et des margines.	96
Tableau 11: activité antimicrobienne des extraits phénoliques des grignons et margines...	106

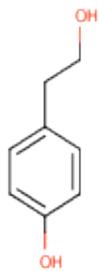
INTRODUCTION

Bien que l'industrie oléicole assure la production de l'huile d'olive vierge en tant qu'aliment à différentes vertus pour la santé humaine, elle est une source de pollution à cause de ses sous produits. Elle en engendre de grandes quantités; 100 kg d'olives produisent en moyenne 35 kg de grignons et 100 litres de margines. Le rejet des effluents des huileries d'olive constitue jusqu'à présent un redoutable souci écologique dans la région méditerranéenne (Dermeche et al. 2013; Suarez et al. 2010; Lesage-Meessen et al. 2001). La valorisation de ces sous produits s'avère fortement sollicitée afin de réduire leur impact environnemental. Toutefois, malgré leur caractère polluant, les sous produits d'huile d'olive sont considérés comme source abondante de principes actifs naturels, les polyphénols. En effet, ces extraits végétaux ont attiré une grande attention et prennent une importance croissante dans le domaine de la médecine alternative en raison de leurs propriétés thérapeutiques naturelles et leurs effets secondaires limités contrairement à certains médicaments conventionnels d'origine chimique.

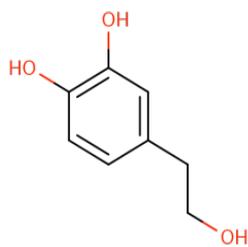
L'histoire des extraits naturels remonte à des périodes védiques environ 4500-1600 av J-C où les plantes médicinales constituaient la partie dominante de substances médicamenteuses (Sharma, 2013). De nos jours, bien que la médecine moderne soit bien développée presque partout dans le monde, une proportion non négligeable de la population dans les pays en développement compte encore sur les tradipraticiens, et les médicaments à base de plantes pour leurs soins de base. Dans certains pays comme la Chine et l'Inde, la tradition de la phytothérapie est très répandue. En Afrique, l'usage de la médecine traditionnelle prend de plus en plus de l'ampleur. Son accessibilité, sa disponibilité et sa popularité ne font l'ombre d'aucun doute, dans la mesure où environ 80 % d'Africains y ont recours pour leurs besoins de santé. Toutefois, au cours des décennies passées, l'intérêt public pour les thérapies naturelles à base de plantes a considérablement augmenté dans les pays industrialisés. Les formes nombreuses et variées des produits de la médecine traditionnelle ont évolué dans des contextes ethnologiques, culturels, climatiques, géographiques et même philosophiques largement différents.

Dans ce contexte, les composés phénoliques sont actuellement reconnus comme des cibles potentielles pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement de diverses maladies (cancer, maladies inflammatoires, cardiovasculaires,...). Néanmoins, les

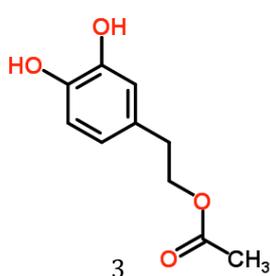
Structures chimiques des composés phénoliques identifiés majoritaires dans les extraits des margines et des grignons d'olive marocaine.



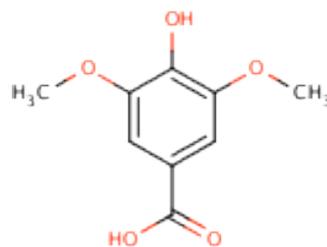
1
Tyrosol
M = 138



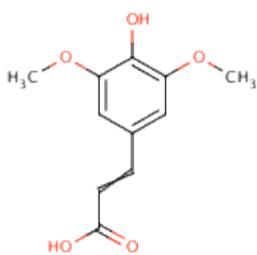
2
Hydroxytyrosol
M=154



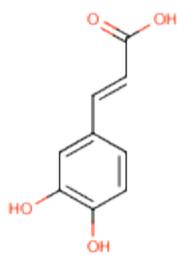
3
Hydroxytyrosol acetate
(3,4-DHPEA-AC)
M= 195



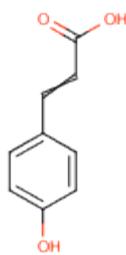
4
Acide Syringique
M= 198



5
Acide Sinapique
M= 224



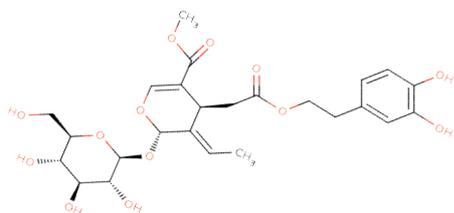
6
Acide Caféique
M=180



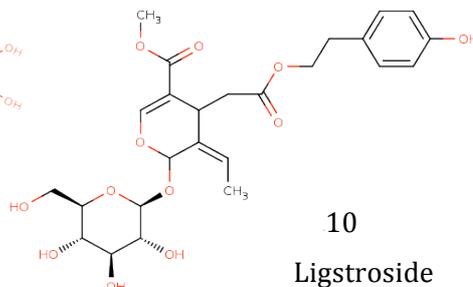
7
Acide p-coumarique
M=164



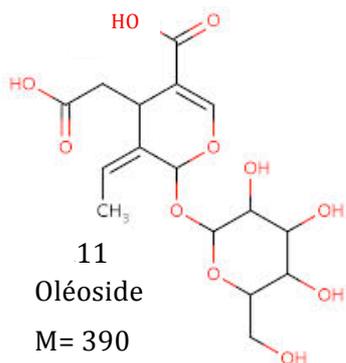
8
Acide Elenolique
M=242



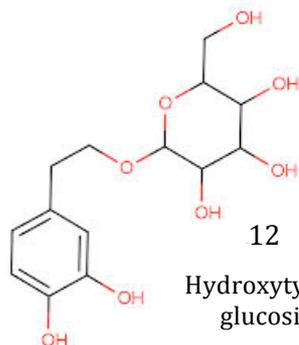
9
Oleuropéine
M=540



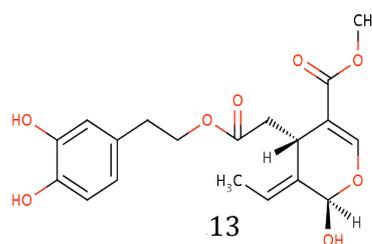
10
Ligstroside
M= 524



11
Oléoside
M= 390



12
Hydroxytyrosol
glucoside
M= 316



13
Oleuropéine aglycon
(3,4 DHPEA-EA)
M= 378

ISSN 2278-4136
JPP 2014; 2 (6): 154-165
Received: 28-02-2014
Accepted: 11-03-2014

Inass Leouifoudi

(a) *Transdisciplinary Team of Analytical Science for Sustainable Development, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco.*

(b) *Laboratory of Biological Engineering, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco.*

Mohamed Mbarki

Transdisciplinary Team of Analytical Science for Sustainable Development, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco.

Mounir Tilaoui

Laboratory of Biological Engineering, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco.

Ali Amechrouq

Laboratory of Molecular Chemical and Substances, Faculty of science, Meknes, Morocco.

El Mostapha Rakib

Laboratory of Organic and Analytical Chemistry, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco.

Hassan Aït Mouse

Laboratory of Biological Engineering, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco.

Abdelmajid Zyad

Laboratory of Biological Engineering, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco.

Correspondence:**Abdelmajid Zyad**

Laboratory of Biological Engineering, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco.

Email: Ab.zyad2@gmail.com

Tel: 00.212.667.19 62 69

Study of the *in vitro* anticancer activity of Moroccan phenolic olive cake extracts

Inass Leouifoudi, Mohamed Mbarki, Mounir Tilaoui, Ali Amechrouq, El Mostapha Rakib, Hassan Aït Mouse, Abdelmajid Zyad

ABSTRACT

The present work aimed to investigate the phenolic composition and the *in vitro* anticancer activity of ethanol olive cake extracts (OCE) originating in different areas of Tadla-Azilal region in Morocco. The HPLC-MS analysis showed that OCE were rich in biophenols mainly composed of secoiridoids and their derivatives, phenolic acids and flavonoids. The bioactivity of these phenolic extracts was evaluated by testing their cytotoxic effect against P815 mastocytoma murine cell line using the MTT assay. The results showed that the OCE exerted an *in vitro* cytotoxic activity in a dose-dependent manner, and the IC₅₀ values were ranging from 20 to 40 µg/mL. Interestingly, compared to the conventional antitumor drug methotrexate, no cytotoxic effect of OCE was observed on the normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Furthermore, the extracts showed an apoptotic effect against P815 tumor cell line depending on the dose and the extract's phenolic content.

Keywords: Phenolic compounds, Olive cake, HPLC-ESI-MS, Cytotoxic activity, Apoptotic effect.

Abbreviations used in this paper: ACN: Acetonitrile, DMSO: Dimethyl Sulfoxide, FCS: Fetal Calf Serum, PBS: Phosphate Buffer Salin, TFA: Trifluoroacetic acid, OCE: Olive Cake Extract

1. Introduction

Olive oil industry, though ensuring the production of virgin olive oil as food that has different virtues for human health, is a source of pollution because of the generation of large quantities of olive mill wastes (OMW). This has become a major environmental problem in the Mediterranean olive oil producing countries such as Morocco because of their release of high polluting organic compounds. OMW are composed of two by-products: an aqueous liquid known as olive mill wastewaters and a solid waste named olive cake [1]. This solid residue, also called pomace or alperujo, is the most important waste generated in the virgin olive oil extraction process [2, 3]. It consists of skin, pulp and stone pieces of olive fruit. Olive cake is substantially composed of carbohydrates (polysaccharides, cellulose and hemicellulose), proteins, minerals and phenols (simple, acid and glycosilated phenols), [4]. Therefore, the phenolic compounds are present in olives, olive oil and olive by-products. Olive oil contains 2% of the total phenolic content of the olive fruits, while the remaining 98% is present in olive mill waste, confirming the interest of their useful valorization methods [5]. Nevertheless, their concentration and composition vary from a region to another depending on different factors and parameters [6].

Furthermore, optimized methods are expected for the valorization and environmental impact reduction of these by-products mainly as fuel, fertilizer, animal food or energy recovery [7, 8, 9, 10]. Olive cake can be effectively used as a natural and inexpensive source of cytotoxic, antioxidant and antimicrobial phenolic compounds with a wide range of bio-applications [11, 7, 12, 13].

The present work aimed to investigate the phenolic composition of OCE originating from different areas of Tadla Azilal region (central Morocco), and to evaluate the *in vitro* cytotoxic effect of these phenolic extracts as well as the apoptosis induction potential against P815 tumor cell line.

Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater

Inass LEOUIFOUDI^{1,2*}, Abdelmajid ZYAD², Ali AMECHROUQ³, Moulay Ali OUKERROU²,
Hassan Ait MOUSE², Mohamed MBARKI¹

Abstract

Olive mill wastewater, hereafter noted as OMWW was tested for its composition in phenolic compounds according to geographical areas of olive tree, i.e. the plain and the mountainous areas of Tadla-Azilal region (central Morocco). Biophenols extraction with ethyl acetate was efficient and the phenolic extract from the mountainous areas had the highest concentration of total phenols' content. Fourier-Transform-Middle Infrared (FT-MIR) spectroscopy of the extracts revealed vibration bands corresponding to acid, alcohol and ketone functions. Additionally, HPLC-ESI-MS analyses showed that phenolic alcohols, phenolic acids, flavonoids, secoiridoids and derivatives and lignans represent the most abundant phenolic compounds. Nüzhenide, naringenin and long chain polymeric substances were also detected. Mountainous areas also presented the most effective DPPH scavenging potential compared to plain areas; IC₅₀ values were 11.7 ± 5.6 µg/ml and 30.7 ± 4.4 µg/ml, respectively. OMWW was confirmed as a rich source of natural phenolic antioxidant agents.

Keywords: phenolic compounds; olive mill wastewater; HPLC-ESI-MS; antioxidant activity.

1 Introduction

The olive oil industry in the Mediterranean region rejects annually up to 8.4 million m³ of OMWW, of which 250 000 m³ are produced in Morocco (Ben Sassi et al., 2006). This has become a major environmental problem in the countries of this region. Tadla-Azilal is an important olive oil production region of Morocco and the resulting OMWW was directly discharged in soils without any treatment, thus causing a negative environmental impact (Ruiz-Rodriguez et al., 2010). OMWW is a mildly acidic, red-to-black coloured, liquid of high conductivity. It is particularly rich in organic matter and toxic fatty acids (Mekki et al., 2006; Sayadi et al., 2000). The high-molecular-weight polyphenols, similar in structure to lignin, give OMWW their characteristic brownish black colour (Assas et al., 2002; D'Annibale et al., 2004). Moreover, the high pollution potential of this effluent is commonly attributed to its high phenolic content of monomeric phenols, toxic to plants, water and some microorganisms (Capasso et al., 1992). OMWW may contains up to 10 g of phenols per liter (D'Annibale et al., 1998) while in the European Union, the accepted maximum phenol concentration in wastewaters is 1 mg/L (Urban waste water treatment Directive 91/271/EEC) (European Commission, 1991). Therefore, environmental survey authorities encourage the producers to change their production systems. However, OMWW can be considered as a rich source of natural antioxidant phenolic compounds 100 fold concentrated than in olive oil (Lesage-Meessen et al., 2001). Its composition varies both qualitatively and quantitatively according to the olive variety, climate conditions, cultivation practices, the olive storage time, and the olive oil extraction process

(Borja et al., 1997; Ergun Ergül et al., 2009; Fiorentino et al., 2003; Davies et al., 2004). Apart from water (83-92%), the main components of OMWW are phenolic compounds, sugars and organic acids. OMWW contains also valuable resources such as mineral nutrients, especially potassium, which could potentially be reused as a fertilizer (Aranda et al., 2007; Dermeche et al., 2013). Thus, the scientific community is still in search of effective processes for reducing these contaminants (Mantzavinos & Kalogerakis, 2005). In this way, several techniques have been used to recover phenolic compounds from olive by-products, including enzymatic preparation, solvent extraction, membrane separation, centrifugation, and chromatographic procedures (Dermeche et al., 2013). Solvent extraction is the most commonly employed technique to extract phenolic compounds, and ethyl acetate is the most effective solvent for the treatment of OMWW under acidic conditions (Allouche et al., 2004). Different processing practices such as biological, chemical and physical methods have been used for the valorisation of olive residues while the development of these processes is deterred by their expensive costs. Furthermore, the renewed interest in such natural products has been supported by advances in chromatographic and spectroscopic techniques that have greatly facilitated drug discovery from plants (Obied et al., 2005).

The aim of the present work was to identify and quantify the phenolic compounds, occurring in Moroccan OMWW originating from different areas, in view to understanding their molecular bioactivities of further applications such as antioxidant potentialities.

Received 12 Dec., 2013

Accepted 21 Apr., 2014 (006240)

¹ Transdisciplinary Team of Analytical Science for Sustainable Development, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco

² Laboratory of Biological Engineering, Faculty of Science and Technologies, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco, e-mail: inass.leouifoudi@gmail.com

³ Laboratory of Molecular Chemical and Natural Substances, Faculty of Science, Meknes, Morocco

*Corresponding author

Merci au Pr. Hicham Harnafi du laboratoire de génétique et biotechnologie des plantes pour m'avoir formée aux analyses antioxydantes.

Mes remerciements vont également au professeur Ali Amechrouq de la faculté des sciences de Meknès, merci infiniment pour m'avoir initiée aux techniques d'analyse chromatographiques et spectrométriques.

Je remercie aussi les membres du CNRST, tout particulièrement, Monsieur Said Gamouh et Madame Hind Cheqchaq, pour leurs efforts et leur implication.

Je salue également tous les membres du CED ainsi que tout le personnel enseignant et administratif de la FST de Béni que j'ai côtoyé pendant mes années d'études.

Je réserve mes derniers remerciements;

A mes parents bien aimés qui m'ont permis de faire ces études dans des conditions idéales et m'ont toujours écoutée et soutenue.

A ma sœur et mes frères.

Un remerciement particulier à mon oncle Dr. El Mostapha El Khouzai, pour ta passion, ton accompagnement et tes cours de développement de personnalité.

A mon ami Ricardo, pour ton accompagnement pertinent professionnel.

I. Leouifoudi¹, M. Mbarki¹, E. Rakib², S. Gmouh³, H.Chakchak³, J. A. Ziad. Identification, caractérisation et étude de l'activité antitumorale des composés phénoliques des grignons et des margines d'olives. Le Congrès International de Cancérologie (CIC), le 06 et 07 Mai 2011 à la faculté des sciences et Techniques Béni Mellal.

Leouifoudi Inass, Mbarki Mohamed, Rakib Elmostapha, H. Ait Mouse, Tilaoui Mounir, Ziad Abdelmajid. Identification, characterization and study of the antitumor activity of phenolic compounds extracts from olive cake and olive wastewaters. The 5th International Conference on Polyphénols and Health du 17 au 20 Octobre 2011, Sitges, Barcelone.

I. Leouifoudi, M. Mbarki, E. Rakib, A. Amechrouq, H. Ait Mouse, M. Tilaoui, A. Ziad. Identification, Characterization and study of the antitumor activity of phenolic compounds extracted from Moroccan olive cake. The second symposium on analytical chemistry for sustainable development – ACSD2013, du 7 au 9 mai 2013 à Marakech.

I. LEOUIFOUDI, M. MBARKI, E. RAKIB, A. AMECHROUQ, H. AIT MOUSE, A. ZYAD. Biophenols extracted from Moroccan olive cake and olive wastewaters: *in vitro* cytotoxic, antioxidant and apoptotic properties. The third annual Meeting of the Middle Eastern Association for cancer Research. 5-7 Décembre 2013, Rabat.

Autres communication en congrès internationaux

- Communication orale

M. Mbraki, M. A Gondal, M. A. Dastageer, I. Leouifoudi and A. Ziad, Z. Seddigi. Assessing the environmental impact of the olive industry. La quatrième Rencontre de la Chimie Moléculaire (RICM4), Novembre 2010 à Marrakech.

II.5.1. Le stress oxydatif	28
II.5.2. Les polyphénols comme antioxydants	28
II.5.2.1. Piégeage des radicaux libres.....	29
II.5.2.2. Inhibition enzymatique.....	29
II.6. Les composés phénoliques des grignons et des margines.....	30
II.7. Caractérisation des composés phénoliques des grignons et des margines.....	32
II.7.1. Extractions des composés phénoliques	32
II.7.1.1. Conditions d'extraction des polyphénols, facteurs d'influences.....	32
II.7.2. Dosage des composés phénoliques	34
II.7.2.1. Dosage global par colorimétrie.....	34
II.7.2.2. Dosage par chromatographie.....	34
II.7.2.3. Dosage par spectrophotométrie.....	35
II.7.3. Identification des composés phénoliques.....	35
II.8. Utilisation des polyphénols extraits des grignons et des margines, alternatives phytothérapeutiques.....	36
II.8.1. Activité antioxydante	36
II.8.2. Activité antibactérienne	37
II.8.3. Activité anti-inflammatoire.....	38
II.8.4. Activité antitumorale	38
II.8.5. Autres activités biologiques	39
III. Le cancer : Epidémiologie, Mécanisme et Traitement.....	39
III.1. Epidémiologie du cancer	39
III.2. La cancérogenèse : un processus multi-étapes	42
III.2.1. Anomalie génétique et gènes du cancer	44
III.2.2. Rôle de l'environnement.....	45
III.2.3. Les mécanismes de protection de l'ADN	45
III.2.4. L'immunosurveillance.....	46
III.3. Traitement du cancer	47
III.3.1. La chirurgie.....	47
III.3.2. La radiothérapie.....	47
III.3.3. L'hormonothérapie	48
III.3.4. La chimiothérapie	48
III.3.4.1. Problèmes d'utilisation de la chimiothérapie.....	48
III.3.5. L'apoptose, une cible privilégiée pour la thérapie anticancéreuse	49
III.3.5.1. Effet antiprolifératif des polyphénols induit par voie apoptotique	51

NCCL : National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : Paire de base

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononuclées du sang périphérique)

PBS : Phosphate buffered saline

PDA : Diode array detectors ou détecteur à barrette de diodes

ROS : Espèces oxygénées réactives

SDS: Sodium dodecyl sulfate

TBE : Tris borate EDTA

TFA: Trifluoroacetic acid

tr : Temps de rétention

TRIS : Tris (hydroxyméthyle) aminométhane

UFC : Unité formant colonie

UV : UltraViolet

v/V : Volume à volume

Figure 29 : Effet du temps de stockage d'olive avant trituration et de la période de collecte sur la teneur en polyphénols totaux	70
Figure 30 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits phénoliques des grignons et des margines d'olive.	72
Figure 31 : Chromatogrammes HPLC du profil phénolique des extraits des grignons.....	78
Figure 32 : Chromatogrammes HPLC d'extraits phénoliques de margines	81
Figure 33 : Illustration d'une plaque de 96 puits soumise au test anti-radicalaire au DPPH...94	
Figure 34 : Activité anti-radicalaire des extraits phénoliques des grignons et des margines d'olive sur les radicaux libres du DPPH.....	96
Figure 35 : Dosage de l'activité antioxydante des extraits des grignons et des margines par le test BCBT	98
Figure 36 : Corrélation entre le pouvoir antioxydant et la teneur en polyphénols totaux des extraits phénoliques des margines et des grignons.....	99
Figure 37 : Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons	112
Figure 38 : Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits phénoliques des margines	112
Figure 39 : Valeurs des IC ₅₀ de l'activité cytotoxique des extraits des grignons et des margines.	113
Figure 40 : Photographie (G x 400) de la lignée cellulaire P815 traitée par les extraits phénoliques des grignons (concentrations correspondantes à l'IC ₅₀).....	115
Figure 41 : Photographie (G x 400) de la lignée cellulaire P815 traitée par les extraits phénoliques des margines avec concentrations correspondantes à l'IC ₅₀	116
Figure 42 : Effet cytotoxique des extraits des grignons contre la lignée tumorale MCF7	118
Figure 43 : Effet cytotoxique des extraits des grignons contre la lignée tumorale P815	118
Figure 44 : Effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines sur les PBMC.	120
Figure 45 : Electrophorèse sur gel d'agarose montrant la fragmentation apoptotique de l'ADN de la lignée P815.	122
Figure 46 : Cellules P815 apoptotiques traitées par les extraits phénoliques des grignons...123	
Figure 47 : Cellules P815 apoptotiques traitées par les extraits phénoliques des margines...124	

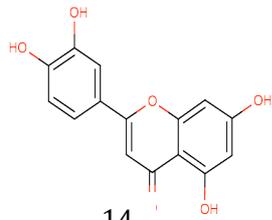
grignons et les margines d'olive sont riches en ces polyphénols. Un grand nombre de ces composés phénoliques ont montré des activités biologiques et pharmacologiques remarquables.

Par ailleurs, l'épidémiologie du cancer est de plus en plus alarmante et de fréquence ascendante, particulièrement dans les pays où le mode de vie est à tendance moderne et industrialisée aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement, comme le Maroc. Plus de 70% des décès par cancer surviennent dans les pays à faible revenu ou à revenu intermédiaire. D'après les projections, le nombre de ces décès devrait augmenter à l'horizon 2025 pour atteindre 19,3 millions à l'échelle mondiale contre 10 millions en 2000 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Au Maroc, 7,2 % des décès par an sont imputés au cancer. Malgré les efforts de recherche effectués depuis de nombreuses années, le nombre de cancers est toujours en augmentation. Cependant, une détection précoce et un traitement adéquat sont les chances de guérison pour de nombreux cancers. En outre, le développement de thérapies naturelles ciblées représente un grand défi.

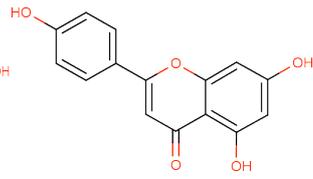
Dans cette perspective, les thérapies à base de plantes et les phytomédicaments sont de plus en plus sollicités en dépit des médicaments chimiques anticancéreux ayant des inconvénients majeurs à cause de leurs effets secondaires néfastes. La marge de gain en termes de prise en charge socio-médicale des patients cancéreux dont les gouvernements pourront tirer profit grâce à ces substances curatives naturelles encourage de plus en plus les équipes de recherche à la découverte de nouvelles molécules comme remède à une telle pathologie difficilement curable et dont le traitement coûte de plus en plus cher.

L'ensemble de ces raisons nous ont amené à réaliser le présent travail de thèse sur l'identification et la caractérisation des polyphénols extraits des grignons et des margines d'olives marocaines et l'évaluation de leur propriétés biologiques et thérapeutiques en tant qu'agents antioxydants, antibactériens et anticancéreux naturels.

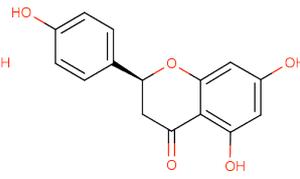
La première partie de ce mémoire est une étude bibliographique concernant i) les grignons et les margines d'olive, leurs caractéristiques physico-chimiques et leur traitement et valorisation; ii) les composés phénoliques leur propriétés chimiques et leur rôle dans les plantes ainsi que leur implication dans les activités biologiques en tant qu'alternatives phytothérapeutiques et enfin, iii) l'épidémiologie du cancer et thérapies anticancéreuses. Cette étude est suivie d'un descriptif du matériel et méthodes utilisés au cours de ce travail. La



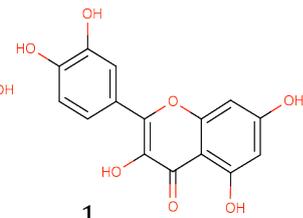
14
Lutéoline
M= 286



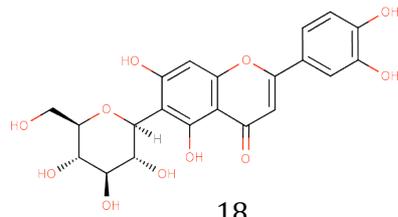
15
Apigénine
M= 270



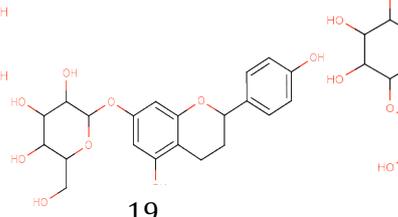
16
Naringénine
M= 272



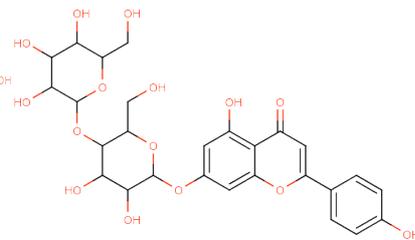
17
Quercétine
M= 302



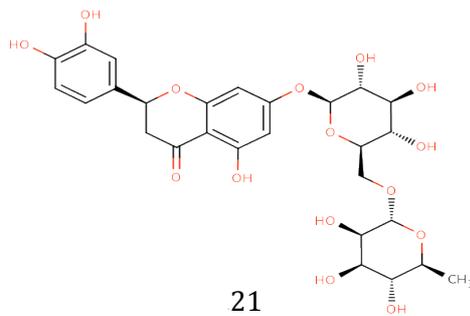
18
Lutéoline-7-glucoside
M= 448



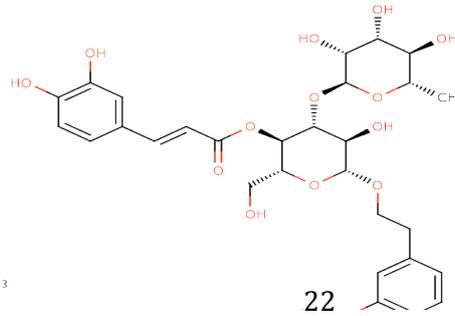
19
Apigénine-7-glucoside
M= 432



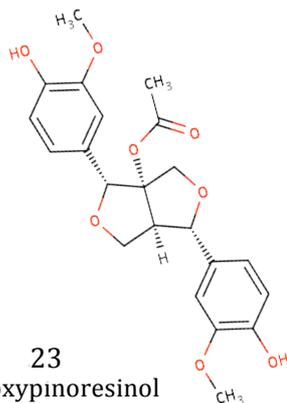
20
Apigénine-7-rutinoside
M= 578



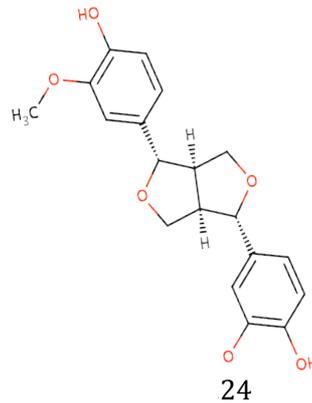
21
Rutine
M= 610



22
Verbascoside
M= 624



23
1-acetoxypinoresinol
M= 416



24
Pinoresinol
M= 358

2. Materials and Methods

Chemicals

All solvents and chemicals were of HPLC grade and were obtained from Sigma Chemical Co., Saint Quentin (France).

2.1 Plant material

Moroccan Picholine olives variety was identified and authenticated by Pr. A. Boulli, Department of life science, Sultan Moulay Slimane University, and stored as a voucher specimen in the Faculty of Science and Technologies, Beni Mellal, Morocco. Samples of olive cake were collected in mills from four areas of Tadla-Azilal region, namely: Beni Mellal and Krazza (plain areas), Azilal and Awrir (mountainous areas) during the winter of 2012 (January to March period). These samples were from the three-phase centrifugation oil extraction process of red-black olives maturation stage.

2.2 Phenolic compounds extraction

Dry olive cake samples (60 g each) were grounded in a coffee grinder, sifted and then defatted with 500 ml hexane in a Soxhlet apparatus for four hours. Defatted olive cake samples were subjected to soxhlet extractions using ethanol solvent. Olive cake samples (60 g) were placed in extraction thimbles into the soxhlet apparatus. 500 ml of ethanol were placed in a round flask (500 ml capacity) and then the flask was connected to the soxhlet extractor for 12 h at 70 °C of continuous extraction [11]. The resulting olive cake extracts (OCE) were concentrated by rotary evaporator and stored at - 18 °C for further analysis.

2.3 Evaluation of total phenolic compounds content

The total phenolic compounds content in each extract was evaluated by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu method [14, 15] with some modifications. Briefly, 2.5 ml portion of Folin-Ciocalteu reagent 0.2 N was mixed with 0.5 ml of the sample. The reaction was kept in the dark for 5 min. Then, 2 ml of a sodium carbonate solution (75 g/l) was added to the mixture and the reaction was kept in the dark for 1 h. The absorbance was measured at 760 nm in Jasco V-630 spectrophotometer. Gallic acid was used as phenolic compound standard for calibration curve (10–90 mg/mL; $y = 0.0008x - 0.0002$, where x and y represent gallic acid concentration (mg/mL) and absorbance at 765 nm, respectively; $r^2 = 0,9981$). Contents of total phenolic compounds in OCE were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW).

2.4 High performance liquid chromatography/Electro-Spray Ionization Mass Spectrometry (HPLC/ ESI-MS) analysis

HPLC–MS analysis were performed at 279 nm and 30 °C using a RP C18 column (150 x 4.6) x 5 µm with a Thermo Fisher apparatus equipped with a Surveyor quaternary pump coupled to PDA detector (diode array detector: 200–600 nm) and an LCQ Advantage (ESI) ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA). The

injected volume was 20 µL. The mobile phase (0.5 mL/min) consisted of solvent A: TFA 0.05% in water and solvent B: TFA 0.05% in ACN. A Six-steps gradient was applied, for a total run time of 76 min, as follows: Starting from 80% solvent A and 20% solvent B increasing to 30% solvent B over 30 min, then isocratic for 10 min, increased to 30% solvent B over 10 min, to 40% over 30 min and to 20% solvent B over 2 min, and finally isocratic for 4 min. ESI ionization conditions were spray voltage 4 KV, capillary 350 °C, 14 V. Pure nitrogen was the sheath gas and pure helium was the collision gas. The full scan mass data m/z was obtained in positive mode and ranged from 100 to 2000 Da.

2.5 Cytotoxicity assay

The cytotoxic activity was studied against the murine mastocytoma cell line (P815) using the colorimetric (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) MTT test (Sigma Aldrich) as described and modified by Tim Mosmann [15]. The cells were washed twice and placed in 96-well microtiter plates (Bioster, Italy) at a density of 1.5×10^4 cell/mL in 100 µL/well of culture medium (DMEM supplemented with 5% FCS and 1% of penicillin and streptomycin) (Sigma Aldrich). Then, 100 µL of culture medium containing the specified concentration of the tested compounds (solubilised in DMSO) were added in each well at the starting concentration of 50 µg/mL. After exposure of cells to serial concentrations of tested extracts for 48 h at 37 °C and 5% CO₂, 100 µL of medium were carefully aspirated from each well and replaced by 20 µL of MTT solution (5 mg/mL of PBS). After incubation in the same conditions for 4 hours, the plates were treated with a solution of HCL/isopropanol (24:1) to dissolve the blue intracellular formazan product. One hour later, the plates were read in a MicroELISA reader at two wavelengths (540 and 630 nm). DMSO was used as a negative control while methotrexate as a positive one.

2.6 Apoptotic cell death assay

2.6.1 Annexin V Biotin-Streptavidin FITC Test

The apoptosis analysis was performed using the Annexin V Biotin-Streptavidin FITC test. Briefly, a dense culture of P815 tumor cells in 25 cm² flasks (2×10^6 cells in 10 mL DMEM) was treated with 25 µg/mL of OCE. After 24 h incubation in the same culture conditions as above, cell pellets were washed with PBS, stained with Annexin V-Biotin, and treated with streptavidin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) for 30 min. The fluorescence was visualized using an Olympus BX50 microscope equipped with an appropriate fluorescence filter in order to detect apoptosis induction. The assay is based on the ability of Annexin V (green fluorescence) to be bound to the phosphatidylserine exposed on the surface of cells undergoing apoptosis [16].

2.6.2 DNA fragmentation test

P815 tumor cells were incubated with OCE (IC₅₀ corresponding concentrations) for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. The cells were recovered and lysed by the lysis buffer (100 mM tris HCl, 0.5M EDTA, 10% SDS (sodium

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All solvents and chemicals were of HPLC grade and were obtained from Sigma Chemical Co. Saint Quentin (France).

2.2 Samples

Four OMWW samples were obtained as a liquid by-product (vegetation waters) by discontinuous three-phase olive processing mill and conserved at 4 °C. Samples were generated from *Moroccan Picholine* olives variety (Moroccan Picholine olive variety was identified and authenticated by Pr. A. Boulli, Department of Biology, Sultan Moulay Slimane University, and stored as a voucher specimen in the Faculty of Science and Technologies, Beni Mellal, Morocco). The studied samples were collected at the end of the olive harvest season (January to March 2010) – at the maturation stage of red-black olives from four areas of Tadla-Azilal region (central Morocco): Beni Mellal and Krazza (for plain areas samples), Azilal and Afourar (for mountainous areas samples).

2.3 Extraction of phenolic compounds

The procedure was carried out using the analytical methodology described by De Marco et al. (2007) with some modifications. The Samples were washed with hexane [1:1, (v/v)] in order to remove the lipid fraction: 45 ml of OMWW were mixed with 45 mL of hexane; the mixture was shaken and then centrifuged during 15 min at 4000 rpm. The phases were separated and the washing was repeated successively two times. Extraction of phenolic compounds was then carried out with ethyl acetate: 100 mL of OMWW samples, preventively washed, were mixed with 100 mL of ethyl acetate; the mixture was vigorously shaken and centrifuged for 10 min at 4000 rpm. The phases were separated and the extraction was repeated successively three times. The ethyl acetate was evaporated and the residue was stored at - 20 °C for subsequent analyses.

2.4 Evaluation of the total phenolic compounds content

The total phenolic compounds content in each extract was evaluated by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu method (Singleton & Rossi, 1965; Scalbert et al., 1989) with some modifications. Briefly, 2.5 ml portion of Folin-Ciocalteu reagent 0.2 N was mixed with 0.5 ml of the sample. The reaction was kept in the dark for 5 min. Then, 2 ml of a sodium carbonate solution (75 g/l) was added to the mixture and the reaction was kept in the dark for 1 h. The absorbance was measured at 765 nm in Jasco V-630 spectrophotometer. Gallic acid was used as phenolic compound standard for calibration curve (10-90 mg/L; $y = 0,0009 x - 0,0004$, where x and y represent gallic acid concentration (mg/L) and absorbance at 765 nm, respectively; $r^2 = 0,9981$). Contents of total phenolic compounds in OMWW were expressed as gallic acid equivalents in gram per liter (g GAE/L residue).

2.5 Middle Infrared spectroscopy analysis

FT-MIR spectra of duplicate samples were obtained using a Bruker Vector 22 spectrometer possessing an integrated Michelson interferometer and Opus 5.5 software. The measurements were obtained with crude samples deposited on an attenuated reflection cell equipped with a diamond crystal. The generated spectra showed wavenumbers ranging between 400 and 4000 cm^{-1} .

2.6 HPLC/ESI-MS analyses (High performance liquid chromatography/Electro-Spray Ionization-Mass Spectrometry)

HPLC-MS analyses were performed at 279 nm and 30°C using a RP C18 column (150 × 4.6) × 5 μm possessing a Thermo Fisher apparatus equipped by a Surveyor quaternary pump coupled to a PDA detector (diode array detector: 200-600 nm) and an LCQ Advantage (ESI) ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA). The injected volume was 20 μL . The mobile phase (0.5 mL/min) consisted of solvent A (water +0.05% Trifluoroacetic acid) and solvent B (Acetonitrile +0.05% methanol). The six-step gradient was applied, for a total run time of 76 min, as follows: Starting from 80% solvent A and 20% solvent B increasing to 30% solvent B over 30 min, then isocratic for 10 min, increased to 30% solvent B over 10 min, to 40% over 30 min and to 20% solvent B over 2 min, and finally isocratic for 4 min. ESI ionization conditions were spray voltage 4 KV, capillary 350°C, 14 V. Pure nitrogen was the sheath gas and pure helium was the collision gas. The full scan mass data m/z was obtained in negative mode and ranged from 100 to 2000 Da.

2.7 Antioxidant activity

The antioxidant activity was performed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay. The test was carried out in a 96 well microtiter plate. The samples and positive control, vitamin C, were diluted with methanol to prepare the extract solutions equivalent to 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μg of sample/ml concentrations. 150 μl of 0.004% DPPH solution was pipetted into each well of 96 well plate followed by 8 μl of the sample solutions. The plates were incubated at 37 °C for 30 min and the absorbance was measured at 540 nm, using ELISA microtiter plate reader. The experiment was performed in triplicate and percentage of the scavenging activity was calculated using the formula given below. IC_{50} (Inhibitory concentration) is the concentration of the sample required to scavenge 50% of DPPH free radicals (Equation 1).

$$\% \text{ Scavenging} = (A_0 - A_s / A_0) * 100 \quad (1)$$

where A_0 is absorbance of the control and A_s is absorbance of the sample at 540 nm.

2.8 Statistical analysis

The experimental results were performed in triplicate and the data were expressed as means \pm standard deviation. The comparison of the averages was made by Student test (STATISCA software). Differences are considered significant at $p < 5\%$.

CHAPITRE 2: Matériels et Méthodes	53
I. Matériel végétal	53
II. Caractérisation chimique, extraction, dosage et identification des polyphénols dans les grignons et les margines.....	54
II.1. Analyse par spectroscopie Infra Rouge à transformé de Fourier.....	54
II.2. Extraction des composés phénoliques.....	54
II.2.1. Extraction des polyphénols présents dans les grignons	54
II.2.2. Extraction des polyphénols présents dans les margines.....	54
II.3. Dosage des polyphénols totaux	57
II.4. Identification des composés phénoliques par HPLC-ESI- MS	57
III. Etude de l'activité antioxydante des extraits des grignons et des margines.....	58
III.1. Test au DPPH	58
III.1.1. Evaluation du potentiel anti-radicalaire	58
III.2. Test de décoloration au β -carotène (BCBT).....	59
III.2.1. Evaluation du potentiel antioxydant	59
IV. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits des grignons et des margines	60
IV.1. Souches bactériennes et conditions de culture.....	60
IV.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	60
V. Etude de l'activité antitumorale <i>in vitro</i> des extraits des grignons et des margines	61
V.1. Lignées tumorales, réactifs et culture cellulaire.....	61
V.2. Etude de l'effet cytotoxique <i>in vitro</i>	62
V.2.1. Test MTT (Methyl Tetrazolium Test).....	63
V.2.2. Test de cytotoxicité contre les cellules normales PBMC	63
V.3. Recherche de la mort cellulaire programmée (Apoptose).....	64
V.3.1. Test de fragmentation de l'ADN.....	64
V.3.2. Test de marquage des caspases à l'Annexine V-Biotine (FITC).....	65
CHAPITRE 3 : Caractérisation chimique des grignons et des margines.....	66
I. Etude phytochimique	67
I.1. Analyse par spectrométrie FT-MIR.....	67
I.2. Caractérisation des facteurs d'influence sur l'extraction des polyphénols.....	69
I.2.1. Effet du solvant d'extraction sur la teneur en polyphénols	69
I.2.2. Effet du temps d'extraction sur la teneur en polyphénols	69
I.2.3. Effet de la période de collecte et du temps de stockage d'olives	70

troisième partie présente les résultats obtenus et leur discussion et enfin une conclusion générale.

Tout d'abord, notre intérêt s'est porté sur la caractérisation chimique des grignons et des margines et leurs extraits phénoliques originaires des différentes zones de la région Tadla-Azilal (Maroc). Puis une identification des composés phénoliques dans ces extraits et la mise en relation avec les différents paramètres pouvant influencer la composition chimique a été réalisée.

Par la suite, une étude sur l'activité antioxydante des extraits phénoliques des grignons et des margines a été évaluée en tenant compte de leur origine bioclimatique et en se basant sur des essais *in vitro*. Ensuite, une étude de l'effet antimicrobien a été effectuée contre trois souches bactériennes dans le but de déterminer leur sensibilité aux extraits phénoliques des grignons et des margines en fonction de leur composition phénolique.

Enfin, une étude *in vitro* de l'activité anticancéreuse des polyphénols des grignons et des margines a été entreprise contre deux lignées de cellules tumorales. Une évaluation de la cytotoxicité de ces extraits sur les cellules normales (PBMC) a aussi été réalisée afin d'évaluer le risque des effets secondaires sur les cellules saines comparativement à la chimiothérapie. Ce premier volet a été complété par une étude moléculaire visant à comprendre l'effet de ces extraits phénoliques sur l'induction de la mort cellulaire programmée (apoptose).

dodecyl sulfate), 5 M NaCl and 20 mg/ml proteinase k). Digestion was complete within 2-3 hours at 37 °C with constant agitation. About 500 µl of isopropanol were then added to the lysate to complete DNA precipitation (10-20 min). After precipitation, DNA was dissolved in 60 µL of a solution (7.5 pH) containing 10 mM tris HCl, 0.1 mM EDTA. Complete dissolution of DNA required several hours with constant agitation at 37 °C. Finally, 10 µl of the loading buffer (glycerol, xylene cyanol, bromophenol blue, ficcol, EDTA) were added and DNA samples were loaded onto a 2% agarose gel. DNA fragments were separated by horizontal electrophoresis (50 V, 30 mA for 4 h). The gel was stained with ethidium bromide and visualized under UV light (310 nm). Molecular weight marker and DNA extracted from cells cultures in serum starvation condition were used as a positive control.

2.7 Effect of OCE on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

This test was realized in order to evaluate the effect of the extracts on human normal cells using the MTT colorimetric assay described above. To isolate the PBMC,

blood samples were collected, under medical control, from healthy volunteer donors in heparinised tubes. The peripheral blood mononuclear cells were isolated using standard Ficoll-hypaque density centrifugation (Amersham Pharmacia Biotech AB). Interface lymphocytes were washed twice with PBS. OCE and methotrexate cytotoxic effect was measured in the same conditions as detailed above for tumor cell lines.

2.8 Statistical analysis

The experimental results were performed in triplicate and the data are expressed as means ± standard deviation. The comparison of the averages is made by Student test (STATISCA software). Differences are considered significant at $p < 5\%$.

3. Results and Discussion

3.1 Total phenolic compounds content

The total phenolic compounds content was found to be higher in extracts from mountainous areas, 2.35 mg/g (DW) and 0.92 mg/g (DW), compared to plain areas extracts, 0.80 mg/g (DW) and 0.65 mg/g (DW) (Table 1).

Table 1: Total phenolic content expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW) in olive cake extracts

Area	Total phenolic content (mg GAE/g DW)
Awrir	2.354±0.045 ^a
Azilal	0.92±0.047 ^b
Beni Mellal	0.80±0.031 ^b
Krazza	0.65±0.009 ^b

Samples were collected from Tadla-Azilal region; phenolic compounds were extracted and determined for each area as described in materials and methods. Each value is expressed as mean ± standard deviation. Different letters mean significant differences ($P < 0.05$) (Student's test).

The content variation seems to be related to the impact of climate, soil composition, and geographical conditions [17, 18]. The plain areas of Tadla-Azilal region with irrigated rich deep clay soils, is characterized by a continental climate with an intense cold winter and a very hot summer. Mountainous areas are characterized with poor rocky soils and large periods of water shortage. The temperature varies from 3 - 4 °C to 48 - 50 °C with large variations of rainfall [19]. These conditions suggest an important degree of environmental stress mainly in the mountainous areas.

In this perspective, Boscaiu *et al.* [20] have found a positive correlation between the degree of environmental stress (soil composition, temperature variations and drought) and the level of phenolic compounds accumulated in plants. This correlation indicates the importance of the secondary metabolites in the defence mechanisms against stress.

3.2 Identification of phenolic compounds present in OCE by HPLC/ ESI-MS analysis

The screening of OCE by HPLC/ESI-MS provided the data for representative samples in figure 1 (a, b, c, d).

The identification of phenolic compounds was achieved by HPLC-MS analysis according to literature relative to previous HPLC/MS studies on olive cake phenolic extracts as indicated in Table 2 (A; B; C; D). The examination of the mass spectra of the investigated OCE revealed the presence of the most representative phenolic compounds of olive mill waste, especially glucosylated phenols (secoiridoids): oleuropein, ligstroside and secoiridoid derivatives; phenolic acids: sinapic acid, caffeic acid and vanillic acid; simple phenols: tyrosol and hydroxytyrosol, as well as flavonoids: apigenin, luteolin and their derivatives [4, 7, 13, 18, 21, 22].

3 Results and discussion

3.1 FT-MIR Infrared Spectra analysis

The FT-MIR spectra analyses of all OMWW extracts showed similar spectroscopic profiles although they originate from different geographical locations. The FT-MIR spectra of two OMWW extracts show similar characteristic features with some differences in bands intensity (Figure 1). The OH-stretching at 3430 cm^{-1} from numerous sources (including water) is very similar and shows higher intensity (Ibarra, 1989). The band at 2900 cm^{-1} from aliphatic C-H stretching (with the band at 1450 cm^{-1} from single bond vibrations) shows important intensity and points to important aliphatic moieties. OMWW extract shows a distinct band at 1625 cm^{-1} , which is attributed to C-C bonds conjugated with C-O and COO-groups. In the region $1400\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ the OMWW extracts show smaller intensity of the peak at 1400 cm^{-1} corresponding to COO- vibrations but in the entire region $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ they show much stronger intensity including the peak at 1260 cm^{-1} corresponding to C-O vibrations (Hoque, 1999). The detected functions presumably suggest the presence of the main constituents of olive mill wastewaters: fatty organic acids and phenolic compounds (Dermeche et al., 2013).

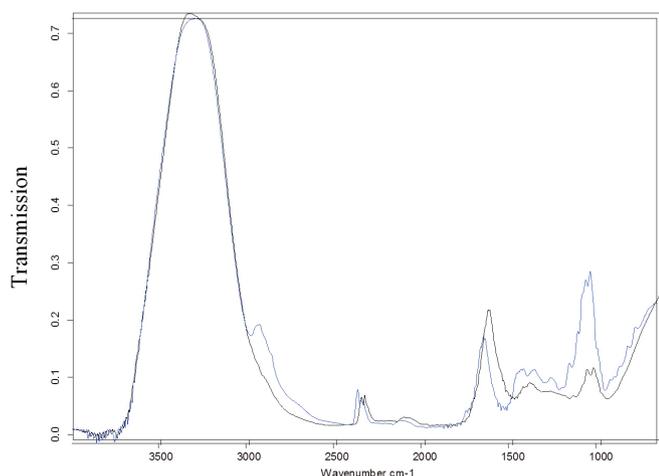


Figure 1. FT-MIR Spectra of two OMWW extracts originating from two geographical areas. For the extracts from the other areas, the TF-MIR spectra were similar. The band identities were so: 3430 cm^{-1} : (OH), 2940 cm^{-1} :(C-H), 1625 cm^{-1} : (C=C), 1400 cm^{-1} : (COO⁻), and 1260 cm^{-1} : (C-O).

Table 1. Total phenolic content in OMWW extracts from four geographical areas of Tadla-Azilal region, expressed as gram of gallic acid equivalents per litre of OMWW extracts.

	Mountainous areas		Plain areas	
	Azilal	Afourar	Beni Mellal	Krazza
Concentration (g GAE/L)	10.1 ± 0.011^b	8.8 ± 0.514^b	5.29 ± 0.171^a	5.27 ± 0.230^a

Each value is expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$). Different letters mean significant differences ($P < 0.05$) (Student test).

3.2 Total phenolic content

As can be seen in Table 1, the amount of total biophenols content varied according to the production area. The OMWW extracts originating from the mountainous areas have the highest amount of phenolic content compared to the extracts from the plain areas.

These results suggest the climate and the geographical conditions impact of the phenolic composition. Several factors converge to determine the amount of total phenolic compounds in OMWW, including the olive cultivar, soil composition, ripeness of the fruit, climate and agronomic conditions, storage conditions prior to extraction, and the processing techniques. These factors affect the phenol profile in olive fruit, so too will they affect the profile in olive residues (Dermeche et al., 2013; Allouche et al., 2004; Obied et al., 2005).

In this perspective, Boscaiu et al. (2010) have found a positive correlation between the degree of environmental stress and the level of phenolic compounds accumulated in the plants, suggesting a role of these secondary metabolites in the defence mechanisms against stress. However, Tadla Azilal region is characterized by a continental climate with an intense cold winter and a very hot summer. The temperature varies from $3^{\circ}\text{--}4^{\circ}\text{ C}$ to $48^{\circ}\text{--}50^{\circ}\text{ C}$ with large variations of rainfall. The mountainous areas are characterized by poor soils with large periods of water shortage compared to plain areas with irrigated rich soils (Juili et al., 2013), which may suggest an important degree of environmental stress mainly in mountainous areas.

3.3 Identification of phenolic compounds extracted from OMWW

The identification of biophenols was performed by comparing retention times on HPLC with literature and confirmed by relevant molecular mass data from LC-MS (data not shown). HPLC provided the separation of the major biophenols in the OMWW extracts as illustrated in Figure 2 for detection at 279 nm where the differences between mountainous and plain areas OMWW extracts are observed. Mountainous areas' extracts had higher levels of biophenols classes (68.01%; 68.81%) than plain areas' extracts (52.59%; 58.98%). The HPLC-MS analyses revealed the presence of a high amount of hydroxytyrosol, flavonoids and secoiridoid derivatives. In addition, verbascoside, nüzhenide and, mainly, a higher amount of polymeric substances (P) were also detected. The phenolic composition of OMWW extracts is summarized in Table 2.

The HPLC-MS analyses showed the presence of:

Phenolic alcohols: The ion spectra of tyrosol ($m/z\ 137$) and hydroxytyrosol ($m/z\ 153$), identified as the main phenolic compounds detected in OMWW, were found in all the investigated samples. The concentration of total phenol content ranged from 13 to 22 % depending on the geographical area. They were characterized by their highest antioxidant activity, especially hydroxytyrosol, and some other biological effects such as antimicrobial and anti-inflammatory activities (Allouche et al., 2004; De Marco et al., 2007; Capasso et al., 2002; Suarez et al., 2009; Visioli et al., 2002).

I.3. Détermination de la teneur totale en polyphénols dans les extraits des grignons et des margines.....	71
I.4. Discussion.....	73
II. Caractérisation des extraits phénoliques des grignons et de margines par HPLC-MS	77
II.1. Identification des composés phénoliques présents dans les extraits des grignons ...	77
II.2. Identification des composés phénoliques présents dans les extraits des margines ...	80
II.3. Discussion	84
CHAPITRE 4: Activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques des grignons et des margines.....	90
I. Activité antioxydante.....	90
I.1. Dosage de l'activité anti-radicalaire par le test au DPPH	90
I.2. Test de blanchissement au β -carotène (BCBT)..	95
I.3. Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante.....	97
I.4. Discussion.....	98
II. Activité antimicrobienne	103
II.1. Discussion.	105
CHAPITRE 5 : Activité antitumorale <i>in vitro</i> des extraits phénoliques des grignons et des margines.....	108
I. Etude <i>in vitro</i> de l'effet cytotoxique.....	109
I.1. Evaluation de l'activité cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines.....	109
I.2. Etude comparative de l'effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines contre deux lignées tumorales P815 et MCF7	115
I.3. Effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC).....	118
I.4. Induction de l'apoptose des cellules P815 par les extraits phénoliques des grignons et des margines.....	119
I.4.1. Fragmentation de l'ADN	119
I.4.2. Test des caspases par marquage à l'Annexine V-Biotine.....	120
I.5. Discussion.....	124
Conclusion Générale et perspectives	132
Références bibliographiques.....	138

CHAPITRE 1 : Etude bibliographique

I. Les grignons et les margines, sous produits de l'industrie d'huile d'olive

Depuis des milliers d'années, les peuples de la région Méditerranée ont été de plus en plus intéressés à la culture d'oliviers et la production d'huile d'olive en vue de ses multiples vertus pour la santé humaine. Aujourd'hui, environ 900 millions d'oliviers couvrent plus de 10 millions d'hectares à l'échelle mondiale, dont 98% sont situés dans le bassin méditerranéen avec plus de 2,5 millions de tonnes d'huile d'olive sont produites annuellement (Sesli & Yegenoglu, 2009). Le patrimoine oléicole national compte actuellement une superficie totale d'un million Ha d'oliviers et une production moyenne de 1 500 000 t d'olives et 160 000 tonnes d'huile (Ministère d'agriculture du Maroc, rapport 2013) soit 6% de la production mondiale d'huile. Le secteur de l'industrie oléicole national est l'une des branches les plus dynamiques de notre tissu économique, la capacité de transformation des olives n'a pas cessé d'augmenter ces dernières années en raison d'une part, de la modernisation et la restructuration des unités déjà installées et d'autre part, de la création de nouvelles unités notamment dans les régions de production d'olives, dont la région de Tadla-Azilal en est une. Cette région assure l'approvisionnement de 15% de la production nationale (Office Régionale de la Mise en Valeur de Tadla). Cependant, l'industrie de l'huile d'olive génère de grandes quantités de déchets, les grignons (Figure 1A) et les margines (Figure 1B). En étant jetés dans la nature, ces déchets sont très nocifs et présentent un problème environnemental majeur dans les pays producteurs d'huile d'olive comme le Maroc.



Figure 1: Les sous produits de l'huile d'olive. A: les grignons, B: les margines

Table 2: Phenolic compounds identified by HPLC-MS analysis in Moroccan olive cake extracts originate from different areas of Tadla-Azilal region.**(A).** Beni-Mellal's OCE

Comp. no.	RT (min) ^a	Compounds	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ (m/z) ^b	Main fragments by ESI-MS	References
1	6.22	Oleuropein derivatives	309/307	185/183, 155/153	(22, 7)
3	6.22	Unknown	229/227	213/211, 187/185	
2	6.38	Hydroxytyrosol	155/153		(13, 22, 4, 3, 7, 25, 2)
4	7.03	Dihydroxymandelic acid	185/183		(4)
6	7.03	Hydroxytyrosol glucoside	317/315	137/135	(4, 7, 24)
5	7.26	Vanillic acid	169/167		(22, 4, 17, 7, 24, 1, 2, 29)
7	11,5	Unknown	423/421	391/389, 239/237	(24)
8	11.5	Sinapic acid	225/223		(17,1)
9	22.32	3,4-DHPEA-EDA	321/319	185/183, 167/165, 141/139	(22, 7)
10	22.32	Tyrosol	139/137		(13, 22, 17, 3, 23, 26, 1, 2)
11	22.32	3,4,5 trimethoxybenzoic acid	213/211		(30)
12	28.29	Elenolic acid	243/241	225/223, 197/195, 179/177	(22, 4, 3, 7, 1, 2)
13	28.29	Luteolin	287/285	153/151	(13, 22, 4, 3, 24, 1, 2)
14	28.29	Apigenin	271/269		(13, 22, 17, 3, 1, 2)
15	29.18	Oleuropein aglycone (3, 4-DHPEA-EA)	379/377	303/301, 243/241, 225/223	(22, 3, 7, 23, 2)
16	42.59	Ligstroside derivatives	337/335	217/215, 155/153	(22, 23)
17	48.77	Unknown	790/788	773/771	
18	57.92	Ligstroside	525/523	395/393	(13, 22, 4, 17, 23)
19	57.92	Oleuropein	541/539	227/225, 303/301	(13, 22, 4, 7, 24, 27, 28, 1, 2)
20	62.78	Ligstroside derivatives	293/291		(23)

Table 2 (continued)**(B).** Azilal's OCE

Comp. no.	RT (min) ^a	Compounds	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ (m/z) ^b	Main fragments by ESI-MS	References
1	5.37	Oleuropein	541/539	241/139	(13, 22, 4, 7, 24, 27, 28, 1, 2)
2	7.56	Vanillic acid	169/167		(22, 4, 17)
3	7.56	Unknown	229/227	213/211, 185/183	
4	9.51	Dihydroxymandelic acid	185/183		(4)
5	9.51	Oleuropein derivatives	369/367	225/223, 141/139	(7, 22)
6	25.65	Apigenin	269/267		(13, 22, 17, 3, 2)
7	25.65	Ligstroside derivatives	395/393	271/269	(23)
8	27.76	Luteolin-7-glucoside	449/447	287/285	(22, 4, 17, 3, 24, 2)
9	27.76	Elenolic acid	243/241	225/223, 167/165, 141/139	(22, 4, 3, 7, 1, 2)
10	29.62	Oleuropein aglycone (3, 4-DHPEA-EA)	379/377	243/241, 225/223, 185/183	(22, 3, 7, 2)
11	29.62	Luteolin	287/285		(13, 22, 4, 17, 23, 24)
12	31.89	Ligstroside	525/523	243/241, 139/137	(13, 22, 4, 17)
13	31.89	Quercetin	303/301		(13, 17, 1)
14	32.62	Unknown	703/701	540/538	(24)
15	42.06	Ligstroside derivatives	337/335		(22, 24)
16	42.06	Nüzhenide	685/683		(2)
17	45.48	Unknown	790/788	773/771, 755/753, 737/735	
18	50.77	Naringenin	273/271		(29)
19	57.90	Verbascoside derivatives	463/461	299/297	(22, 7, 24)
20	57.90	Oleoside	391/389		(13, 4, 17, 24)
21	64.96	Unknown	730/728	713/711, 695/693	
22	69.20	Unknown	559/557	539/537, 379/377	(24)

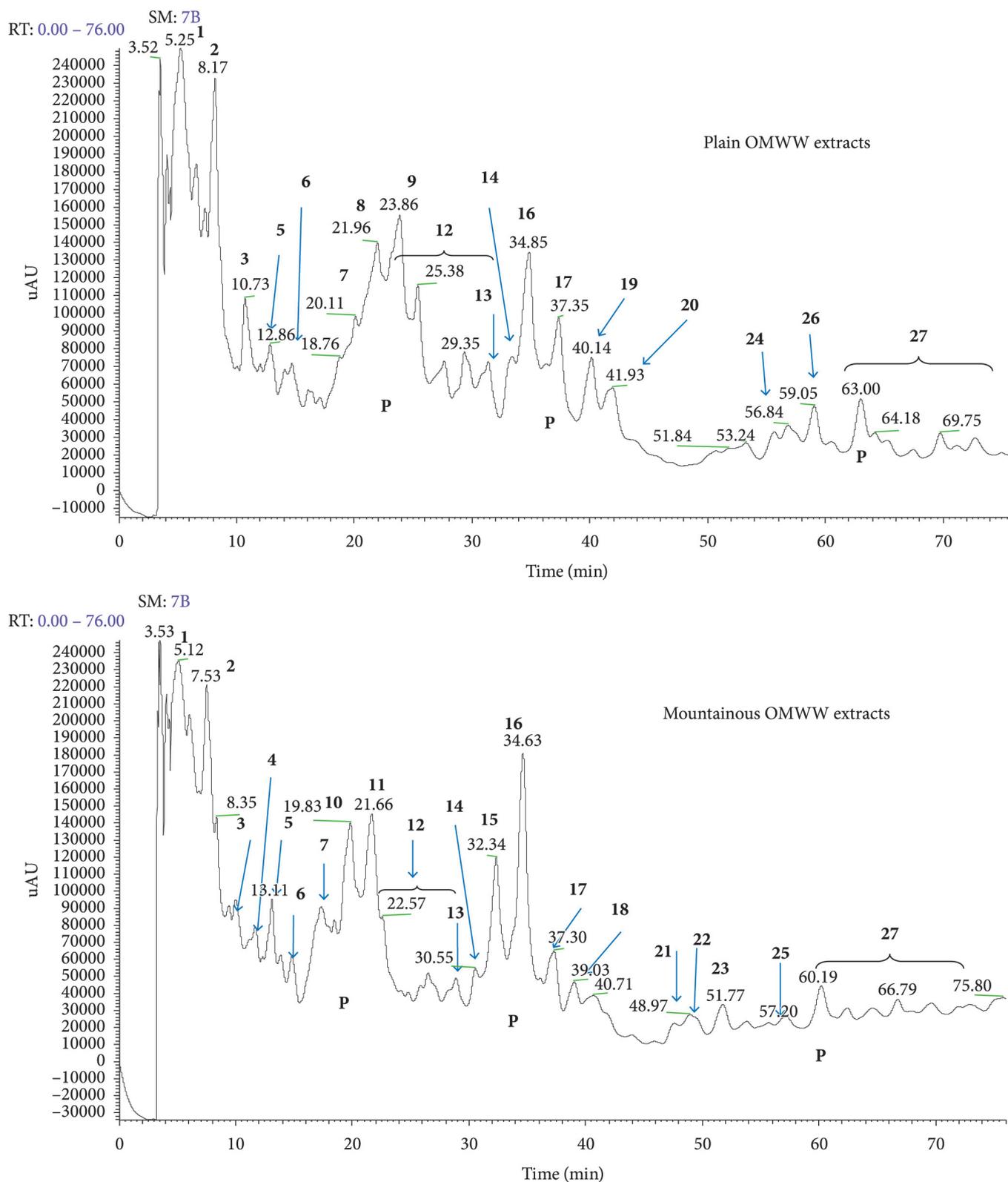


Figure 2. Representative HPLC chromatogram of OMWW phenolic extracts. Peaks identities: (1) Hydroxytyrosol glucoside, (2) Hydroxytyrosol, (3) Tyrosol, (4) Vanilic acid, (5) Sinapic acid, (6) Syringic acid, (7) Caffeic acid, (8) *p*-coumaric acid, (9) Dihydroxymaleic acid, (10) Vanillin, (11) 3,4,5 Trimethoxybenzoic acid, (12) Secoiridoids derivatives, (13) Verbascoside, (14) Rutin, (15) Luteolin-7-rutinoside, (16) Luteolin-7-glucoside, (17) Luteolin, (18) Apigenin, (19) Nüzhenide, (20) Quercetin, (21) Apigenin-7-rutinoside, (22) Apigenin-7-glucoside, (23) Oleuropein, (24) Oleuropein aglycon, (25) Ligstroside, (26) Ligstroside aglycon, (27) Secoiridoids derivatives, (P) polymeric substances.

I.1. Procédés d'extraction d'huile d'olive et régénération des margines et des grignons

L'extraction de l'huile d'olive peut être réalisée soit par le système discontinu (pressage) (Figure 2) ou continu (centrifugation) dans les unités de trituration traditionnelles, modernes ou semi modernes. L'eau est utilisée dans certaines de ces étapes pour faire sortir la majeure partie de l'huile du fruit d'olive. Une fois les olives sont broyées, la pâte obtenue est mélangée et malaxée pour augmenter le pourcentage de disponibilité de l'huile et aider les petites gouttelettes d'huile à coalescence et à s'agglomérer, ce qui facilite la séparation des phases huileuse et aqueuse. Après broyage, la pâte malaxée va ensuite être pressée ou centrifugée horizontalement selon le processus utilisé afin de séparer les phases solides et liquides. La phase solide contient les restes des noyaux ainsi que la peau et la pulpe des olives dépourvue de son huile. Cette phase solide à la sortie de la presse s'appelle «**grignons**» (Figure 3) et constitue l'un des deux coproduits de la fabrication de l'huile d'olive. La phase liquide est un mélange des eaux de végétation et d'huile qu'il faut séparer en fin du procédé d'extraction. Cela se fait soit par simple décantation gravitationnelle, soit par centrifugation (Figure 4). Dans les deux cas, la phase aqueuse (effluents liquides de couleur noir) aussi appelée «**margines**» constitue le second sous-produit de la fabrication de l'huile d'olive.

Le processus discontinu d'extraction par presse (Fig. 2) est la méthode la plus ancienne pour l'extraction d'huile d'olive. C'est ce système qui est responsable de la régénération de volumes considérables des margines, ces volumes sont pratiquement égaux à la quantité d'olives triturées étant donné les apports élevés en eau chaude (80-120 litres/100 kg d'olives) (Albuquerque et al. 2004). Toutefois, ce système, et en dépit de sa forte consommation d'eau et d'énergie, est encore la méthode la plus largement utilisée en particulier dans les pays qui produisent de grandes quantités d'olives pendant de courte durée (Benitez et al. 1997). Cependant, le système continu à deux phases est plus respectueux de l'environnement, parce qu'il ne nécessite pas d'ajout d'eau pour la dilution de la pâte ce qui minimise la production des effluents liquides (margines). Ce système est fortement recommandé car en plus de son aspect écologique, il procure une huile de bonne qualité (Chimi, 2006). Les variations de la quantité des grignons et des margines et de leur caractéristiques sont souvent liées au lavage préalable ou non des olives, ou à l'humidification des pâtes durant le pressage.

Table 2 (continued)
(C). Awrir's OCE

Comp. no.	RT (min) ^a	Compounds	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ (m/z) ^b	Main fragments by ESI-MS	References
1	3.51	Unknown	409/407	391/389	(24)
2	4.11	Luteolin-7-glucoside	449/447	287/285, 258/256	(22, 17, 3, 24, 2)
3	7.16	Vanillic acid	169/167	154/152	(22, 4, 17, 7, 24, 1, 2, 29)
4	7.16	Vanillin	153/151		(22, 3, 2)
5	7.89	Oleoside	391/389	247/245, 211/209	(13, 4, 17, 24)
6	7.89	Unknown	282/280	267/265	
7	10.06	Unknown	423/421	391/389, 197/195	(24)
8	13.24	Hydroxytyrosol	155/153		(13, 22, 4, 3, 7, 25, 2)
9	13.24	Unknown	229/227	211/209	
10	15.25	Oleuropein aglycone (3, 4-DHPEA-EA)	379/377	197/195	(22, 3, 7, 23, 2)
11	15.25	Ligstroside derivatives	395/393	139/137	(23)
12	24.69	Elenolic acid	243/241	225/223, 181/179, 141/139	(22, 4, 3, 7, 1, 2)
13	24.69	Hydroxytyrosol acetate (3, 4-DHPEA-AC)	197/195		(22, 4, 3)
14	25.50	Luteolin	287/285	153/151	(13, 22, 4, 17, 23, 24)
15	25.50	Rutin	611/609		(13, 22, 17, 3, 11, 24, 1)
16	26.64	Ligstroside	525/523	139/137	(13, 22, 4, 17)
17	29.40	Tyrosol	139/137		(13, 22, 4, 3, 23, 26, 1, 2)
18	29.40	Caffeic acid	181/179	135/133, 117/115	(13, 22, 17, 3, 11, 27, 2, 29)
19	37.22	Verbascoside derivatives	571/569	299/297	(7)
20	41.23	Oleuropein	541/539	151/149	(13, 22, 4, 7, 24, 27, 28, 1, 2)
21	41.23	Methoxyluteolin	301/299		(23)
22	60.49	Pinoresinol	359/357		(22, 3, 1, 2)
23	60.49	Ligstroside derivatives	293/291	141/139	(23)
24	62.94	Apigenin	271/269	153/151	(13, 22, 17, 3, 2)
25	64.31	Unknown	730/728	713/711, 695/693	

Table 2 (continued)
(D). Krazza's OCE

Comp. no.	RT (min) ^a	Compounds	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ (m/z) ^b	Main fragments by ESI-MS	References
1	6.04	ME. 3,4- DHPEA-EA	409/407	379/377, 277/275	(22, 7, 23)
2	7.18	Unknown	229/227	213/211	
3	8.83	Apigenin-7-rutinoside	579/577	433/431, 379/268	(22, 17, 1)
4	12.93	11-Methyl-oleoside	405/403		(24)
5	22.26	Oleuropein derivatives	309/307	275/273, 231/229	(22, 7, 23)
6	28.67	Ligstroside aglycone (p-DHPA-EA)	363/361	243/241, 259/257, 141/139	(22, 3, 23, 2)
7	28.67	Luteolin	287/285		(13, 22, 4, 17, 23, 24)
8	32.74	3,4,5 trimethoxybenzoic acid	213/211		(30)
9	40.55	Unknown	537/535	493/491	(24)
10	40.55	Oleuropein	541/539	243/241, 185/183, 141/139	(13, 22, 4, 7, 24, 27, 28, 1, 2)
11	41.77	Elenolic acid	243/241	225/223, 167/165, 141/139	(22, 4, 3, 7, 1, 2)
12	41.77	Methoxyluteolin	301/299	287/385	(23)
13	42.37	Dihydroxymandelic acid	185/183		(4)
14	47.54	Unknown	790/788	773/771, 755/753, 737/735	
15	58.48	Ligstroside derivatives	395/393	259/257, 139/137	(23)
16	58.71	Unknown	423/421	243/241, 167/165	(24)
17	58.71	Caffeic acid	181/179		(13, 22, 17, 3, 11, 27, 2, 29)

^a Retention time (min). ^b Mass charge value

Samples were collected from different areas of Tadla-Azilal region and phenolic compounds were extracted and analyzed using HPLC-ESI-MS technique as described in materials and methods

Table 2. Phenolic composition of Moroccan OMWW extracts analysed by HPLC-MS^a.

Compounds	[M-H] ⁻ (m/z) ^b	Plain areas		Mountainous areas		References
		Béni Mellal	Krazza	Azilal	Afourar	
Hydroxytyrosol	153	9.38	15.19	9.27	15.04	(Obied et al., 2005; Lesage-Meessen et al., 2001; De Marco et al., 2007; Allouche et al., 2004; Ramos et al., 2013; Suarez et al., 2009)
Tyrosol	137	3.92	4.89	8.73	6.37	(Lesage-Meessen et al., 2001; De Marco et al., 2007; Allouche et al., 2004; Romero et al., 2002)
Total phenolic alcohols		13.3	20.08	18	21.41	
Vanillic acid	167	nd	nd	4.25	nd	(Ramos et al., 2013; Cardoso et al., 2005; Suarez et al., 2009; Aranda et al., 2007; Dermeche et al., 2013; Romero et al., 2002)
Caffeic acid	179	nd	3.64	nd	4.49	(Lesage-Meessen et al., 2001; De Marco et al., 2007; Allouche et al., 2004; Juarez et al., 2008; Suarez et al., 2009; Dermeche et al., 2013)
<i>p</i> -coumaric acid	163	nd	9.98	nd	nd	(Lesage-Meessen et al., 2001; Juarez et al., 2008; Dermeche et al., 2013)
Sinapic acid	223	2.69	2.94	nd	4.13	(Obied et al., 2005; Dermeche et al., 2013)
Syringic acid	197	1.07	nd	3.5	nd	(Obied et al., 2005; Juarez et al., 2008; Dermeche et al., 2013)
Dihydroxymandelic acid	183	nd	nd	nd	3.4	(Aranda et al., 2007)
3,4,5 trimethoxybenzoic acid	211	nd	0.4	4.37	nd	(Juarez et al., 2008)
Total phenolic acids		3.76	16.96	7.87	12.02	
Oleuropein	539	nd	nd	nd	2	(Suarez et al., 2009; Aranda et al., 2007; Dermeche et al., 2013; Romero et al., 2002; Ramos et al., 2013; Visioli et al., 2002)
3,4-DHPEA-EA	377	nd	1.04	nd	nd	(Ramos et al., 2013; Cardoso et al., 2005; Suarez et al., 2009)
3,4-DHPEA-EDA	319	1.01	nd	nd	nd	(Ramos et al., 2013; Suarez et al., 2009; De Marco et al., 2007)
ME 3,4 DHPEA-EA	409	1.59	nd	nd	2.66	(Suarez et al., 2009)
Oleuropein derivative	333	nd	nd	nd	4.44	(Ramos et al., 2013; De La Torre-Carbot et al., 2005; Suarez et al., 2009)
Oleuropein derivative	365	nd	nd	nd	4.05	(Suarez et al., 2009)
Ligstroside	523	nd	nd	0.89	1.26	(De La Torre-Carbot et al., 2005; Suarez et al., 2009; Aranda et al., 2007; Dermeche et al., 2013; Obied et al., 2007)
<i>p</i> -DHPEA-EA	361	3.41	nd	nd	nd	(De Marco et al., 2007; Ramos et al., 2013; De La Torre-Carbot et al., 2005; Suarez et al., 2009)
Ligstroside derivative	335	3.19	nd	nd	5.23	(De La Torre-Carbot et al., 2005; Suarez et al., 2009)
Ligstroside derivative	393	nd	0.71	nd	nd	(De La Torre-Carbot et al., 2005)
Elenolic acid	241	nd	nd	5.7	nd	(Suarez et al., 2009; Aranda et al., 2007)
Elenolic acid glucoside	405	nd	6.37	nd	nd	(Obied et al., 2005)
Hydroxytyrosol glucoside	315	11.47	4.4	13.11	7.01	(Ramos et al., 2013; Cardoso et al., 2005; Aranda et al., 2007)
Verbascoside	623	1.81	1.07	0.31	nd	(De Marco et al., 2007; Cardoso et al., 2005; Aranda et al., 2007; Dermeche et al., 2013; Romero et al., 2002; Obied et al., 2007)
Total Secoiridoids		22.48	13.47	20.01	26.65	
Apigenin	269	nd	nd	nd	0.38	(Dermeche et al., 2013; Obied et al., 2005; Suarez et al., 2009)
Apigenin-7-glucoside	477	nd	3.64	nd	1.49	(Dermeche et al., 2013; Obied et al., 2005; Suarez et al., 2009; Obied et al., 2007)

^aThe Results are expressed as percentage of total phenols in OMMW extracts. ^bMass charge value. nd = not detected.

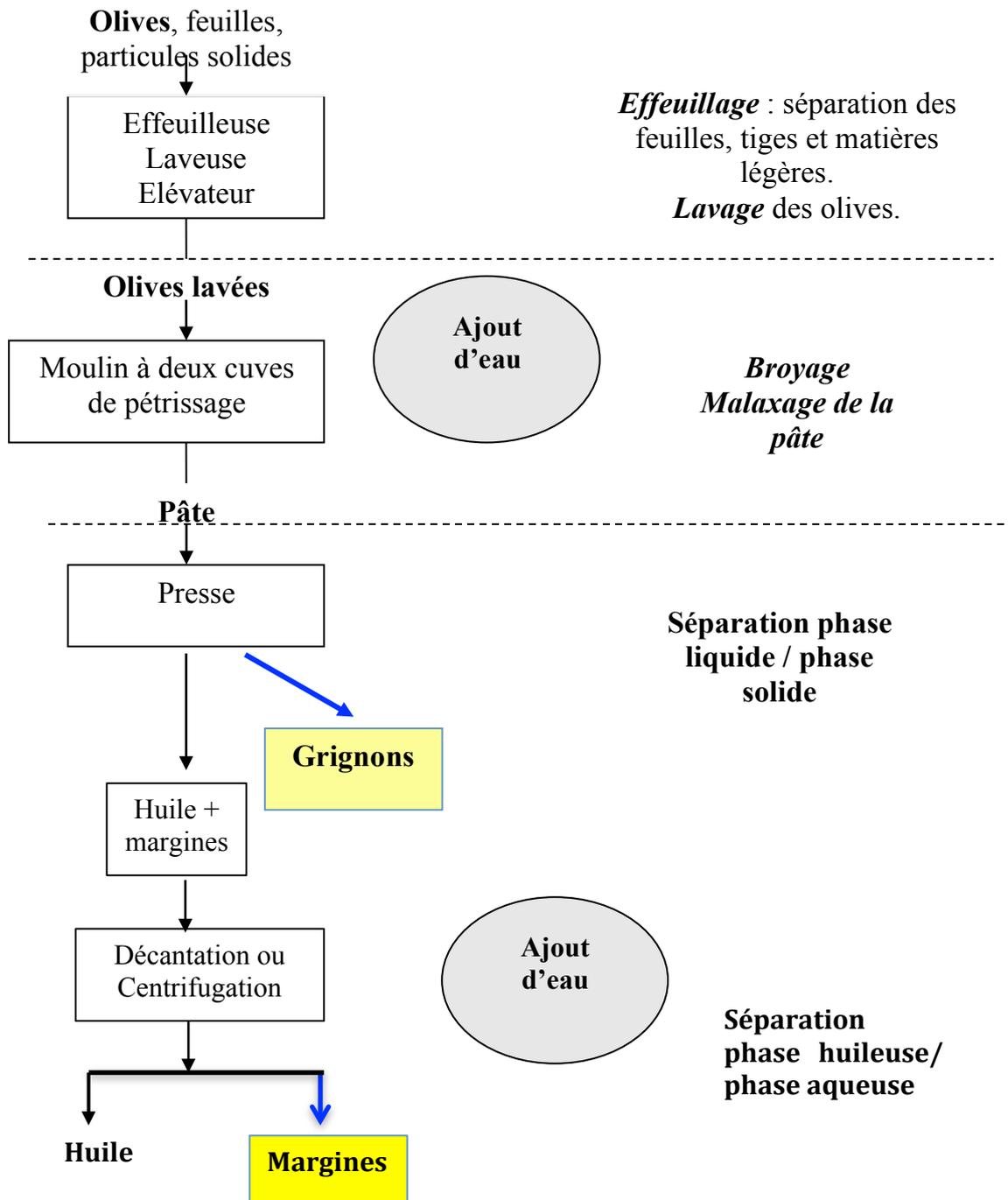
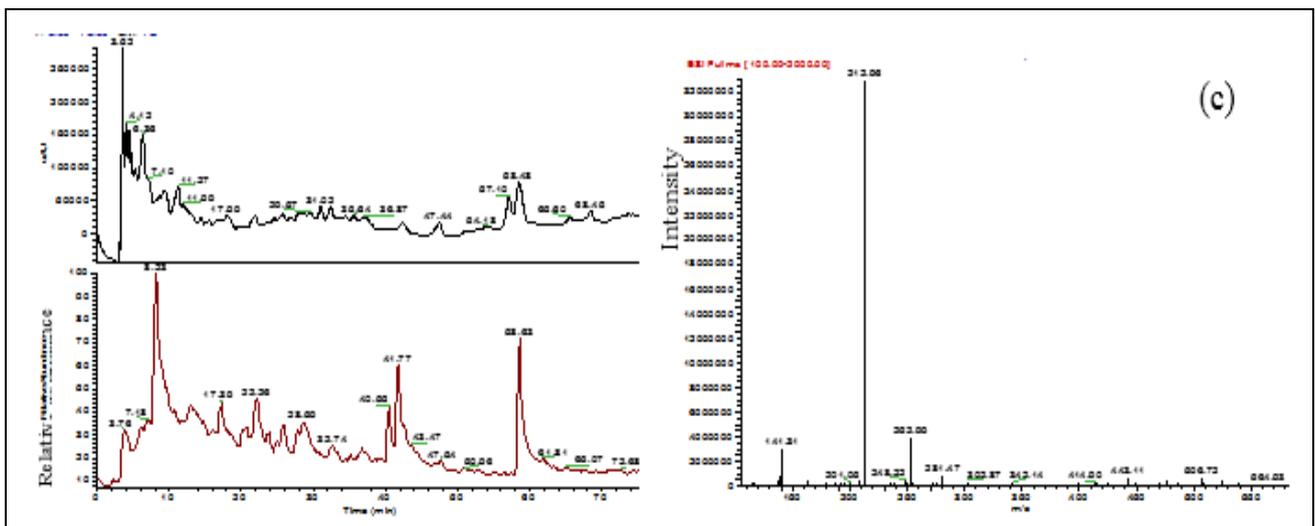
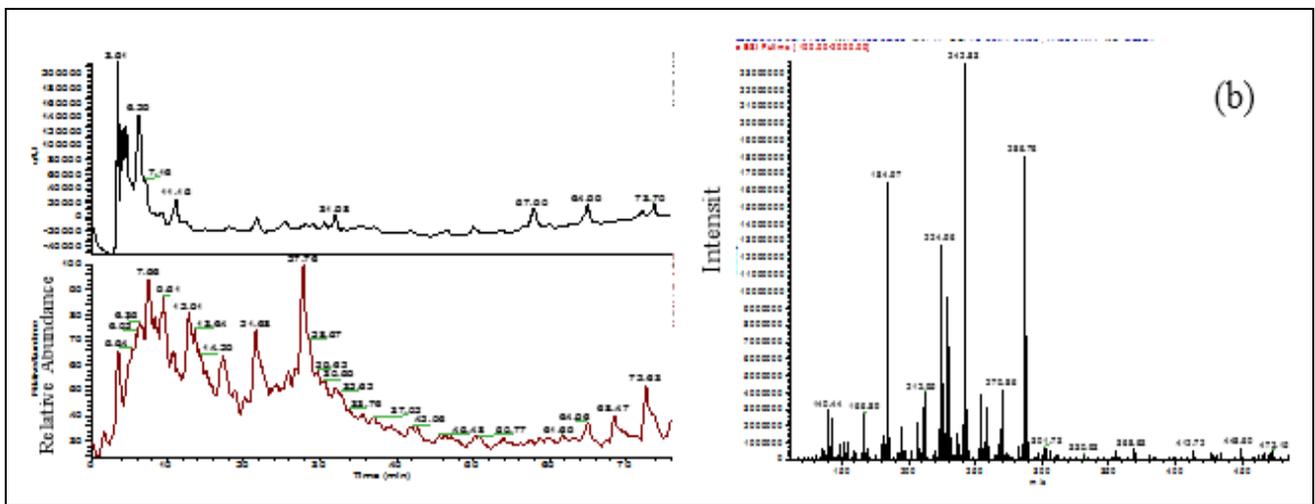
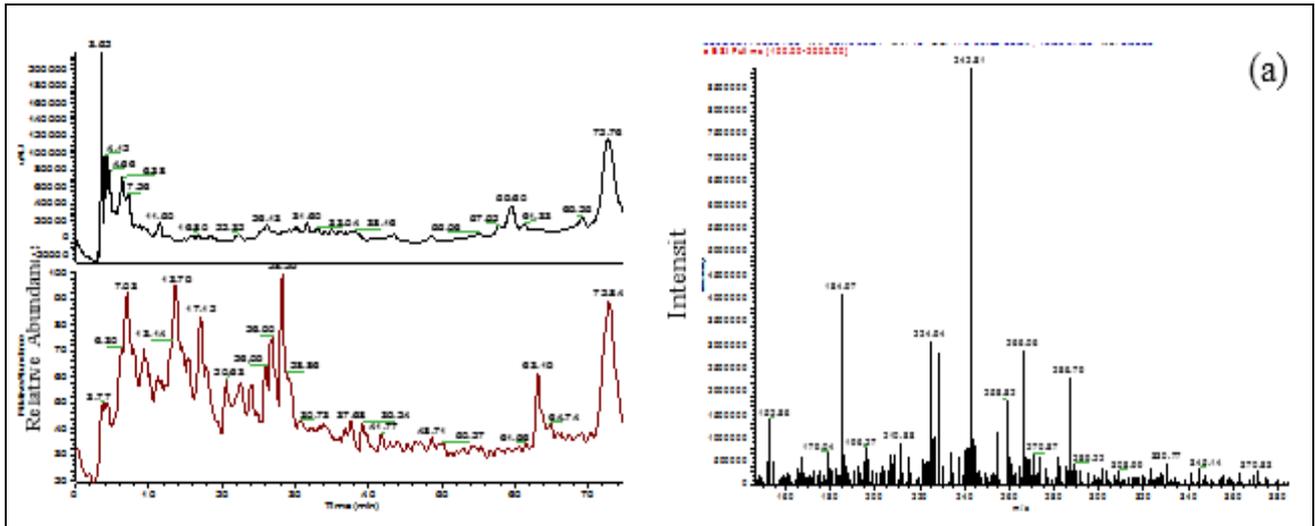


Figure 2 : Schéma du procédé d'extraction d'huile d'olive et la régénération des grignons et des margines selon le modèle discontinu d'extraction par presse (Dermeche et al. 2013).



Compounds	[M-H] ⁻ (m/z) ^b	Plain areas		Mountainous areas		References
		Béni Mellal	Krazza	Azilal	Afourar	
Apigenin-7-rutinoside	577	nd	nd	0.82	0.88	(Obied et al., 2005; Dermeche et al., 2013)
Luteolin	285	0.86	nd	5.69	nd	(Obied et al., 2005; De Marco et al., 2007; De La Torre-Carbot et al., 2005; Suarez et al., 2009; Dermeche et al., 2013)
Luteolin-7-glucoside	447	4.76	nd	6.25	nd	(De Marco et al., 2007; Cardoso et al., 2005; Aranda et al., 2007; Dermeche et al., 2013; Romero et al., 2002)
Luteolin-7-rutinoside	593	nd	nd	3.35	0.9	(Obied et al., 2005; Cardoso et al., 2005; Dermeche et al., 2013)
Naringenin	271	nd	0.23	nd	1.77	(Mantzavinos & Kalogerakis, 2005)
Nüzhenide	685	1.89	nd	nd	1.67	(Obied et al., 2005; Silva et al., 2006)
Quercetin	301	nd	2.06	nd	nd	(Obied et al., 2007; Dermeche et al., 2013)
Rutin	609	2.9	nd	0.44	nd	(Cardoso et al., 2005; Suarez et al., 2009; Dermeche et al., 2013; Romero et al., 2002)
Vanillin	151	nd	nd	2.32	nd	(Lesage-Meessen et al., 2001; Cardoso et al., 2005; Suarez et al., 2009; Dermeche et al., 2013)
Total flavonoids		10.41	5.93	18.87	7.09	
Pinoresinol	357	nd	0.05	0.96	0.93	(Obied et al., 2005; Suarez et al., 2009)
1 Acetoxypinoresinol	415	2.32	nd	2.3	0.71	(Obied et al., 2005; Suarez et al., 2009)
Total lignans		2.32	0.05	3.26	1.64	
Total phenolic content		52.59	58.98	68.01	68.81	

^aThe Results are expressed as percentage of total phenols in OMMW extracts. ^bMass charge value. nd = not detected.

Phenolic acids: Vanillic acid, sinapic acid, syringic acid, caffeic acid, and *p*-coumaric acid, (peaks: 4, 5, 6, 7 and 8, respectively) that have been frequently reported in OMWW could be found in most of the investigated extracts. Vanillic acid (m/z167) and caffeic acid (m/z 179) were found with an important content in the extracts from mountainous areas (4.25 and 8.52 % of total phenols). *p*-coumaric acid (m/z 163) was detected only in the extracts from plain areas, and its amount was significantly higher (9.98% of total phenols). Furthermore, new phenolic acids, namely dihydroxymandelic acid (m/z 183), tetrahydroxymandelic acid (m/z 215), and 3,4,5 trimethoxybenzoic acid, characterized by Aranda et al. (2007) and Capasso et al. (1992), were also identified.

Flavonoids: a fragment ion with m/z 285, diagnostic of luteolin (peak 17), and its derivative; luteolin-7-glucoside (peak 16) with m/z 447 (Ryan et al., 2002) were identified in both mountainous and plain areas extracts as the major flavones (5.69 % and 6.25 %, respectively). According to the molecular ion at m/z 593, luteolin-7-rutinoside could be proposed only for mountainous area (3.35 % of total polyphenols). According to the literature data, the flavone luteolin-7-rutinoside was previously detected in olive leaves and olive by-products, and its ESI-MS data were similar to those of the peak 15 eluted before luteolin-7-glucoside (Dermeche et al., 2013; Ryan et al., 2002). The comparison of the ESI-MS data with the literature data allowed the identification of ion at m/z 609 attributed to rutin molecule. This compound has previously been detected in OMWW and olive pulp (Dermeche et al., 2013). Another flavanone identified at the ions at m/z 271 (0.23; 1.77 % of total

phenols) could be attributed to the naringenin. Nüzhenide, a compound identified by Silva et al. (2006) in the olive seed, was found at the ion m/z 685 at low quantities (below 2% of the total polyphenols). Both compounds exhibited a good antioxidant potential (Silva et al., 2006; McDonald et al., 2001). The MS analyses of mountainous extracts showed molecular ions at m/z 269, 431 and 577 suggesting the presence, respectively, of apigenin (0.38 % of the total phenols content) and its two derivatives: apigenin-7-glucoside and apigenin-7-rutinoside detected at variable amounts (Dermeche et al., 2013; Obied et al., 2005; Suarez et al., 2009).

Secoiridoids: Oleuropein, an ester of elenolic acid and hydroxytyrosol, identified as a major phenolic compound of OMWW (Dermeche et al., 2013; Visioli et al., 2002; Romero et al., 2002), was identified by its molecular ion at m/z 539 and by the presence of the hydroxytyrosol (m/z 153) ion fragment, only in the extracts derived from mountainous areas whereas we failed to identify this compound in the plain areas extracts. Oleuropein in these extracts had probably degraded into elenolic acid and hydroxytyrosol by an esterase during the mechanical olive oil extraction process (Visioli et al., 2002). This was probably the case with oleuropein in the studied samples, since abundant amounts in hydroxytyrosol were mainly recovered in olive oil residues. Another secoiridoid was identified at m/z 523, may correspond to the ligstroside produced by the loss of the glucose molecule (m/z 162) of nüzhenide and its characteristic fragment ion at m/z 335 (Suarez et al., 2009; De La Torre-Carbot et al., 2005). This compound was characterized by De Marco et al. (2007) as a well antioxidant phenolic compound in the Italian



Figure 3 : Grignons secs à la sortie de la presse.



Figure 4 : Centrifugeuse. A droite sortie de l'huile d'olive, à gauche sortie des margines

I.2. Composition chimiques des grignons et des margines

La caractérisation physico-chimique des margines et des grignons est généralement tributaire des techniques et des systèmes d'extraction de l'huile d'olive, elle diffère d'une étude à l'autre et d'un pays à l'autre (Blika et al. 2009). En effet, leur composition chimique varie à la fois qualitativement et quantitativement en fonction de plusieurs autres paramètres à savoir la variété d'olive, les conditions climatiques, les pratiques agronomiques, le degré de maturité des olives et la durée de stockage des olives avant trituration (Fiorentino et al. 2003 ; Dermeche et al. 2013, Allouche et al. 2004; Piperidou et al. 2000). Les quantités des grignons d'olive et des margines dépendent étroitement du procédé de trituration appliqué. En effet, les grignons et les margines produits par le système à deux phases ont des caractéristiques différentes par rapport aux grignons régénérés par le système de presse traditionnelle et les systèmes triphasés (Tableau 1).

Tableau 1 : Bilan matière en grignons et margines obtenus par différents procédés de trituration des olives, 100 kg d'olives donnent en moyenne 20 kg d'huile d'olive.

Procédé de trituration	Grignons	Margines	Références
Triphasique par presse	40 kg avec 22-25 % d'humidité	40 kg	Albuquerque et al. 2004; Alba-Mendoza et al. 1990
Triphasique avec centrifugation	55 kg avec 40-45 % d'humidité	> 100 kg	Albuquerque et al. 2004; Alba-Mendoza et al. 1990
Biphasique	70 kg 60-70% d'humidité	10 kg	DiGiovacchino, 1988; Bing et al. 1994

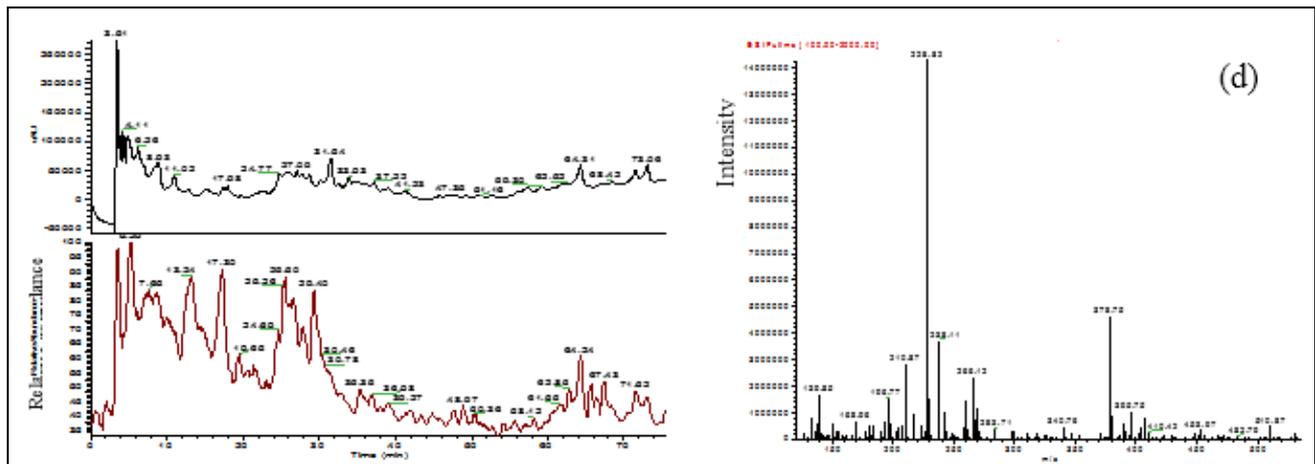


Fig 1: Representative HPLC/ESI-MS analysis: Chromatograms/TIC MS scan and full scan MS) of OCE derived from different areas: (a) Beni Mellal's OCE; (b) Krazza's OCE; (c) Azilal's OCE; (d) Awrir's OCE. Olive cake samples were collected from Tadla-Azilal region; the HPLC-ESI-MS was performed for each OCE as described in materials and methods.

Furthermore, important levels of molecules with molecular mass up to 1000 Da corresponding to dimeric or polymeric phenols (800- 2000 Da) were detected in all the studied samples (figure 2). These compounds could be attributed to the polysaccharides, tannins and catechins

[17, 31]. These results are in agreement with those reporting that olive mill wastes, in addition to the phenols (simple, acids and glycosilated phenols), contain carbohydrates and polysaccharides substantially composed of polymerin [4].

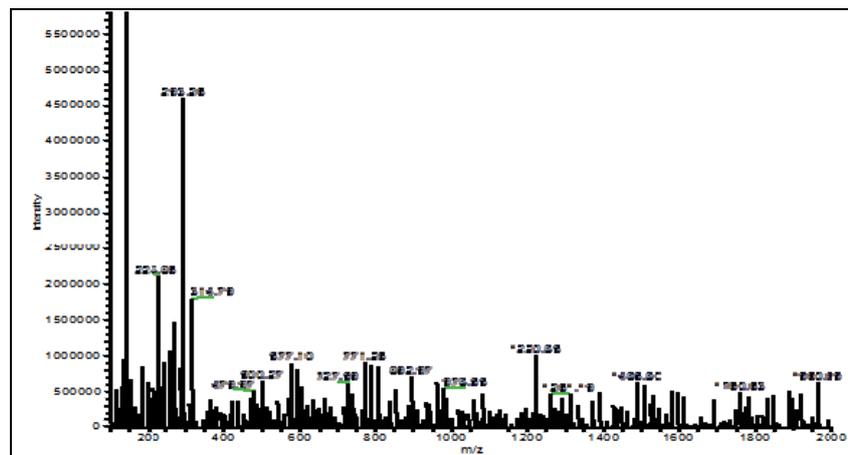


Fig 2: Representative MS spectrum of OCE with $m/z > 1000$ Da

However, the observed difference on phenolic composition OCE may be ascribed to any or all of agricultural, varietal and seasonal practices in addition to the olive oil extraction technique and the fruit variety and maturity stage [13, 18]. Excluding fruit variety and maturity and olive oil extraction system in the present study, the remaining factors may affect the phenolic profile in olive fruit, leading to an effect on the phenolic profile in OMW [1]. The molecular analysis of Moroccan OCE by modern hyphenated techniques, HPLC-ESI-MS, is reported for the first time. A detailed characterization of individual compounds was not attempted and only the major compounds were identified to assist understanding

of the relation between the phenolic composition and the observed cytotoxic activity. The careful determination of the molecular composition requires further chromatographic and spectral studies.

3.3 *In vitro* cytotoxic effect of OCE

The *In vitro* cytotoxic effect of the OCE was evaluated using MTT assay (Figure 3). The phenolic extracts of olive cake present an important dose-dependent cytotoxic effect starting at small concentrations (less than 0.05 $\mu\text{g/mL}$). Indeed, at high concentration (50 $\mu\text{g/mL}$), the percentage of cell lysis was about 60%. The IC_{50} ranged from 20 to 40 $\mu\text{g/mL}$.

olive oil mill wastewater. ESI-MS data of both mountainous and plain OMWW extracts indicated a molecular ion at m/z 623 (peak 13) and its characteristic fragments, which is in accordance with the fragmentation of verbascoside. These results were corroborated with the fragmentation profile of verbascoside described by Ryan et al. (2002). Peak 19 showed a deprotonated molecule at m/z 685 that could be attributed to nüzhenide previously identified in olive seed (Silva et al., 2006).

Secoiridoids derivatives: The spectra generated from plain OMWW extracts gave the deprotonated molecule at m/z 377 (peak 24) corresponding to the oleuropein aglycon (3,4-DHPEA-EA) (De Marco et al., 2007; Suarez et al., 2009). Another molecule identified as an oleuropein derivative shown by its deprotonated molecule $[M-H]^-$ at m/z 319 may be attributed to oleuropein aglycone isomer in aldehyde form (3,4-DHPEA-EDA) previously identified by Servili et al. (1999) in vegetation waters. The ion at m/z 241, corresponding to the elenolic acid fragment derivative of oleuropein, was identified only in mountainous areas with an important content (5.7 % of total phenols). Moreover, the spectra of all the extracts showed a product ion at m/z 315 (peak 1) with a higher content ranging from 4 to 13%, which could be attributed to hydroxytyrosol glucoside produced by the loss of a rhamnose unit of the verbascoside molecule (Ramos et al., 2013; Cardoso et al., 2005). More derivatives of ligstroside were detected both in mountainous and plain areas. The most abundant was the ligstroside aglycon at m/z 361 (3.19 % of total phenols) characterized by De La Torre Carbot et al. (2005) and Suarez et al. (2009).

Lignans: The product ion spectra showed an m/z 357 and m/z 415 which can be attributed, to the Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, respectively, were identified in most of the extracts with smaller quantities (below 2.32% of the total polyphenols).

Furthermore, important levels of molecules with molecular mass above 1000 Da (800-2000 Da) corresponding to the polymeric phenols were detected as a very broad peak in the range between 16 and 22 min, 32 and 38 min, and 54 and 70 min, co-eluting with the previously mentioned secoiridoids and flavonoid glycosides. We hypothesize that these compounds are the supposed polymerin and metal polymeric organic compounds that were previously recovered from olive oil mill waste waters and proved to be composed of polysaccharides, melanin, proteins and metals (Aranda et al., 2007; Dermeche et al., 2013; Capasso et al., 2002; Hamdi, 1993).

Nonetheless, in full scan mode several unidentified compounds were observed with a strong m/z whose MS fragmentation spectra indicated various product ions (data not shown).

Moreover, the Moroccan OMWW phenolic fraction represents a complex emulsion containing mainly phenolic compounds as confirmed by Bianco et al. (2003), who identified 20 phenolic compounds in OMWW using HPLC-MS-MS including the classes of hydrophilic phenols as identified in Table 2. As detailed above, its concentration and composition vary from a region to another depending on several parameters. Mountainous areas offered the highest phenolic content compared to plain areas, suggesting the impact of environmental stress factors and the variability of the geographical and the climatic conditions of Tadla-Azilal region. The olive variety and its maturity and the methods used to extract and analyse the phenolic compounds could also explain the variability of phenols in OMWW. Accordingly, the identified phenolic compounds in OMWW as well as their concentration are highly variable from a study to another. Several previous investigations have identified other phenolic compounds in OMWW extracts. As an example, Visioli et al. (2002) reported that oleuropein is a major phenolic compound in OMWW, whereas we failed to identify this compound in plain areas as Allouche et al. (2004) did in Tunisian OMWW. One explanation could be that the OMWW was sampled late in the olive harvest (mature olives), when the oleuropein and ligstroside had already been degraded into hydroxytyrosol, tyrosol and various derivative ions, which explains their high amount quantified in OMWW extracts (De Marco et al., 2007; Capasso et al., 2002; Bianco et al., 2003). Juarez et al. (2008) have identified in Spanish OMWW: ferulic acid, p-coumaric acid, 3,4,5 trimethoxybenzoic acid, and p-hydroxybenzoic acid, as major compounds. Dermeche et al. (2013), have detected other compounds in Algerian OMWW: gallic acid, vanillic acid, cinammic acid, 4-methylcatechol, 4-hydroxybenzoic acid, protococatechuic acid, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. In other studies, Lesage-Messen et al. (2001) and Bouzid et al. (2005) have identified in French and Tunisian OMWW extracts: vanillic acid, ferulic acid and vanillin as major polyphenols. In Italian OMWW, the major polyphenols identified by Capasso et al. (1992) and Casa et al. (2003) were catechol, 4-methylcatechol, 4-hydroxybenzoic acid and trans-sinamic acid.

3.4 Antioxidant activity on ethyl acetate phenolic extracts

Phenolic extracts were tested for their antioxidant activity (Table 3) using the stable free radical DPPH as test (Kumar et al., 2013). Mountainous extracts exhibited the highest antiradical potential with a value 3-fold greater than that of plain extracts. That could be attributed to the highest concentrations of antioxidant phenolic compounds, such as hydroxytyrosol, secoiridoids derivatives and flavonoids, quantified in large quantities of total phenols content. However, hydroxytyrosol proved, among the biophenols identified in olive mill waste, high antioxidant properties (Allouche et al., 2004; Obied et al.,

Table 3. Scavenging effects (IC_{50} μ g/ml) of OMWW extracts on DPPH free radicals.

	Plain area	Mountainous area	Ascorbic acid ^a
IC_{50} (μ g/ml)	30.7 \pm 4.4	11.7 \pm 5.6	3.2 \pm 0.6

Antiradical activity IC_{50} (μ g/ml) was defined as the concentration of extracts necessary to decrease the initial DPPH radical concentration by 50%. Values are expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.) of triplicate analyses. ^aPositive control

I.2.1. Composition chimique des grignons

La cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont les principaux composants des grignons (Vlyssides et al. 1996). Toutefois, les matières grasses et les protéines sont également présentes à des quantités significatives (Rodriguez et al. 2008). Par rapport aux margines, la teneur en matière sèche et en cendres est élevée dans les grignons d'olive (Tableau 2). L'analyse minérale montre la présence de sels minéraux, notamment le potassium et le phosphore. Les concentrations des sels minéraux, solubles dans l'eau, sont plus élevées dans les margines en raison de leur forte teneur en eau.

Les glucides sont essentiellement représentés par les composants pariétaux, en particulier la cellulose et les pectines. Ces derniers jouent un rôle important dans la texture des olives où ils représentent environ 0,6 % du poids de la pulpe fraîche (Galanakis et al. 2010).

I.2.2. Composition chimique des margines

Les margines sont des effluents très acides à haute conductivité et à forte charge saline et organique. Elles sont caractérisées par un pH qui varie entre 4,5 et 6 et une conductivité de l'ordre de 10 mS/cm (Obied et al. 2005) due principalement aux ions potassium, chlorures, calcium et magnésium. Leur couleur noir brunâtre est due à la présence de phénols polymères qui possèdent une structure similaire aux lignines (D'Annibale et al. 2004 ; Assas et al. 2002, Khoufi et al. 2007). En général, les margines contiennent une variété de composés organiques et minéraux, de nature et de concentration très différentes (Tableau 2). Les margines comportent deux fractions organiques: une fraction insoluble qui représente la matière en suspension et colloïdale (Hamdi, 1991) et une fraction soluble dans la phase aqueuse qui contient les sucres, les lipides, les composés azotés, les acides organiques et les composés phénoliques (Dermeche et al. 2013; Obied et al. 2005). Récemment, de nombreux travaux ont montré que les margines sont très riches en sucres simples (Garcia-Castello et al. 2010 ; Fezzni et Ben Cheik, 2009). Les margines contiennent également des quantités significatives de sels minéraux dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates) (Ranalli, 1992 ; Yangui et al. 2009). Les éléments les plus représentatifs sont le potassium, les carbonates, les phosphates, le sodium, et le fer ce qui leur procure une utilisation précieuse en tant qu'engrais (Dermeche et al. 2013).

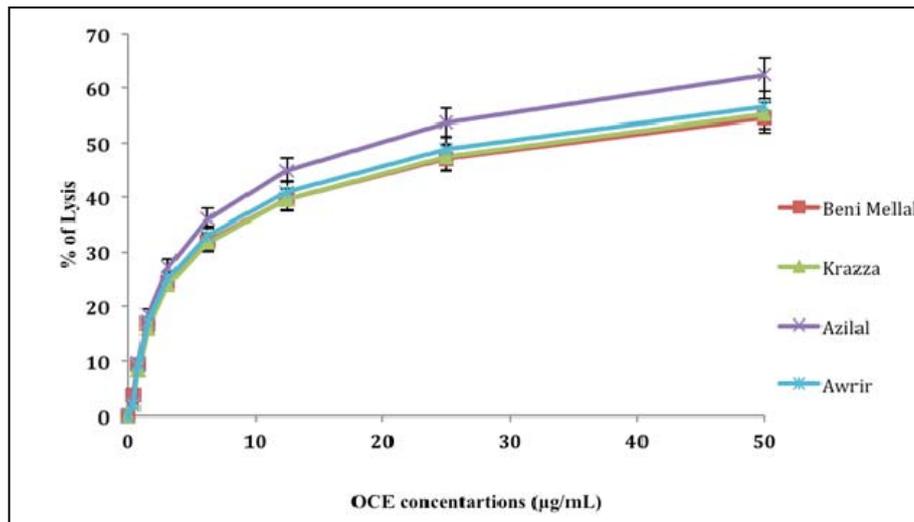
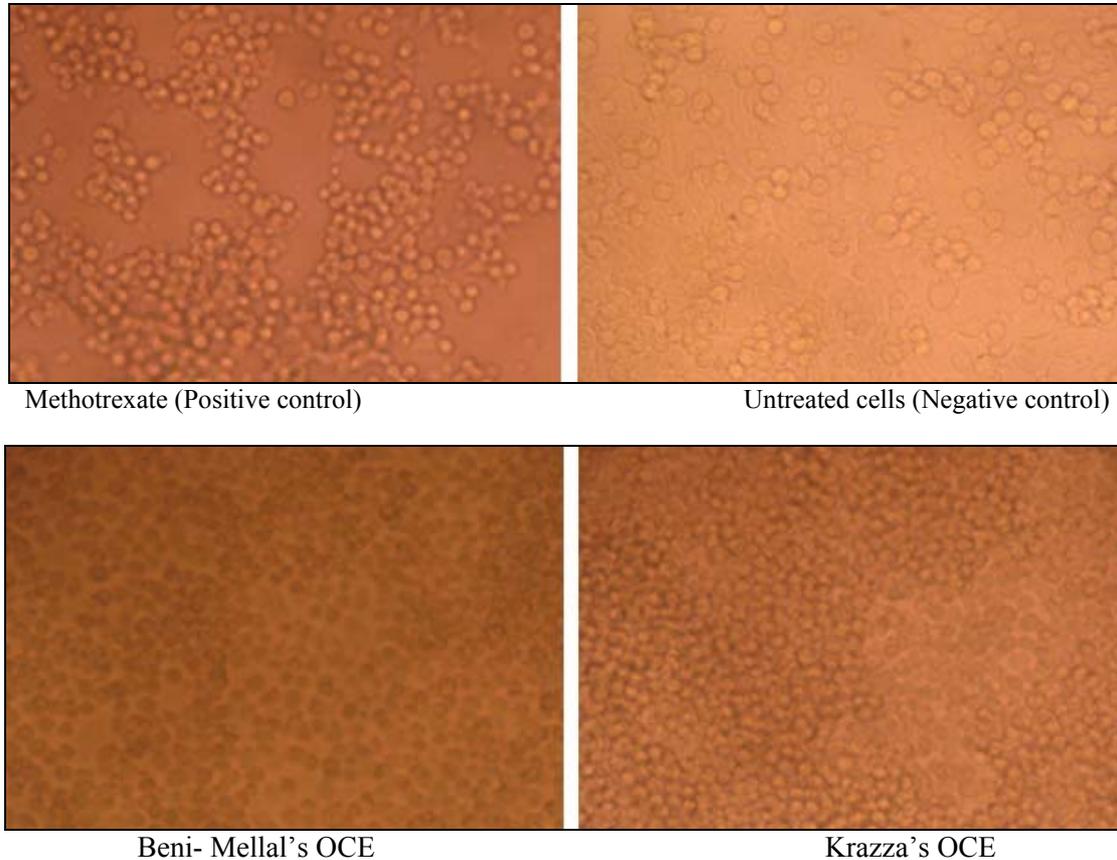


Fig 3: *In vitro* cytotoxic activity of phenolic compounds extracted from olive cake against P815 tumor cell line. The cytotoxic activity of these compounds was evaluated using the MTT test as described in materials and methods. Results are the mean \pm SD of three independent experiments.

Moreover, the highest cytotoxic activity was detected in the mountainous areas of Azilal and Awrir (20 and 28.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively), compared to the plain areas of Beni Mellal and Krazza which indicate the same IC_{50} value (34 $\mu\text{g/mL}$). These differences are statistically significant ($p < 0.05$). Mountainous areas OCE showing the

higher phenolic compounds content, were significantly more cytotoxic than plain areas OCE. On the other hand, significant changes were observed in the morphological aspect and cell density of murine mastocytoma (P815) cells treated with OCE (IC_{50} concentrations) comparatively to control cells (Fig. 4).



2005, 2007, 2008; De Marco et al., 2007; Visioli et al., 2002). Other studies (Suarez et al., 2009; Amro et al., 2002) concluded the most antioxidant compounds from olive mill residue were oleuropein, verbascoside, hydroxytyrosol glucoside and oleuropein aglycon (which are compounds related the secoiridoids derivatives). With regard to flavonoids, quercetin, luteolin, luteolin-7-glucoside, rutin, nüzhenide and naringenin, they were characterised by De Marco et al. (2007), Obied et al. (2005) and Silva et al. (2006) by their effective potential in the antiradical activity.

4 Conclusion

For the first time, the olive wastewater was tested for its phenolic composition according to geographical origin areas. This work confirms the interest of olive mill wastewaters as a source of natural antioxidant biophenols, especially those derived from mountainous cultivar olive areas characterized by their pesticide free olives production and their highest polyphenols content. The high antioxidant potential of the OMWW phenolic extracts was related to their high contents of hydroxytyrosol, secoiridoids derivatives, and flavonoids. It was concluded that OMWW was a promising antioxidant phenolic source of further potential biological properties such as food antioxidant agents. Also, the understanding of the molecular activities of these natural compounds can lead to develop new applications in the pharmaceutical and biomedical domains.

Acknowledgments

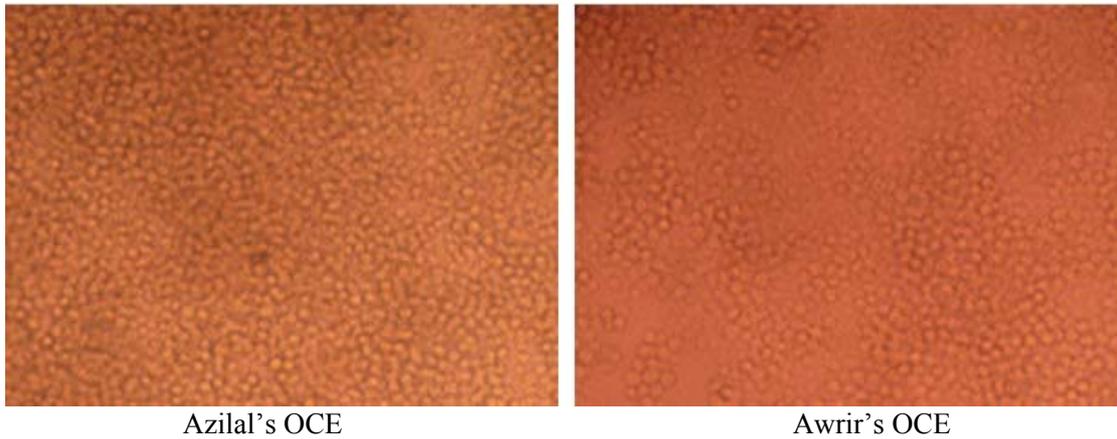
The authors would like to acknowledge the CNRST, Rabat Morocco, for their assistance in providing the HPLC-MS analyses. We also wish to thank Professor Khalid Chaouch, Department of English at the Sultan Moulay Slimane University, for reading the article and improving the English. This work was supported by the grant PROTARS III/D67.

References

- Allouche, N., Fki, I., & Sayadi, S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 267-273. PMID:14733507. <http://dx.doi.org/10.1021/jf034944u>
- Amro, B., Aburjai, T., & Al-Khalil, S. (2002). Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia*, 73(6), 456-461. [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00173-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00173-9)
- Aranda, E., Garcia Romera, I., Ocampo, J. A., Crbone, V., Mari, A., Malorni, A., Sannino, F., De Martino, A., & Capasso, R. (2007). Chemical characterization and effects on *Lepidium sativum* of the native and bioremediated components of dry olive mill residue. *Chemosphere*, 69(2), 229-239. PMID:17544478. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.026>
- Assas, N., Ayed, L., Marouani, L., & Hamdi, M. (2002). Decolorization of fresh and stored black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*, 38(3), 361-365. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00091-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00091-2)
- Ben Sassi, A., Boularbah, A., Jaouad, A., Walker, G., & Boussaid, A. (2006). A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*, 41(1), 74-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.074>
- Bianco, A., Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F., Jasionowska, R., & Margherita, P. (2003). Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, part I. *Journal of Separation Science*, 26(5), 409-416. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200390053>
- Borja, R., Alba, J., & Banks, C. J. (1997). Impact of the main phenolic compounds of olive mill wastewater (OMW) on the kinetics of acetoclastic methanogenesis. *Process Biochemistry*, 32(2), 121-133. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00055-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00055-6)
- Boscaiu, M., Sanchez, M., Bautista, I., Donat, P., Lidon, A., Llinares, J., Mayoral, O., & Vicente, O. (2010). Phenolic compounds as stress markers in plants from Gypsum Habitats. *Bulletin UASVM Horticulture*, 67(1), 44-49.
- Bouid, O., Navarro, D., Rochec, M., Asthera, M., Haona, M., Delattrea, M., Lorquin, J., Labat, M., Asthera, M., & Lesage-Meessen, L. (2005). Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. *Process Biochemistry*, 40(5), 1855-1862. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.054>
- Capasso, R., De Martino, A., & Arienzo, M. (2002). Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2846-2855. PMID:11982410. <http://dx.doi.org/10.1021/jf011442c>
- Capasso, R., Evidente, A., & Scognamiglio, F. (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable wastewaters. *Phytochemistry*, 31(12), 4125-4128. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80426-F](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(92)80426-F)
- Cardoso, S. M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J. A., Renard, C., & Coimbra, M. A. (2005). Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 21-32. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1925>
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S. R., Giovannozzi Sermanni, G., & Cascio, B. L. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50(8), 959-966. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00707-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00707-5)
- D'Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V., & Giovannozzi-Sermanni, G. (1998). The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*, 61(3), 209-218. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00036-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00036-4)
- D'Annibale, A., Ricci, M., Quarantino, D., Federici, F., & Fenice, M. (2004). *Panustigrius* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology*, 155(7), 596-603. PMID:15313262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.009>
- Davies, L. C., Vilhena, A. M., Novais, J. M., & Martins-Dias, S. (2004). Olive mill wastewater characteristics: modelling and statistical analysis. *Journal of Grasas y Aceites*, 55(3), 233-241.
- De La Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Catellote, A. I., Lamuela-Raventos, R. M., & Lopez-Sabater, M. C. (2005). Characterization and quantification of phenolic compounds in Olive Oils by Solid-phase Extraction, HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4331-4340. PMID:15913291. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0501948>
- De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., & Sacchi, R. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 104(2), 858-867. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.005>
- Dermeche, S., Nadoura, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: biochemical characterizations and

Tableau 2 : Composition chimique des grignons et des margines (Dermeche et al. 2013).

Paramètres	Margines	Grignons	Références
Pulpe (%)		12-35	Di Giovacchino & Prezioso, 2006.
Noyaux (%)		15-45	Di Giovacchino & Prezioso, 2006.
Matière sèche (%)	6,33-7,19	87,1-94,4	Vlyssides et al. 1996; Martinez Garcia et al. 2009.
Cendres (%)	1	1,7-4	Lafka et al. 2011 ; Vlyssides et al. 1998.
pH	2,24-5,9		Akar et al. 2009 ; Baeta-Hall et al. 2005.
Conductivité électrique (dS/m)	5,5-10		Cayuela, 2004 ; Baeta-Hall, 2005.
Total Carbone (%)	2-3,3	29,03-42,9	Garcia-Castello et al. 2010
Solides en suspension (g/l)	25-30		Khoufi et al. 2008.
Matières organiques (g/l)	57,2-62,1	85	Vlyssides et al. 2004.
Acidité volatile (g/l)	0,64		Fiestas et al. 1996.
Carbone inorganique (g/l)	0,2		Garcia-Castello et al. 2010.
Total Nitrogène (%)	0,63	0,2-0,3	Saviozzi et al. 2001.
P (%)	0,19	0,03-0,06	Cegarra et al. 2000.
K (%)	0,44-5,24	0,1-0,2	Yangui et al. 2009.
Na (%)	0,15		Ordonez et al. 1999; Madejon et al. 1998.
Ca (%)	0,42-1,15		Cegarra et al. 2000; Ordonez et al. 1999.
Mg (%)	0,11-0,18		Yangui et al. 2009; Alburquerque et al. 2004.
Fe (%)	0,26±0,03		Cayuela et al. 2004.
Cu (%)	0,0021		Paredes et al. 1999; Yangui et al. 2009.
Mn (%)	0,0015		Paredes et al. 1999; Ordonez et al. 1999.
Zn (%)	0,0057		Cegarra et al. 2000; Ordonez et al. 1999.
Lipides (%)	0,03-4,25	3,5-8,72	Paredes et al. 1999; Borsani et al. 1996.
Polyphénols totaux (%)	0,63-5,45	0,2-1,146	Caputo et al. 2003; Yangui et al. 2009.
Total Sucres (%)	1,5-12,22	0,99-1,38	Vlyssides et al. 2004 ; Caputo et al. 2003.
Total protéines (%)		3,43-7,26	Alburquerque et al. 2004; Molina & Ruiz, 2008.
DCO (g/l)	30-320		Galiatsatou et al. 2002.
DBO (g/l)	35-123		Al Malah et al. 2000.
Cellulose (%)		17,37-24,14	Vlyssides et al. 1998.
Hémicellulose (%)		7,92-11	Vlyssides et al. 1998.
Lignine (%)		0,21-14,18	Vlyssides et al. 1998.



Azilal's OCE

Awrir's OCE

Fig 4: Photographs of P815 cells at x 400 magnifications.

P815 cells (2×10^6 cells) were treated for 24 h with the IC_{50} concentration of OCE derived from different areas.

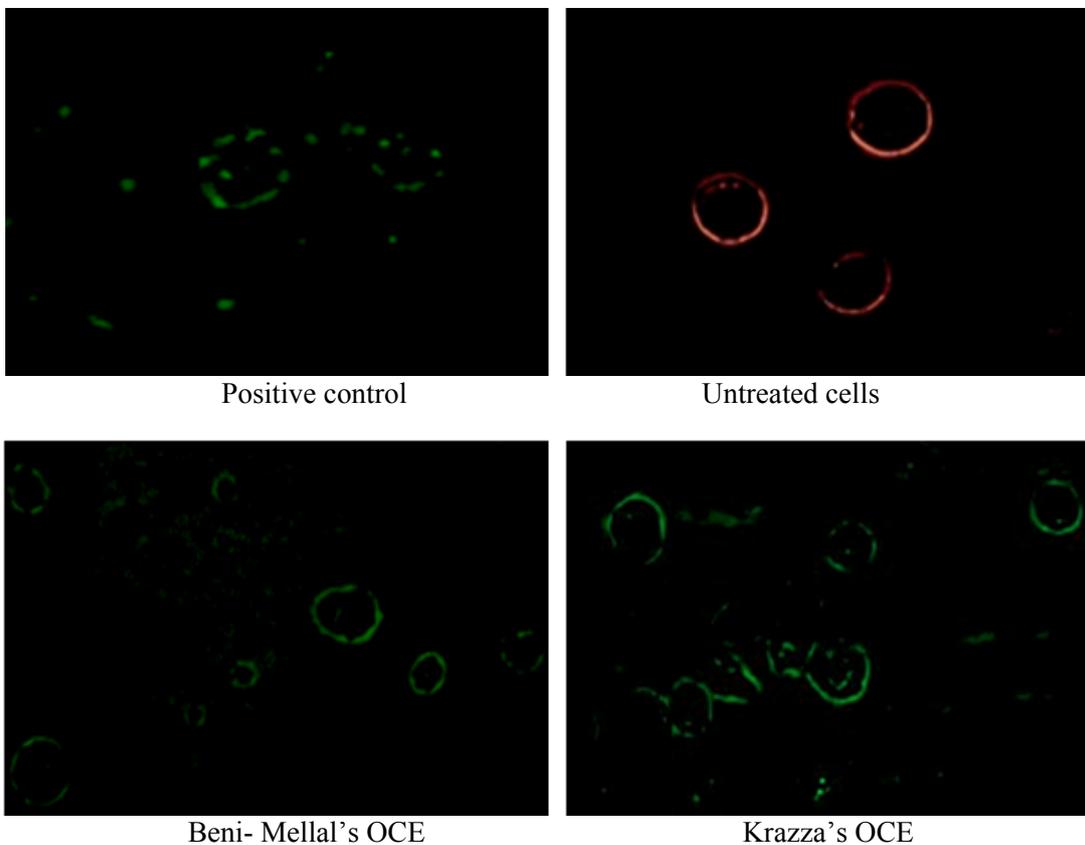
According to these data, cytotoxic activity may depend on the phenolic compounds dose and on the phenolic composition of the OCE. These data confirm the interest of olive oil residues as a rich source of natural antiproliferative phenolic compounds [7]. Also, Menendez *et al.* [12] have confirmed important antitumor effect of phenolic compounds isolated from extra-virgin olive oil.

3.4 Apoptosis induction by phenolic OCE

In order to contribute to the understanding of molecular mechanisms involved in the observed cytotoxic activity of OCE, apoptosis induction assay was performed using the

murine mastocytoma (P815) tumor cell line. The obtained results are shown in Figure 5.

As shown in this figure, OCE induced significantly the programmed cell death (apoptosis). As observed in the cytotoxic activity, OCE obtained from mountainous areas (Azilal and Awrir) underlay a higher antiproliferative potential and were more effective than OCE obtained from plain areas (Beni Mellal and Krazza) in inducing apoptosis. Therefore, mountainous areas OCE showed an advanced apoptotic state compared to plain areas OCE (Figure 5), confirming the highly important impact of the geographical parameter.



Positive control

Untreated cells

Beni- Mellal's OCE

Krazza's OCE

- valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532-1552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>
- Ergun Ergül, F., Sargin, S., Öngen, G., & Vardar Sukan, F. (2009). Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(1), 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.018>
- European Commission. (1991). *Council Directive 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment*. Official Journal of the European Communities. Retrieved from <http://ec.eu/legislation>
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., & Parrella, A. (2003). Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular weight phenol components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1005-1009. PMID:12568563. <http://dx.doi.org/10.1021/jf020887d>
- Hamdi, M. (1993). Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment: a review. *Bioprocess Engineering*, 8(5-6), 209-214. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00369831>
- Hoque, E. (1999). *Beiträge zu Wirkungsgefüge und Systemantwort der Pflanzen und Pilze auf Stress* (Master's thesis). Faculty of Mathematics and Natural Science, Technical University Dresden, Dresden.
- Ibarra, J. V. (1989). Fourier transform infrared studies of coal humic acids. *Science of The Total Environment*, 81-82, 121-128. [http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697\(89\)90117-4](http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(89)90117-4)
- Juarez, M. J. B., Zafra-Gomez, A., Luzon-Toro, B., Ballesteros-García, O. A., Navalón, A., Gonzalez, J., & Vilchez, J. L. (2008). Gas chromatographic-mass spectrometric study of the degradation of phenolic compounds in wastewater olive oil by *Azotobacter Chroococcum*. *Bioresource Technology*, 99(7), 2392-2398. PMID:17624767. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.010>
- Juili, I., Taji, M. A., Amraoui, F., & Tahiri, M. (2013). Climate variability and water resources in watershed Oum Errbia. *Science Lib*, 5.
- Kumar, A., Varadaraj, B. G., & Singla, R. K. (2013). Synthesis and evaluation of antioxidant activity of novel 3,5-disubstituted-2-pyrazolines. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 51(2), 167-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2013.04.002>
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J. L., Asther, M., & Labat, M. (2001). Simple phenolics content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75(4), 501-507. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00227-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00227-8)
- Mantzavinos, D., & Kalogerakis, N. (2005). Treatment of olive mill effluents. Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes: an overview. *Environment International*, 31(2), 289-295. PMID:15661297. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.005>
- McDonald, S., Prenzler, P. D., Antolovich, M., & Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73(1), 73-84. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00288-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00288-0)
- Mekki, A., Dhoubi, A., & Sayadi, S. (2006). Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological Research*, 161(2), 93-101. PMID:16427511. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2005.06.001>
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823-837. PMID:15712986. <http://dx.doi.org/10.1021/jf048569x>
- Obied, H. K., Bedgood Jr. D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1238-1248. PMID:17329005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.01.004>
- Obied, H. K., Bedgood Jr., D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2008). Effect of processing conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 3925-3932. PMID:18457398. <http://dx.doi.org/10.1021/jf703756d>
- Ramos, R., Santos, S. A. O., Guerra, A. R., Guerreiro, O., Felício, L., Jerónimo, E., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., & Duarte, M. (2013). Valorization of olive mill residues: antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Industrial Crops and Products*, 46, 359-368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.020>
- Romero, C., Brenes, M., García, P., & Garrido, A. (2002). Hydroxytyrosol 4-beta-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3835-3839. PMID:12059168. <http://dx.doi.org/10.1021/jf011485t>
- Ruiz-Rodriguez, A., Soler-Rivas, C., Polonia, I., & Wichers, H. J. (2010). Effect of olive mill waste (OMW) supplementation to Oyster mushrooms substrates on the cultivation parameters and fruiting bodies quality. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(7), 638-645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.07.003>
- Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P. D., Lavee, S., & Robards, K. (2002). Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6716-6724. PMID:12405767. <http://dx.doi.org/10.1021/jf025736p>
- Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., & Aloui, F. (2000). Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Bioprocess Biochemistry*, 35(7), 725-735. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00134-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00134-X)
- Scalbert, A., Monties, B., & Janin, G. (1989). Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1324-1329. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00089a026>
- Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchioni, A., & Montedoro, G. F. (1999). High performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin oil, vegetation waters and pomace in 1D- and 2D nuclear magnetic resonance characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7), 873-882. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-999-0079-2>
- Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A. V., & Vilas Boas, L. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruit and leaves. *Food Science and Technology International*, 12(5), 385-396. <http://dx.doi.org/10.1177/1082013206070166>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-115.
- Suarez, M., Romero, M. P., Romo, T., Macia, A., & Motilva, M. J. (2009). Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1463-1472. PMID:19178195. <http://dx.doi.org/10.1021/jf8032254>
- Visioli, F., Poli, A., & Galli, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22(1), 65-75. PMID:11746176. <http://dx.doi.org/10.1002/med.1028>

I.3. Facteurs influençant la composition chimique des sous-produits de l'huile d'olive

I.3.1. La maturité des olives

Le degré de maturité des olives intervient pour environ 30% sur la qualité de l'huile. Il est connu que la maturation des olives passe par trois stades: vert, semi-noir et noir. L'huile qui est issue de chaque stade a une composition qui lui est spécifique. La date de récolte des olives a un poids très important sur la qualité de l'huile qui en est issue. Ainsi, le stade optimal de récolte donnera le maximum d'arôme et le maximum de polyphénols, dans l'huile d'olive comme dans ses sous-produits (Dermeche et al. 2013).

I.3.2. Le mode et la durée de stockage des olives

Le mode et la durée de stockage sont importants et influent beaucoup sur la qualité de l'huile et ses sous-produits. Le mode de stockage en caisses est le meilleur moyen, car il permet l'aération du fruit et le gain d'espace, puisque les caisses permettent un stockage en hauteur.

Le stockage des olives est un mal nécessaire et constitue souvent la principale cause de la détérioration de la qualité des olives en raison de la cadence de réception, qui est dans la majorité des cas, supérieure à la capacité de trituration. Mais aussi dans le cas inverse, où le stockage a pour but la constitution d'une quantité suffisante d'olives pour alimenter les machines. Généralement, les modes de stockage des olives sont coûteux et peu efficaces. La seule manière, pratiquée par les unités de trituration pour limiter l'altération des olives, est de réduire la durée de stockage au minimum possible (2 à 5 jours), limiter l'épaisseur de la couche entre 20 à 30 cm en cas de stockage en vrac pour permettre l'aération et veiller à une rotation méthodique des stocks.

I.3.3. Le système d'extraction d'huile

Les systèmes d'extraction jouent un rôle important dans la détermination de la composition des sous produits d'huile d'olive. Le système écologique de trituration à deux phases produit une huile de bonne qualité et des sous produits riches en composés phénoliques naturels en comparaison au système à trois phases et le système par presse (Chimi, 2006; Leasage-Meessen et al. 2001).

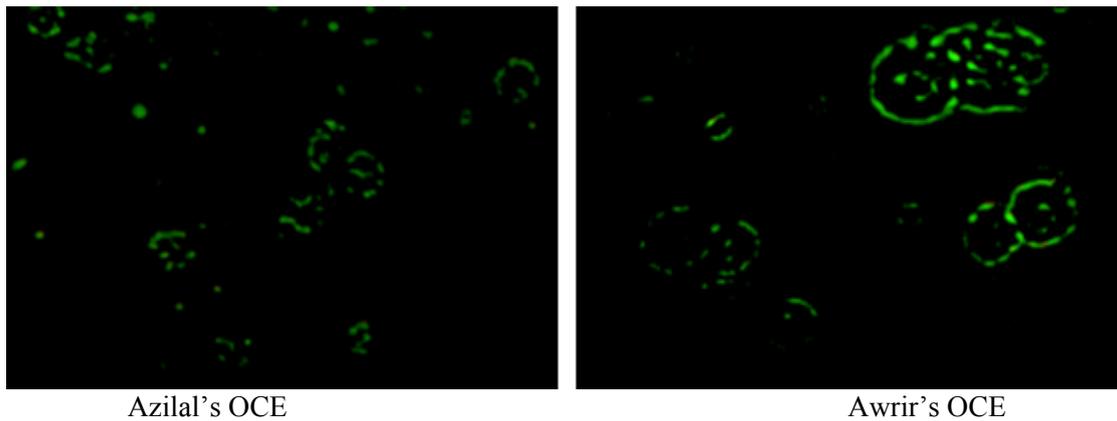


Fig 5: Apoptosis induction analysis in P815 mastocytoma cell line.

P815 tumor cells (2×10^6 cells) were treated with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of OCE. The assay is based on the ability of Annexin V (green fluorescence) to bind to the phosphatidylserine exposed on the surface of cells undergoing apoptosis. Cells cultured in a medium without serum were used as a positive control.

In this way, mountainous areas extracts may contain some phenolic compounds while they are absent in plain areas extracts. In fact, quercetin, for example, a natural phenolic compound found in this study only in Azilal's OCE, showed an antiproliferative effect against U937 cell line especially by inhibiting the cell cycle at the G2/M phase and induced caspase-dependent cell death [32].

3.4.1. Detection of OCE induced apoptosis by DNA fragmentation test: DNA fragmentation was analysed after exposure of P815 cells to the OCE for 24 h (Figure 6). The endonucleolytic DNA cleavage was checked by agarose gel electrophoresis and revealed 180-200 bp characterizing programmed cell death fragments for all the extracts. Taken together, these results permit to conclude that OCE inhibit the proliferation of P815 tumor cells through the induction of apoptosis.

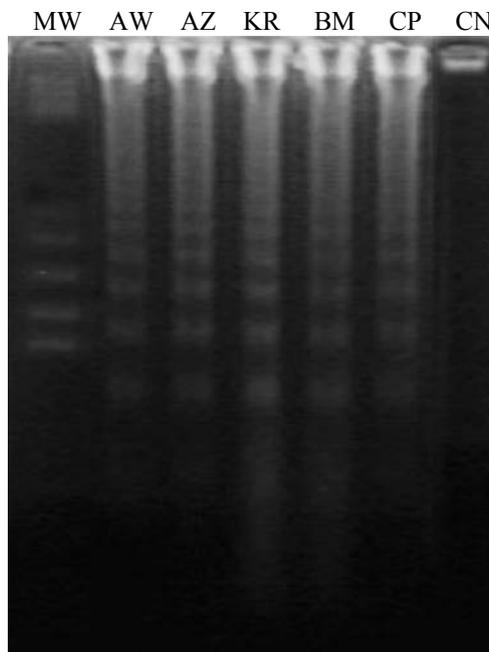


Fig 6: Apoptosis induction effect of OCE.

OCE induced DNA fragmentation was detected by agarose gel electrophoresis of DNA isolated from P815 tumor cells. P815 cells were incubated for 24 h with OCE (corresponding to IC_{50} concentrations).

*BM: Beni mellal, KR: Krazza, AZ: Azilal, AW: Awrir. DNA of untreated cells was used as negative control (NC). Positive control (PC): serum starvation.

I.3.4. Les conditions climatiques

L'évaluation des facteurs climatiques sur la teneur en composés phénoliques extraits de plantes est d'un grand intérêt. Une forte corrélation a été démontrée entre l'accumulation des composés phénoliques (métabolites secondaires) dans les plantes et les conditions de stress environnemental (Boscaiu et al. 2010). La quantité de composés phénoliques totaux accumulés dans les plantes est très variable et dépendent principalement de leur taxonomie, c'est à dire des facteurs génétiques. Néanmoins, ces composés semblent être des marqueurs appropriés de stress chez de nombreuses espèces, puisque leurs niveaux augmentent considérablement lorsque les plantes sont soumises à des conditions de stress environnemental comme les températures élevées, la sécheresse et l'appauvrissement des sols.

I.4. Impact des margines et des grignons sur l'environnement, leur traitement et leur valorisation

I.4.1. Pouvoir polluant des grignons et des margines

Les grignons et les margines d'olive présentent un problème environnemental majeur en raison de leur lourde charge en matières organiques. La production annuelle de ces effluents est estimée entre 7 et 30 millions m³ dans les pays producteurs d'huile d'olive (Niaounakis et al. 2006). Au Maroc, les quantités annuelles produites sont estimées à 180 000 t de grignons et 250 000 m³ de margines (Ben Sassi et al. 2006). Les problèmes de pollution sont essentiellement causés par les margines. Ces effluents sont très nocifs pour l'environnement, et plusieurs études ont démontré les effets négatifs sur les populations microbiennes du sol, les écosystèmes aquatiques et l'air par les émissions de phénols et de dioxyde de soufre (Rana et al. 2003). Les phénols sont les principaux contributeurs à cette pollution à cause de leur toxicité et leur activité antimicrobienne. Le pouvoir polluant des margines est dû également à leur forte charge en matières organiques toxiques, à leur pH acide, et à leur demande chimique en oxygène (DCO) élevée (jusqu'à 110 g O₂/l) et une demande biologique en oxygène (DBO5) allant de 60 à 170 g O₂/l par jour et par personne (Stasinakis et al. 2008), ce qui équivaut à une pollution produite par 6 millions d'habitants (Leulmi, 2011). Il est admis (selon Directive CEE) qu'une DBO5 < 1 mg/l d'oxygène peut être considérée comme normale, entre 1 et 3 mg O₂/l acceptable, au delà de 3 mg O₂/l comme douteuse ou anormale. L'absence de méthodes de traitements adaptées aux besoins des unités de trituration pousse les propriétaires à rejeter ces eaux dans la nature sans aucun contrôle ou traitement (Figure 5) et par la suite à surcharger le réseau d'égouts avec des substances toxiques.

Interestingly, this is the first study assessing an effective cytotoxic activity associated with apoptosis induction effect of phenolic compounds derived from olive cake extracts against the P815 cell line.

3.5 Cytotoxic activity of OCE against human normal cells:

In order to investigate the effect of OCE on normal

cells, their cytotoxicity against PBMC from healthy donors was evaluated. Cells were incubated with increasing concentrations of OCE extracts in the same conditions as those used for tumor cells. Figure 7 represents the percentage of viability percentage of OCE treated PBMC.

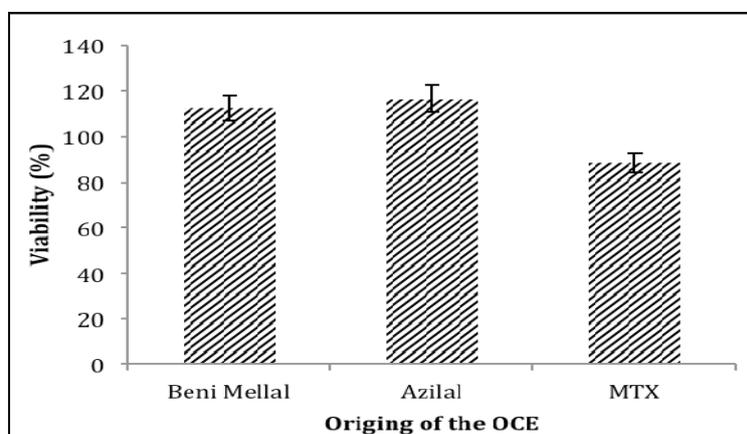


Fig 7: Percent viability of human PBMC treated with OCE.

Cells from healthy human donors are isolated and cultured as detailed in material and methods. Data are the means \pm SD of three independent experiments

It is shown in this figure that OCE exhibited a proliferative effect on PBMC enhancing the viability with 12% and 16% in 48 h for the two studied olive cake extracts from Beni Mellal and Azilal, respectively. However, methotrexate suppressed 20% viability of these cells. These data showed the differential and selective effect of OCE. To the best of our knowledge, OCE immune-modulatory potential has never been reported in the literature. Taking together, our results underlined a high potential of natural phenolic extracts as anticancer agents.

4. Conclusion

This study shows a richness and variability of the phenolic compounds in OCE. It also confirms the interest of olive oil residues as a rich source of natural biophenols. The results demonstrate the potential *in vitro* anticancer applications of phenolic extracts from Moroccan olive cake. The differential and selective antiproliferative activity of olive cake derived extracts against P815 cells was demonstrated for the first time. Indeed, mountainous areas extracts, with the highest phenolic compounds content compared to plain areas, showed a good antiproliferative potential against tumor cell line while they exhibited an immuno-stimulating effect on PBMC confirming the selective action of OCE. These related beneficial health-promoting effects of OCE seem to be correlated to the phenolic compounds amount and the phenolic composition. Finally, it is clear that if we promote these natural phenolic compounds and we understand the molecular mechanisms of their biological activities, we will be able to develop new therapeutic modalities whether they are used alone or in combination

with other antitumor agents.

5. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the CNRST, Rabat, Morocco, for their assistance in providing the HPLC-MS analysis. We also wish to thank Professor Khalid Chaouch, Department of English at the Sultan Moulay Slimane University, for reading the article and improving the English. This work was supported by the grant PROTARS III/D67.

6. References

- Obied HK, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K, Stockmann R. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J Agric Food Chem* 2005; 53:823–837.
- Suarez M, Romero MP, Motilva MJ. Development of o phenol-enriched olive oil with phenolic compounds from olive cake. *J Agric Food Chem* 2010; 58:10396–10403.
- Serra LR, Borra's X, Macia A, Romero MP, Motilva MJ. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56:486–496.
- Aranda E, Garcia-Romera I, Ocampo JA, Carbone V, Mari A, Malorni A *et al.* Chemical characterization and effects on *Lepidium sativum* of the native and biomediated components of dry olive mill residue. *Chemosphere* 2007; 69:229–239.
- Rodis PS, Karathanos VT, Mantzavinou A. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J Agric Food Chem* 2002; 50:596–601.



Figure 5: Décharge des grignons et des margines sans traitement dans la nature.

a. Impact sur le sol

Les margines sont très polluantes pour le sol, elles affectent particulièrement la qualité des surfaces dans lesquelles elles sont déversées. Les dégâts produits sont considérables : sols obturés et suffoqués, mauvaise odeur, pollution de l'aquifère, effet phytotoxique sur la population microbienne et végétale du sol. Ainsi, ces effets négatifs agissent également sur la croissance des plantes et leur décomposition et par conséquent cause la disparition de certaines populations animales.

b. Impact sur l'eau

En plus des désagréments visuels et des mauvaises odeurs, la forte charge organique des margines détruit totalement la faune et la flore aquatique par absorption de tout ou une partie de l'oxygène dissous dans les eaux. Ainsi, en réduisant le taux de l'oxygène disponible, les margines déversées dans l'eau douce perturbent le déroulement total de l'écosystème (Kapellakis et al. 2006). Les margines ont également des répercussions importantes sur les eaux de surface en raison des concentrations élevées de composés phénoliques sombres ce qui provoque la coloration des eaux des fleuves et des rivières (Niaounakis et al. 2006). En plus, les lipides provenant des margines forment un film impénétrable sur la surface de l'eau, ce qui bloque la lumière du soleil et l'oxygène et inhibe ainsi la croissance des plantes (Kapellakis et al. 2006). Par ailleurs, la construction de bassins d'évaporation où les margines sont rassemblés, respectent rarement les critères et les normes de sécurité. Dans ce cas, les margines s'infiltreront souvent dans la nappe phréatique et affecte ainsi les systèmes avoisinants (sols agricoles et eaux de surface souterraines) (Zenjari et Nejmeddine, 2001). Par conséquent, cette situation peut augmenter considérablement la concentration en composés phénoliques dans les eaux souterraines au cours de la période active de l'extraction d'huile (Spandre et Dellomonaco, 1996).

6. Fiorentino A, Gentili A, Isidori M, Monaco P, Nardelli A, Parrella A. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity comparison of low-molecular weight phenol components. *J Agric Food Chem* 2003; 51:1005–1009.
7. Ramos R, Santos SAO, Guerra AR, Guerreiro O, Felício L, Jerónimo E *et al.* Valorization of olive mill residues: Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Industrial Crops and Products* 2013; 46:359–368.
8. Lopez-Pineiro A, Albarran A, Nunes JMR, Barreto C. Short and medium- term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under semiarid Mediterranean conditions. *Bioress Tech* 2008; 99:7982–7987.
9. Manios T. The composting potential of different organic solid wastes, experience from the island of Crete. *Env Intern* 2004; 29:1079-1089.
10. Roig A, Cayuela ML, Sanchez-Monedero MA. An overview on olive mill wastes and their valorization methods. *Waste Manag* 2006; 26:960-969.
11. Allu'datt MH, Alli I, Ereifej K, Alhamad M, Al-Tawaha A, Rababah T. Optimization, characterization and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chem* 2010; 123:117-122.
12. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Oliveras-Ferraro C, Fernandez-Gutierrez A *et al.* Anti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *BMC Cancer* 2008; 8:377.
13. Obied HK, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology* 2007; 45:1238–1248
14. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viti* 1965; 16:144-15.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immunol Meth* 1983; 65:55-63.
16. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutlingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth* 1995; 184:39-51.
17. Dermeche S, Nadoura M, Larroche C, Moulati-Mati F, Michaud P. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 2013; 48:1532–1552.
18. Allouche N, Fki I, Sayadi S. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J Agric Food Chem* 2004; 52:267–273.
19. Julii I, Taji MA, Amraoui F, Tahiri M. Climate variability and water resources in watershed Oum Errbia. *Science Lib* 2013, 5.
20. Boscaiu M, Sanchez M, Bautista I, Donat P, Lidon A, Llinares J *et al.* Phenolic compounds as stress markers in plants from Gypsum Habitats. *Bulletin UASVM Horticulture* 2010; 67(1).
21. De-Marco E, Savarese M, Paduano A, Sacchi R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry* 2007; 104:858–867.
22. Suarez M, Romero MP, Romo T, Macia A, Motilva MJ. Methods for preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants. *J Agric Food Chem* 2009; 57:1463-1472.
23. Torre-Carbot DLK, Jauregui O, Gimeno E, Catellote AI, Lamuela-Raventos RM, Lopez-Sabater MC. Characterization and quantification of phenolic compounds in Olive Oils by Solid-phase Extraction, HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 2005; 53:4331-4340.
24. Cardoso SM, Guyot S, Marnet N, Lopes-da-Silva JA, Renard C, Coimbra MA. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and pomace by electrospray mass spectrometry. *J Sci Food Agric* 2005; 85:21–32.
25. Romero C, Brenes M, Garcia P, Garrido A. Hydroxytyrosol 4- β -D glucoside, an important phenolics compound in olive fruits and derived products. *J Agric Food Chem* 2002; 50:3835-3839.
26. Alhamad MN, Rababah TM, Allu-datt M, Ereifej K, Esoh R, Feng H *et al.* The physicochemical properties, total phenolic, antioxidant activities, and phenolic profile of fermented olive cake. *King Saud University. Arab J of Chem* 2012.
27. Obied HK, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K. Effect of processing conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive mill waste. *J Agric Food Chem* 2008; 56:3925–3932.
28. Amro B, Aburjai T, Al-Khalil S. Antioxidative and radicalscavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia* 2002; 73:456-461.
29. Mc-Donald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* 2001; 73(1):73–84.
30. Juarez MJB, Zafra-Gomez A, Luzon-Toro B, Ballesteros-Garcia OA, Navalón A, Gonzalez J *et al.* Gas chromatographic–mass spectrometric study of the degradation of phenolic compounds in wastewater olive oil by *Azotobacter chroococcum*. *Bioress Tech* 2008; 99:2392–2398.
31. Capasso R, De-Martino A, Arienzo M. Recovery and Characterization of the Metal Polymeric Organic Fraction (Polymerin) from Olive Oil Mill Wastewaters. *J Agric Food Chem* 2002; 50:2846–2855.
32. Lee TJ, Kim OH, Kim YH, Lim JH, Kim S, Park JW *et al.* Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Letters* 2006; 240: 234-242.

c. Impact sur l'air

Les margines sont souvent stockées dans des réservoirs ouverts ou déchargées sur le sol ou dans les eaux naturelles, ainsi ils peuvent subir une fermentation et émettent du méthane et d'autres gaz toxiques tels que le sulfure d'hydrogène (Niaounakis et al. 2004). Sachant que la région méditerranéenne possède à elle seule 95% de la production mondiale des margines, ainsi, dans les zones touristiques et archéologiques des pays méditerranéens, la pollution de l'air a pour conséquence des répercussions négatives sur les activités économiques.

I.4.2. Traitement des margines

La variabilité des composés phénoliques des margines complique considérablement leurs traitements. La raison en est que certains consortiums de micro-organismes, qui peuvent efficacement traiter les margines, peuvent être inhibés par d'autres. La teneur en composés phénoliques est également liée au rapport de dilution des margines, l'objectif étant de réduire leur toxicité, avant le traitement. Le traitement dans certains cas semble être relativement incertain en raison du coût et de la complexité des techniques de purification (Dermeche 2013). Au cours de ces dernières années, ces effluents ont été l'objet d'une grande attention de la part des institutions scientifiques, des entreprises et des organismes publics. Le but commun est d'étudier et de proposer les meilleures stratégies et technologies de minimisation, de bonne valorisation ou d'élimination de l'effet polluant de ces effluents. Il s'agit, dans la plupart des cas, d'opérations élémentaires ou combinées, testées en laboratoire ou dans une installation pilote sans projection industrielle ultérieure (Arda et al. 2010). Il existe plus de 20 procédés applicables au traitement des margines (Tableau 3).

Tableau 3: Technologies de traitement des margines (Leulmi, 2011)

Type de traitement	Le procédé	Références
Thermique	Evaporation naturelle	Lacomelli, 2000
	Evaporation forcée	Lacomelli, 2000
Biologique	Lagunage	Kavvadias et al. 2010
	Aérobic	Projet SMAP III, 2006-2008.
	Anaérobic	Arda et al. 2010
	Aérobic-Anaérobic	Kavvadias et al. 2010
	Enzymatique : laccase	Gonçalves et al. 2009
Physique	Procédés membranaires	Kavvadias et al. 2010
	Neutralisation, précipitation/ floculation	Kavvadias et al. 2010
	Procédés d'absorption	Azbar et al. 2009
	Biofiltration	Lacomelli A. 2000
Physico-chimique	L'électrocoagulation	Mantzavinos & Kalogerakis, 2005
	La coagulation-floculation	Dias et al. 2004
Traitements combinés	Ultrafiltration-oxydation avancée	Pharm Minh et al. 2006
	Oxydation avancée-traitement biologique	Chedeville et al. 2009
	Coagulation-oxydation avancée	Canizares et al. 2007

I.4.3. Traitement des grignons

Comme la majorité des sous-produits végétaux, les grignons sont phytotoxiques (Sampedro et al. 2004). L'une des études les plus prometteuses en matière de technologies de traitement des grignons est la dégradation biologique avec des champignons, mais l'efficacité de ce traitement n'est pas toujours satisfaisante, vis-à-vis du temps de traitement (Sampedro et al. 2005). Bien que le traitement des phénols des margines a été nettement amélioré, peu d'études liées au traitement des grignons ont été réalisées à ce jour (Di Gioia et al, 2001). Toutefois, un traitement séquentiel bien conçu constitué de divers procédés chimiques, physiques et biologiques avec des objectifs de traitement bien définis peut être la solution optimale (Mantzavinos et Kalogerakis, 2005).

I.4.4. Valorisation des grignons et des margines

I.4.4.1. Valorisation des grignons

Les grignons d'olive possèdent une filière de valorisation bien développée qui consiste à leur utilisation dans plusieurs domaines comme l'extraction d'huile de grignons destinée à la fabrication du savon, l'alimentation de bétail, et en tant qu'engrais ou combustibles. Des exemples de méthodes de valorisation sont décrits ci-dessous :

➤ **Valorisation des grignons en alimentation animale**

L'utilisation des grignons en alimentation animale est limitée en raison de leur faible valeur nutritive ; ils sont pauvres en protéines et riches en lignine et en cellulose brute (Nefzaoui, 1991), ce qui leur donne une valeur fourragère réduite.

➤ **Utilisation des grignons en tant qu'engrais**

Les grignons peuvent être utilisés comme engrais en raison de leur teneur en matière organique et minéral élevée (Sampedro et al. 2004). Les études dans ce sens sont encore limitées.

➤ **Utilisation des grignons comme combustibles**

C'est encore aujourd'hui l'application la plus courante. En réalité les grignons d'olive sont un combustible de valeur calorifique moyenne (2950 Kcal/kg) ; elle est apportée principalement par la coque qui représente 60% du total avec un pouvoir calorifique relativement élevé (4000 Kcal/kg).

I.4.4.2. Valorisation des margines

Les dix dernières années ont vu se multiplier les nombres de recherches qui travaillent sur l'utilisation des margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie, de l'agriculture et voire même du génie civile (Tyouri et al. 2007). Le problème de la valorisation des margines se pose en termes de préservation de l'environnement. L'utilisation d'une telle technique ou une autre ne doit pas être considéré uniquement sous l'angle de la rentabilité économique mais surtout doit tenir compte de l'efficacité d'épuration. Leur valorisation a fait l'objet de plusieurs études, certaines d'entre elles sont encore au stade d'expérimentation (Kavvadias et al. 2010). Quelques procédés d'épuration sont testés :

➤ **Utilisation des margines comme fertilisant**

Les expérimentations agronomiques réalisées pour optimiser les doses d'apport conforme aux règles de fertilisation, ont toutes montré l'effet favorable des margines sur la fertilité des sols (De Monpezat et Denis., 1999), car d'une part, elles ne contiennent pas des métaux lourds et des microorganismes pathogènes (Sierra et al. 2007), et d'autre part, elles sont riches en éléments minéraux nutritifs (K, N, P, Mg). L'inconvénient majeur de cette méthode de valorisation est l'infiltration dans le sol causant ainsi la pollution de la nappe phréatique.

➤ **Utilisation des margines comme aliments pour les ruminants**

L'expérience dans ce domaine est très récente. Les effluents sont utilisés directement comme boisson pour les ruminants. Ces expériences ont montré un abaissement du taux de mortalité de ces animaux et une diminution de leur coût par kg de viande produite (Benhayoun et Lazzeri, 2007).

➤ **Valorisation des margines par récupération de composants**

Il s'agit, en particulier de la récupération des composés aromatiques et phénoliques (Benhyaoun et Lazzeri, 2007). Les extraits phénoliques obtenus sont comparés aux antioxydants de synthèse les plus connus dans des essais de résistance à l'oxydation. Ces essais ont montré que l'addition de l'extrait des margines protège de l'oxydation les produits alimentaires de manière plus efficace que l'addition des antioxydants chimiques (Obied, 2007; Suarez, 2009).

II. Les polyphénols, Structure, Classification et Propriétés

II.1. Présentation générale sur les 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. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (Yusuf, 2006). Ils sont présents dans les vacuoles des tissus et sont responsables des pigments colorés de nombreux fruits et légumes. Ils protègent les plantes contre les maladies et la lumière UV et aident à prévenir les dommages des graines jusqu'à ce qu'elles germent. Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. Les principales sources de polyphénols dans notre régime alimentaire sont les fruits, les légumes, les céréales, les olives, les légumineuses, le thé, le café et le vin. Au cours des dernières années, on a assisté à une explosion du nombre de travaux de recherches consacrés aux effets des polyphénols sur la santé (Scalbert et al, 2000, Mila et al. 1996; Ames et al.1993; Bisignano et al. 1999; Serra et al. 2012; Cao, et al. 1998; Crozier, et al. 2009 ; Hollman & Katan, 1999 ; Garcia-Lafuente, 2009).

L'expression de «composés phénoliques» est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles substitués et une chaîne latérale fonctionnelle (Bloor, 2001). Les composés phénoliques naturels comprennent des molécules simples, comme des acides phénoliques ainsi que des composés hautement polymériques comme les tanins. Les formes les plus courantes de composés phénoliques sont conjuguées avec différentes molécules de sucre (mono-, di- ou oligosaccharides), avec des acides organiques et des lipides, ou même avec d'autres phénols (Bravo, 1998). Les différences entre ces structures chimiques conjuguées représentent les différentes classifications et la variabilité chimique dans leurs modes d'action et leurs propriétés biologiques dans le domaine de la santé.

Dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons les différentes classes de polyphénols ainsi que leurs propriétés chimiques. Ceci sera suivi, dans une deuxième partie, par un rappel bibliographique sur les polyphénols des grignons et des margines et une description de leurs effets thérapeutiques.

II.2. Classification des polyphénols

Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné. Les principales catégories sont les acides phénoliques et les aldéhydes, les flavonoïdes, les lignanes, les stilbènes, les tanins et les lignines (Shahidi ujet Naczk, 2003). Une classification de ces substances a été proposée par Macheix, (2006) (Tableau 4) où 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.

Tableau 4: Principales classes des composés phénoliques (Macheix, 2006)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes, Coumarines, Isocoumarines, Chromones	Acide caféique, acide férulique, Myristicin, eugénol, Scopolétine, Myristicine, eugénol, Eugenine	Pomme de terre, Pomme, citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, plumbagine	Noix
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes, Anthraquinones	Resvératrol, Anthraquinones	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, daïdzéine	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes, Neolignanes	Pinorésinol, Eusiderine	Pin
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Amentoflavone	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés		

II.2.1. Les phénols simples

Les phénols simples sont des composés phytochimiques qui contiennent un seul noyau aromatique substitué par deux groupements hydroxyles (Cowan, 1999). Ces composés sont rencontrés chez de nombreuses espèces végétales. La forme la plus abondante est : le catéchol (Figure 6).

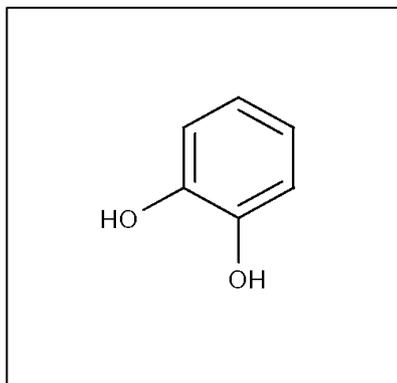


Figure 6 : Structure du catéchol

II.2.2. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques. Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués (Figure 7).

➤ Les acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque et se caractérisent par une structure générale de base de type (C6-C1). Largement répandus dans les fruits et les légumes, ils sont souvent rencontrés sous forme d'esters ou de glycosides. Leur diversité structurale est due aux hydroxylations et/ou méthoxylations du noyau aromatique en diverses positions (2, 3 et 4). Les acides les plus abondants sont : l'acide 4-hydroxybenzoïque, 3- hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentisique (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006).

➤ Les acides hydroxycinnamiques

Ce sont des dérivés de l'acide cinnamique, caractérisés par une structure générale de base de type (C6-C3) et sont souvent rencontrés sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules.

Très abondants dans les végétaux, leur diversité est également due à la variabilité des hydroxylations du noyau aromatique (Clifford, 2000b). Les principaux acides hydroxycinnamiques sont: l'acide caféique, férulique, sinapique, et p-coumarique (Sarni-Manchado et Cheyner, 2006). L'acide caféique est le composé le plus fréquent avec 75 à 100% des acides hydroxycinnamiques totaux présents dans les fruits (D'Archivio, et al. 2007).

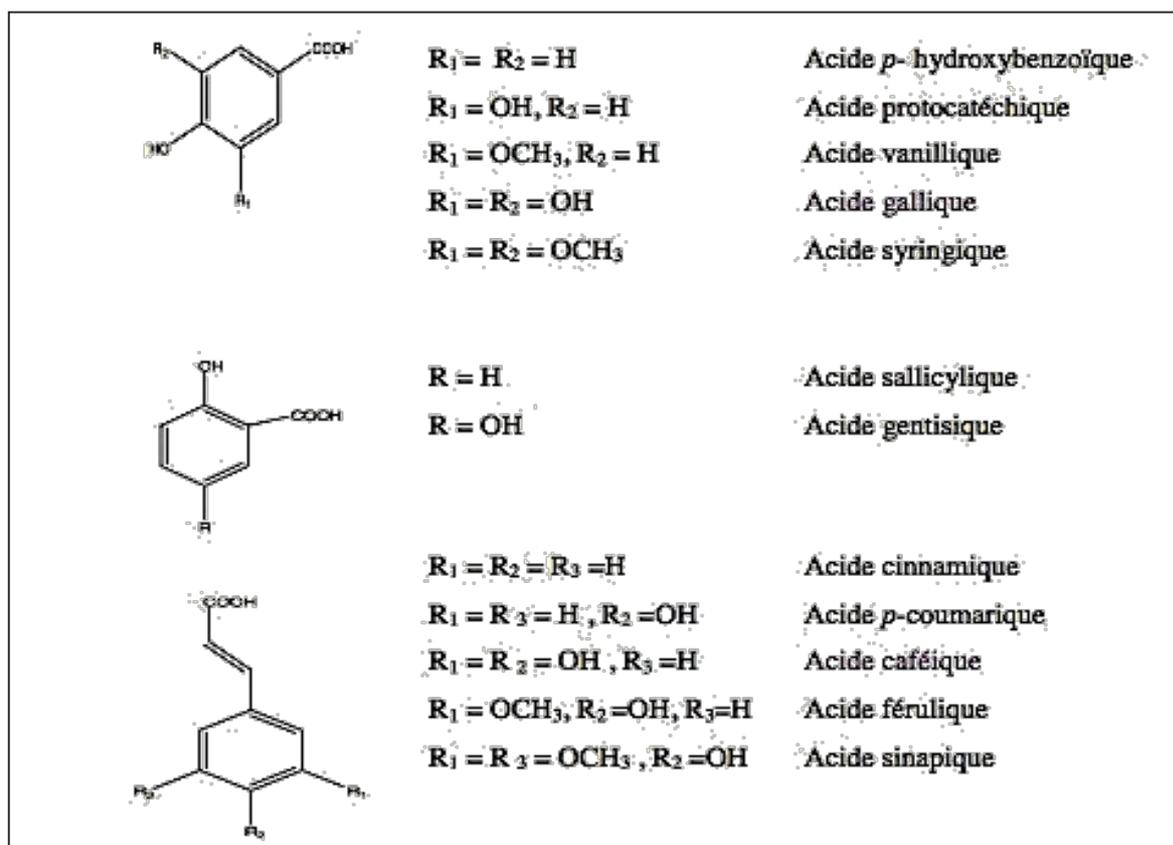


Figure 7 : Exemple d'acides phénoliques

II.2.3. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux. Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes. Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans

divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour. Ainsi, nous en absorbons une chaque fois que nous consommons un aliment d'origine végétale. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones « 2-phényl-1-benzopyrane », constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par un cycle pyranique central (Figure 8).

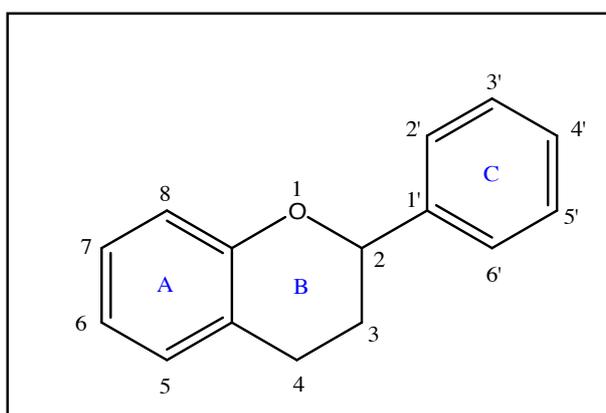


Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C.

a. Flavones et flavonols

Comme nous l'avons signalé plus haut, tous les types des flavonoïdes dérivent de la 4, 2',4',6'-tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent généralement trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-3' (Figure 9). Dans plus de 90% des cas, le noyau A des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7.

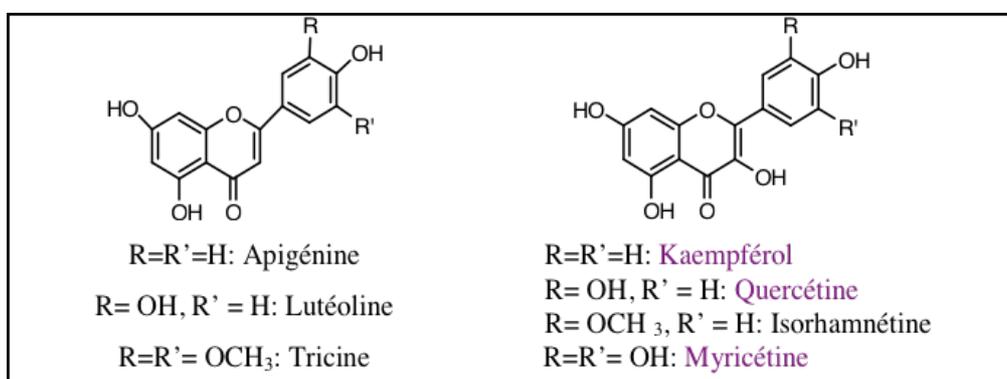


Figure 9: Structures chimiques des flavones et flavonols

D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables : les groupements hydroxyles peuvent être libres ou méthylés, ou impliqués dans une liaison glycosidique. Le noyau B est monosubstitué dans 80% des cas en position 4', ou disubstitué en positions 3' et 4', ou trisubstitué (moins fréquemment) en positions 3', 4' et 5'. Ces substituants peuvent être des groupes OH ou OMe. Les positions 2' et 6' ne sont qu'exceptionnellement substituées. Le noyau C peut être substitué par un groupement OH, OMe ou O-Gly.

Les flavanols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C-3. Ces composés constituent le groupe le plus hydroxylé de la famille des flavonoïdes. Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses: D-glucose, D-galactose, L-rhamnose et L-arabinose.

b. Les flavanones

Les flavanones et les flavanonols (dihydroflavonols) sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence d'un carbone asymétrique en C2, voire en C3. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et flavonols. Les flavanonols (encore appelés dihydroflavonols) se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé regroupant les flavones et flavonols. Sur la Figure 10 sont représentés des exemples de molécules appartenant à ce groupe de flavonoïdes.

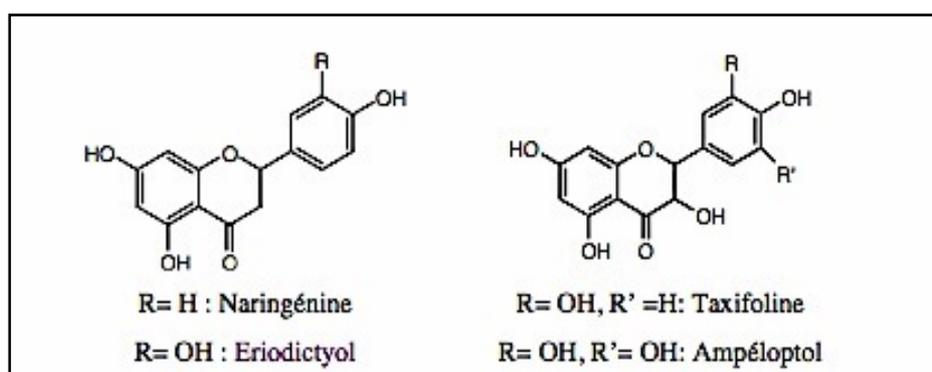


Figure 10 : Structure chimique des flavanones et flavanonols

c. Les flavanols

Les flavanols sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composés vont des simples monomères (+)-catéchine et son isomère (-)-épicatéchine, jusqu'aux oligomères et polymères de proanthocyanidines (Figure 11). Les flavanols présentent un hétérocycle C

saturé auquel s'ajoute une fonction hydroxyle en C3. La présence de deux centres chiraux en C2 et C3 donne 4 isomères potentiels pour chaque niveau d'hydroxylation du cycle B. Dans les végétaux, les monomères principaux sont la (+)-catéchine et son isomère l'(-) épicatechine. Ces monomères peuvent être hydroxylés en C4' et former la (+)-gallocatechine et l'(-) épigallocatechine.

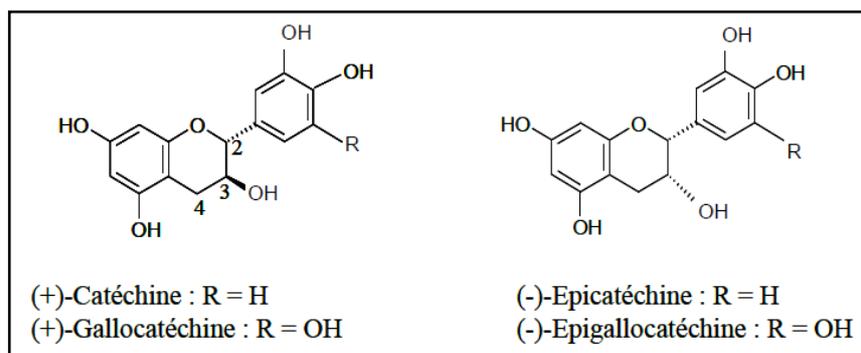


Figure 11: Structure chimique des flavanols.

d. Les anthocyanes

Ce sont des pigments rouges en milieu acide, virant au bleu en milieu alcalin; ils sont très répandus dans les fleurs et les fruits. Les anthocyanes sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatiques conjugués (Figure 12) d'où l'absorption de lumière visible (Brouillard, 1986).

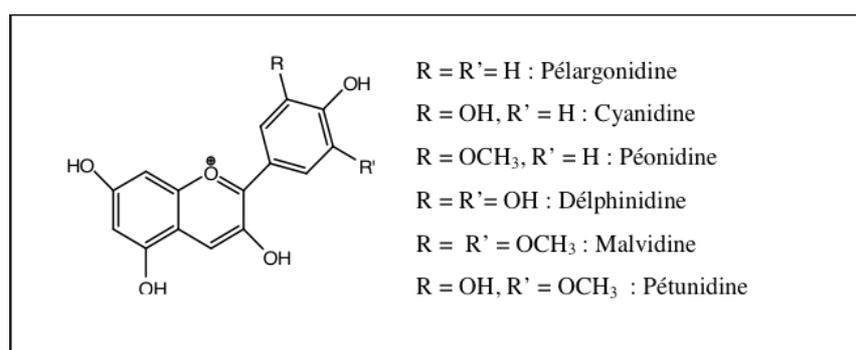


Figure 12 : Structure chimique des anthocyanes

II.2.4. Les lignanes

Les lignanes sont formés par la dimérisation oxydative de deux unités de phénylpropane (Figure 13). Les lignanes sont métabolisés par la flore colique libérant de l'entérodiol et de l'entérolactone; ils sont ainsi considérés comme des phytoestrogènes. Même si leur quantité reste relativement faible dans une alimentation standard, leur ubiquité dans le règne végétal laisse penser qu'ils pourraient constituer une source importante de phytoestrogènes en particulier dans les régimes végétariens.

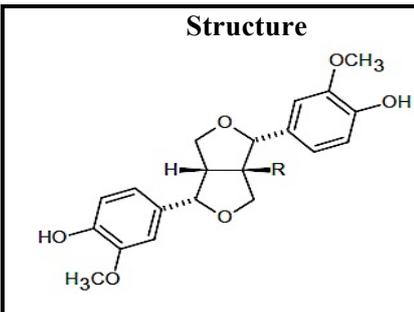
Structure	Composés	R
	(+)-Pinoresinol	H
	(+)-1-Acetoxypinoresinol	OCOCH ₃
	(+)-1-Hydroxypinoresinol	OH

Figure 13. Structure des lignanes

II.2.5. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C₆-C₂-C₆, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para (Figure 14). Ils sont synthétisés à partir de dérivés d'acides cinnamiques dont la substitution déterminera celle du cycle B et ainsi la molécule elle-même. Ils sont présents dans la plante sous forme de monomères, dimères, trimères ou polymères. La molécule la plus courante et la plus étudiée est le resvératrol (3,5,4'- trihydroxystilbène) qui existe sous forme cis ou trans. Cependant, la forme trans est majoritaire.

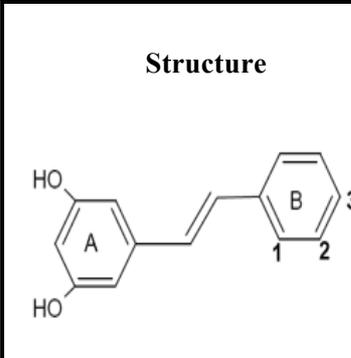
Structure	Composés	1	2	3	Acide phénolique précurseur
	Pinosylvine	H	H	H	Acide cinnamique
	Resvératrol	H	H	OH	Acide p-coumarique
	Picéatannol	H	OH	OH	Acide caféique
	Rhapontigénine	H	OH	OCH ₃	Acide isoférulique

Figure 14 : Structure des stilbènes.

II.2.7. Polyphénols sous forme de polymères

a. Les tanins

Ils représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse et concise car il n'y a pas de structure chimique de base. Leurs structures chimiques sont en effet variées et rassemblées en famille en fonction d'activités communes (Haslam, 1996).

De se fait, toute classification chimique des tanins est forcément arbitraire. Cependant, on se réfère souvent à une distinction entre tanins hydrolysables et tanins condensés.

- Tanins hydrolysables : ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou une de ses dérivés (acide éllagique, chébulique ou valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.
- Tanins condensés : ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines). Ils sont aussi désignés sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides.

b. Les lignines

Ces composés de haut poids moléculaire contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémi-cellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation (copolymérisation) de trois alcools phénylpropéniques.

II.3. Propriétés chimiques des polyphénols

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques (Dangles, 2006), particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (-M) et substituants à effet mésomère donneur d'électron (+M). La conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome O avec le cycle traduit l'effet (+M) du groupe OH. Ce phénomène augmente la délocalisation électronique et produit une charge négative partielle sur les atomes C2, C4, C6. L'effet (+M) peut être représenté par quatre formes mésomères (Figure 15).

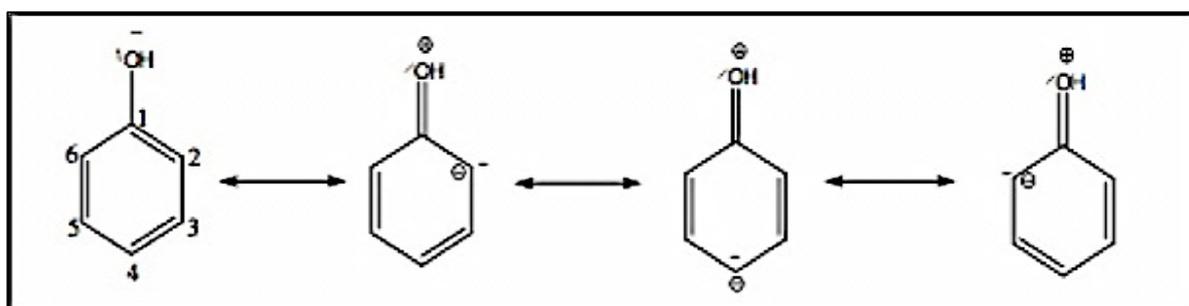


Figure 15 : Formes mésomère du phénol

Ces caractères de base sont à l'origine des différentes caractéristiques physico-chimiques des polyphénols, parmi lesquelles on trouve : les liaisons hydrogène, la polarisabilité et le potentiel réducteur. En fait, les propriétés chimiques des polyphénols sont basées sur les réactions de transfert d'atome H et/ou d'électrons avec conversion d'un radical très réactif en radical aryloxy stabilisé par résonance (Nkhili, 2009). Ces réactions sont l'un des principaux mécanismes d'actions antioxydantes des phénols. En effet, les phénols sont des donneurs de liaison hydrogène (liaison H) en raison du caractère acide du proton du groupe OH. Ce sont aussi des accepteurs de liaison H. Ces propriétés peuvent s'exprimer différemment selon la complexité de la molécule concernée et le nombre de groupements hydroxyle portés par chacun des cycles benzéniques. Par ailleurs, tous les composés phénoliques absorbent en UV et certains d'entre eux absorbent également dans le visible et participent ainsi à la coloration des organes végétaux. Ils sont facilement oxydables et, le cas échéant, forment des polymères bruns à noirs. Une autre propriété importante est leur capacité à former des chélates avec les métaux, ce sont de bons chélateurs des ions métalliques (Hider et al. 2001).

II.4. Importance des polyphénols dans les plantes

Les composés phénoliques qui se produisent souvent dans le monde des plantes ont attiré l'attention des chercheurs au cours des dernières années. Les recherches sur leurs effets santé ont cependant débuté beaucoup plus tardivement que pour les autres antioxydants. Ceci peut être expliqué par la très grande diversité de leurs structures chimiques. Certains d'entre eux jouent un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Ils sont présents dans les fruits, les fleurs, les feuilles, les racines et les parties ligneuses des plantes, tandis que les tissus externes comprennent de plus grandes quantités de ces composants (Manach et al. 2004, Oszmianski 2007). Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la qualité organoleptique et la contribution de couleur de nombreux végétaux, parmi les plus importants: les anthocyanes responsables de la couleur des fruits rouges (cerise, cassis, fraise, etc.), les tanins responsables de l'astringence de divers fruits (pellicule et pépins du raisin, chair du kaki, etc.), les flavanones responsables de l'amertume du pamplemousse et également abondants dans l'orange. Pour les légumes, on peut citer l'oignon riche en flavonols (quercétine) (Scalbert, 2003).

II.5. Rôle nutritionnelle des polyphénols

Les polyphénols possèdent comme la vitamine C, la vitamine E ou les caroténoïdes, des propriétés antioxydantes. Ils en diffèrent néanmoins par l'importance des apports associés au régime estimé à un gramme par jour, et par leur très grande diversité structurale. Plusieurs centaines de molécules ont été identifiées dans les aliments qui sont principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques (Scalbert, 2003). La biodisponibilité des polyphénols a un effet sur la capacité antioxydante des tissus. En effet, le pouvoir antioxydant *in vitro* de nombreux polyphénols est supérieur à celui de la vitamine C et de la vitamine E. S'ils étaient absorbés comme ces vitamines et non métabolisés, leur impact antioxydant serait considérable. Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des polyphénols est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé. Leur absorption est excessivement variable (Scalbert, 2003). Aujourd'hui, le rôle des polyphénols dans la prévention de diverses maladies dégénératives liées aux phénomènes d'oxydation (stress oxydatif) fait l'objet de très nombreuses études (Scalbert et al. 2005, Robinson, 2001).

II.5.1. Le stress oxydant

De nombreuses maladies dégénératives sont liées à des phénomènes d'oxydation causés par des radicaux libres (radical superoxyde, anion peroxyde, radical hydroxyle). Ces "Espèces Oxygénées Réactives" (EOR) produites par la respiration cellulaire, sont également générées lors des réactions immunitaires et sous l'effet d'oxydants environnementaux, comme le tabac, l'exposition prolongée au soleil et la pollution. Ces EOR sont beaucoup à craindre car ils s'attaquent aux composés vitaux des cellules (lipides, protéines, ADN). Pour s'en protéger, l'organisme dispose de moyens de défense. Les uns sont d'origine endogène, comme les enzymes, d'autres sont apportés par l'alimentation (caroténoïdes, vitamines C et E, sélénium,...) (Gibault, 2000). Cependant, ces EOR sont susceptibles de surpasser nos défenses antioxydantes naturelles en provoquant des dégâts cellulaires considérables. C'est le stress oxydant. Ce dernier peut être d'origine accidentelle comme des inflammations, l'exposition à des radiations et les xénobiotiques pro-oxydants, ou génétique. De manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défenses (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule. L'exposition chronique au stress oxydant peut ainsi favoriser l'apparition des cancers et des maladies cardiovasculaires.

II.5.2. Les polyphénols comme antioxydants

En tant qu'antioxydants, tous les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement. Ingérés avec nos aliments, ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromolécules) contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les diverses maladies chroniques associées, telles que les cancers, maladies cardio-vasculaires ou ostéoporose. Ils ont aussi des propriétés spécifiques (affinité pour des récepteurs cellulaires comme les récepteurs des estrogènes) qui induisent des réponses cellulaires très diverses. L'intérêt porté aux antioxydants naturels ne cesse de croître, et les publications sur les composés naturels aux propriétés antioxydantes sont de plus en plus disponibles dans la littérature scientifique. Les principaux mécanismes d'activité antioxydante selon lesquels les polyphénols peuvent réagir (Halliwell, 1990) sont:

II.5.2.1. Le piégeage des radicaux libres

Grâce à leur faible potentiel redox (Jovanovic et al. 1994), les polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes, sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes ($O_2\cdot$), peroxydes ($ROO\cdot$), alkoxydes ($RO\cdot$) et hydroxyle par transfert d'hydrogène. Ainsi, les antioxydants les plus efficaces sont ceux qui ont les énergies de liaison les plus faibles au niveau du groupe donneur d'hydrogène. L'efficacité des antioxydants phénoliques est due en particulier à la stabilisation des radicaux phénoxyliques par la délocalisation des électrons autour du cycle aromatique. L'efficacité d'un composé phénolique dépend également du nombre de fonction OH à hydrogène labile (Yaacoub et al. 2009). La figure 16 montre une stabilisation d'un radical ($ROO\cdot$) par un phénol qui est l'hydroxytyrosol.

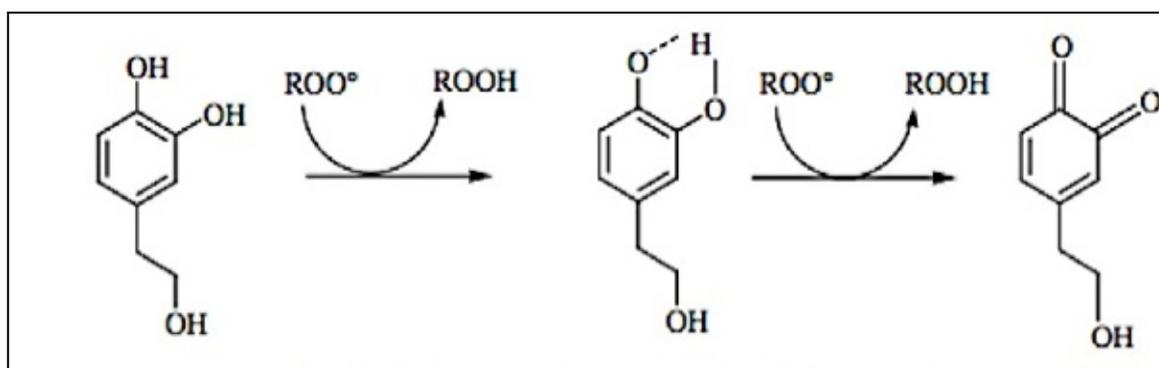


Figure 16 : Stabilisation des radicaux libres par l'hydroxytyrosol

II.5.2.2. L'inhibition enzymatique dans le stress oxydatif

L'inhibition de la production des EOR par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des EOR (Dangles & Dufour, 2008). Cette double action est bien illustrée par le cas de la xanthine oxydase (ou XO), cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde en produisant l'acide urique par une réaction oxydoréductase. Pour exemple, les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent prévenir la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (Hanasaki et al. 1994).

II.6. Les composés phénoliques des grignons et des margines

Malgré leur profil polluant, les sous produits d'huile d'olive sont considérés comme une source riche en antioxydants naturels, les polyphénols. Bien que des systèmes centrifuges à deux phases donnent des huiles d'olive vierges avec une concentration en composés phénoliques supérieures à celles obtenues en utilisant des systèmes à trois phases, la majorité d'entre eux (environ 98%) reste toujours emprisonnée dans les sous produits (Vierhuis et al. 2001; Lesage-Meessen et al. 2001). Les principales familles de composés phénoliques des grignons et des margines d'olive identifiées par de nombreux auteurs sont les phénols simples (ou phényles alcools), les acides phénoliques, les flavonoïdes, les dérivés sécoïridoïdes (ou phénols glycosides) et les lignanes (Tableau 5) (Dermeche et al. 2013 ; Serra et al. 2012; Obied et al. 2005; Aranda et al. 2007; Suarez et al. 2009; Suarez et al. 2010). La concentration de ces composés dans les sous-produits d'huile est variable, elle dépend essentiellement de la polarité, ce qui influe leur répartition dans les margines et les grignons. La majeure partie de ces composés migrent de la pulpe d'olive (grignons) vers la phase aqueuse (margines) (Graille, 2003). La composition phénolique dans les margines est de l'ordre de 2 à 15 % de la fraction organique ce qui correspond à une concentration de 10 g/l (Noubih et al. 2007) alors qu'elle ne dépasse pas les 2 % dans les grignons (Dermeche et al. 2013).

En générale, la composition phénoliques des grignons et des margines varie à la fois qualitativement et quantitativement en fonction de plusieurs paramètres à savoir la variété d'olives, les conditions climatiques et géographiques, les pratiques agronomiques, et la maturité et la durée de stockage des olives avant trituration (Obied et al. 2005; Dermeche et al. 2013 ; Piperidou et al. 2000). Les procédés d'extraction d'huile et de traitement de ses sous-produits ont également un impact significatif sur la teneur en composés phénoliques des margines et des grignons (Obied et al. 2007; Allouche et al. 2004).

Ce phénomène pourrait expliquer la détection de certains composés phénoliques uniquement dans les grignons ou dans les margines (Tableau 5).

Tableau 5 : Principales familles de composés phénoliques identifiés dans les extraits des grignons et des margines

Composés phénoliques	Margines	Grignons	Références
Les phénols simples (ou phényles alcools)			
Tyrosol	+	+	Suarez et al. 2009, Bertin et al. 2011
Hydroxytyrosol	+	+	Obied et al. 2007, Dermeche et al. 2013.
Les acides phénoliques			
Acide p-coumarique	+	+	Bertin et al. 2011, Juarez et al. 2008.
Acide caféique	+	+	De Marco et al. 2007.
Acide férulique	+	+	Obied et al. 2007, Allouche et al. 2004.
Acide vanillique	+	+	Dermeche et al. 2013.
Acide sinapique	+	+	Suarez et al. 2009.
Les dérivés sécoïridoïdes			
Oleuropéine	+	+	Obied et al. 2005, Dermeche et al. 2013.
Hydroxytyrosol glucoside	-	+	Obied et al. 2007, Romero et al. 2002.
Acide élénolique	-	+	Ramos et al. 2013, Cardoso et al. 2005.
Ligstroside	+	+	Aranda et al. 2007, Suarez et al. 2009.
Verbascoside	+	+	De Marco et al. 2007, Aranda et al. 2007.
Flavonoïdes			
Lutéoline	+	+	Dermeche et al. 2013, Obied et al. 2007.
Lutéoline-7-rutinoside	-	+	De Marco et al. 2007, Obied et al. 2005.
Lutéoline-7-glucoside	+	+	Cardoso et al. 2005, Suarez et al. 2009, Aranda et al. 2007.
Apigénine	-	+	Suarez et al. 2009, Dermeche et al. 2013.
Apigénine-7- rutinoside	-	+	Obied et al. 2005.
Apigénine-7-glucoside	-	+	Suarez et al. 2009, Obied et al. 2005.
Rutine	+	+	Obied et al. 2007, Dermeche et al. 2013.
Quercétine	+	+	Cardoso et al. 2005, Dermeche et al. 2013.
Lignanes			
Pinoresinol	+	+	Suarez et al. 2009, Obied et al. 2005.
1-Acetoxypinoresinol	+	+	Suarez et al. 2009, Obied et al. 2005.

II.7. Caractérisation des composés phénoliques des grignons et des margines

II.7.1. Extractions des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols est un procédé assez difficile et compliqué pour deux raisons principales; d'une part, les structures des composés phénoliques sont très variables, ils peuvent se produire dans les tissus végétaux combinés avec des sucres, des protéines comme ils peuvent créer des produits dérivés polymérisés avec de longues chaînes. D'autre part, les polyphénols sont sensibles à l'oxydation, un environnement alcalin à haute température provoque leur dégradation (Druzynska et al. 2007). Ainsi, l'addition d'un inhibiteur ou d'une enzyme antioxydante et/ou l'ajustement du pH sont fortement recommandés (Obied et al. 2005). Le but de l'extraction est généralement de récupérer quantitativement tous les composés phénoliques de l'échantillon, tout en minimisant la co-extraction de composants de la matrice (Waterman et Mole, 1994). Le problème avec l'extraction phénolique est que certains des biophénols restent attachés à la paroi cellulaire tandis que d'autres sont dans les vacuoles cytoplasmiques. Les méthodes d'extraction présentent une grande diversité, allant de simple filtration (Romero et al. 2002) à des méthodes plus avancées et complexes (Visioli et al. 1999). Plusieurs techniques ont été utilisées pour extraire les composés phénoliques des sous-produits d'huile d'olive à savoir la préparation enzymatique, l'extraction par solvant, la séparation membranaire, la centrifugation, et les procédures chromatographiques. (Dermeche et al. 2013 ; Khoufi et al. 2011). L'extraction par solvant est la technique la plus couramment utilisée pour extraire les composés phénoliques des grignons et des margines. Une vaste gamme de solvants a été utilisée pour l'extraction de biophénols des margines et des grignons à savoir l'eau (Servili et al. 1999), le méthanol (Cardoso et al. 2005), l'éthanol (Amro et al. 2002), l'acétate d'éthyle (Lesage-Meessen et al. 2001) et très rarement, le n-butanol (Capasso et al. 1992), et le tert-butyle-méthyle éther (Bianco et al. 2003). Les solvants souvent utilisés sont l'eau, l'acétate d'éthyle, l'éthanol, le méthanol et l'acétone (Shahidi & Naczki 2004; Obied et al. 2005). Des solutions hydro-alcooliques, tels que des mélanges de méthanol ou d'éthanol et l'eau peuvent aussi être proposées (Romero et al. 2002). Les solutions éthanoliques et méthanoliques sont généralement utilisées de la même fréquence pour l'extraction des composés phénoliques des grignons. L'avantage de méthanol vis à vis de l'éthanol est son point d'ébullition inférieur, il peut être facilement évaporé sous vide à une température modérée pour faciliter la récupération des biophénols extraits. Cependant, l'éthanol est plus lipophile que le méthanol, il est donc plus efficace pour le traitement des biophénols polymères et hydrophobes.

L'acétate d'éthyle est souvent utilisé pour extraire les biophénols de matrices aqueuses telles que les margines. Cependant, l'extraction à l'acétate d'éthyle peut entraîner la perte de certains biophénols glycosides (Romero et al. 2002). Toutefois, l'acétate d'éthyle est le solvant le plus efficace pour le traitement des margines dans des conditions acides (Allouche et al. 2004 ; Lesage-Meessen et al. 2001) tandis que l'éthanol, le méthanol et l'eau sont les solvants les plus appropriés pour l'extraction des polyphénols des grignons (Romero et al. 2002).

II.7.1.1. Les conditions d'extraction des polyphénols, facteurs d'influence

Les principaux facteurs d'influence sur la teneur en polyphénols dans les extraits des grignons et des margines (Alu'Datt et al. 2010 ; Obied et al. 2005) sont :

- **Le temps**

Le temps d'extraction agit positivement sur la teneur en composés phénoliques totaux des sous produits d'huile, plus la durée d'extraction est longue, plus la récupération d'un maximum de composés est assurée (Alu'Datt et al. 2010).

- **La température**

La concentration en composés phénoliques augmente dans l'extrait en augmentant la température en raison de la haute solubilité des composés phénoliques à des températures élevées, mais elles ne doivent pas dépasser une certaine limite à cause de la dégradation des polyphénols à fortes températures (Alu'Datt et al. 2010).

- **Le nombre de cycles**

La teneur en polyphénols varie significativement en variant le nombre de cycles d'extraction. Ce dernier doit être choisi avec soins pour avoir un nombre optimal en vue de préserver les propriétés des composés extraits (Shahidi et Naczki, 2004).

- **Le solvant**

Le choix du solvant a aussi une grande influence sur l'extraction des polyphénols des grignons et des margines. Ce choix est relatif à la nature du matériel végétal objet de l'extraction et de ses propriétés physico-chimiques ainsi qu'aux méthodes d'analyse utilisées par la suite.

L'optimisation des conditions d'extraction est une étape critique et doit faire l'objet d'une grande vigilance pour une meilleure récupération des composés phénoliques (Tura et Robards 2002 ; Robards, 2003) afin de préserver leurs caractéristiques structurales et biologiques.

II.7.2. Dosage des composés phénoliques

II.7.2.1. Dosage global par colorimétrie

La méthode de Folin-Ciocalteu (FC) est la méthode de dosage la plus utilisée des composés phénoliques présents dans un extrait végétal. Elle consiste en la mesure spectrophotométrique de l'absorbance de la réduction de la coloration bleue, du complexe de phosphotungstique--phosphomolybdique, résultante du caractère réducteur des composés phénoliques (Waterman et Mole, 1994). Cette méthode est très sensible mais peu spécifique car d'autres composés réducteurs peuvent interférer. Par différence, il est possible d'avoir une bonne approximation de la teneur de l'extrait en polyphénols exprimée par rapport un composé de référence (acide gallique, en acide caféique, en acide tannique ou des équivalents de tyrosol).

II.7.2.2. Dosage par chromatographie

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est aussi souvent utilisée pour la détermination de la teneur en polyphénols totaux. Elle est basée sur la somme des réponses des pics individuels (Mulinacacci et al. 2001) en utilisant les courbes d'étalonnage, les standards disponibles, et les différentes longueurs d'ondes. La complexité du chromatogramme HPLC et le nombre de pics qui se chevauchent sont les principaux facteurs qui limitent la fiabilité de cette technique pour la quantification des polyphénols totaux (Visioli et al. 2001). Néanmoins, cette approche est recommandée comme une alternative aux méthodes spectro-photométriques fréquemment rapportées. La LC-MS est très utile, en particulier si elle est utilisée en mode tandem comme LC-MS-MS (Visioli et al. 2002 ; Bianco et al. 2003) qui permet de quantifier les ions produits et de minimiser l'impact des pics qui se chevauchent.

Les biophénols d'olive sont des composés polaires et de volatilité limitée (Ryan et al. 1998), ainsi la chromatographie en phase gazeuse (GC) peut aussi être utilisée dans la quantification des polyphénols totaux en particulier pour la part des sucres des phénols glycosides en particulier des margines. La plupart des travaux récents de la GC sont effectués en utilisant les détecteurs de spectres de masse ou la spectrométrie de masse (GC-MS-MS) (Della Greca et al. 2004).

II.7.2.3. Dosage par spectrophotométrie

Les composés phénoliques végétaux peuvent absorber dans l'UV et certains d'entre eux absorbent dans le visible. Le spectre d'absorption résulte de la présence combinée du (ou des) cycle(s) benzénique, des fonctions hydroxyles et des différentes doubles liaisons présentes dans la molécule. Ainsi, le dosage des composés phénoliques utilise fréquemment leur spectre d'absorption, soit dans le visible pour les anthocyanes soit dans l'UV pour les autres composés en choisissant pour chacun d'eux la longueur d'onde d'absorption optimale.

II.7.3. Identification des composés phénoliques

L'identification des composés phénoliques des grignons et des margines d'olive est le plus souvent réalisée par la HPLC, elle est considérée comme la méthode standard pour l'analyse des polyphénols. Néanmoins, le choix de la longueur d'onde a souvent été un problème potentiel, mais l'utilisation de détecteurs PDA a résolu le problème par le fait de trouver une longueur d'onde adaptée à l'ensemble des phénols (Obied et al. 2005). Les composés à identifier sont repérés à la sortie de colonne par leur absorption en lumière visible pour certains composés phénoliques ou en UV pour d'autres, ils apparaissent ainsi sur des pics sur les chromatogrammes.

L'association de la HPLC à la spectrométrie de masse et l'ionisation Electrospray (ESI-MS) est souvent appliquée aux extraits des grignons et des margines pour l'identification des polyphénols et leurs ions produits. En effet, Bianco et al. (2003) ont montré une grande sélectivité de la HPLC-MS-MS pour les extraits des margines.

II.8. Utilisation des polyphénols extraits des grignons et des margines, alternatives phytothérapeutiques

De nombreuses études ont porté sur les propriétés biologiques des composés phénoliques extraits des margines et des grignons d'olive (Lafka et al. 2011, Capasso et al. 1995). Ces résidus peuvent être considérés comme une source potentiellement riche en composés phénoliques avec un large éventail d'activités biologiques (Obied et al. 2005). Les polyphénols, notamment les flavonoïdes, les phénols simples et les acides phénoliques possèdent un potentiel prometteur comme agents bioactifs notamment leur pouvoir : antimicrobien, antioxydant, anti-inflammatoire, et anticancéreux (Cardoso et al. 2005, De La Puerta et al. 1999, Giovannini et al. 1999, Piette, 2000). Néanmoins, l'hétérogénéité qualitative et quantitative des composés phénoliques dans ces sous-produits est souvent une difficulté, en termes de trouver des applications possibles dans ce domaine. Ainsi, la valorisation de ces composés phénoliques pour leur utilisation comme agents bioactifs implique leur fractionnement et/ou leur purification afin d'éviter certains effets antagonistes et, surtout, de contrôler leur concentration. Les propriétés biologiques de ces polyphénols sont essentiellement évaluées *in vitro* et découlent de leur activité réductrice et de leur affinité pour une grande variété de protéines.

II.8.1. Activité Antioxydante

L'activité la plus étudiée des biophénols d'huile d'olive et ses sous produits est leur action antioxydante (Ranalli et al. 2003, Obied et al. 2005). En effet, l'activité antioxydante des margines et des grignons d'olive a été largement étudiée et démontrée par plusieurs tests antioxydants en particulier le test anti-radicalaire au DPPH, test de blanchissement au β -carotène BCBT. Il a été démontré que les acides phénoliques (acide férulique, caféique et cinnamique), les flavonoïdes (lutéoline, quercétine) et les phénols glycosides ou les sécoïridoïdes (notamment l'oleuropéine et ses dérivées), sont des antioxydants puissants (Obied et al. 2007 ; Amro et al. 2002 ; Leasage-Meessen et al. 2001; Alonso et al. 2000 ; Casa et al. 2003 ; McDonald et al. 2001). L'évaluation de l'activité antioxydante est un processus assez complexe et dépend de plusieurs variables (Frankel and Meyer 2000). Ainsi, la méthode d'essai et la composition chimique sont les principaux facteurs déterminants de l'activité antioxydante (Obied et al. 2007 ; Amro et al. 2002). En outre, l'indice relatif au % de l'activité anti-radicalaire montre la capacité de l'échantillon, à une concentration fixée, à réduire ou non les radicaux et dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène l'augmentation de ces indices relatifs (Sanchez-Moreno et al. 1998).

II.8.2. Activité antibactérienne

Selon Cowan, (1999), les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes possédants des modes d'action diverses et des activités inhibitrices vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes. Les polyphénols, tels que les flavonoïdes comme, la catéchine, la quercétine, (Shan et al. 2007) et lutéoline (Askun et al. 2009) sont des substances antibactériennes importantes en particulier contre les bactéries à gram positif. Diverses activités antimicrobiennes ont été signalées également pour l'acide caféique (Aziz et al. 1998), le verbascoside (Didry et al. 1999), l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol (Obied et al. 2007; Medina et al. 2007; Bisignano et al. 1999). L'activité antimicrobienne des composés phénoliques des sous-produits d'huile d'olive a été confirmée par Ramos-Cormenzana et al. (1996) et Gonzalez et al. (1990) avant d'être complètement revue par Moreno et al. (1989) qui ont rapporté que l'activité antimicrobienne est due essentiellement aux polyphénols à faibles masses moléculaires notamment les phénols simples et les acides phénoliques. Les extraits des grignons et des margines présentent un large spectre de toxicité contre les bactéries et les champignons (Capasso et al. 1995 ; Obied et al. 2007). Ainsi, Obied et al. (2007) ont rapporté que la fraction phénolique des grignons a démontré une activité antibactérienne contre plusieurs espèces de bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Cette activité a été souvent liée au contenu phénolique des extraits (Niaounakis & Halvadakis, 2004). Les constituants des extraits des sous produits d'huile sont souvent plus efficaces sur les bactéries à Gram positif que sur celles à Gram-négatif (Moreno et al. 1989). Les composés identifiés dans les sous produits d'huile qui ont une activité antibactérienne importante sont : l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol (Bisignano et al. 1999), l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, et l'acide p-coumarique (Soler-Rivas et al. 2000). L'hydroxytyrosol est généralement plus actif que l'oleuropéine (Bisignano et al. 1999). Capasso et al. (1995) ont étudié l'activité antibactérienne des margines et avaient montré que le 4-méthylcatéchol était le composé bactéricide le plus efficace suivi de l'hydroxytyrosol. L'activité antibactérienne des polyphénols extraits des grignons et des margines avait aussi été testée contre les souches pathogènes humaines (Bisignano et al. 1999; Aziz et al. 1998).

II.8.3. Activité anti-inflammatoire

Les propriétés anti-inflammatoires des margines ont été mesurées à l'aide de multiples dosages, en particulier, la production de leucotriènes B4 par les neutrophiles humains et l'inhibition de la production du facteur de nécrose tumorale (Visioli et al. 1999 ; Bitler et al.

2005). Des travaux récents ont montré que l'acide élénolique (dérivé de l'oleuropéine) et des dérivés de l'acide cinnamique possèdent d'excellentes propriétés anti-inflammatoires tandis que les polymères de poids moléculaire élevé n'ont montré aucune activité. Le tyrosol, l'hydroxytyrosol et ses dérivés possèdent également un pouvoir anti-inflammatoire assez convainquant (Obied et al. 2005). Ces extraits phénoliques peuvent agir comme des chélateurs de métaux.

II.8.4. Activité antitumorale

Les polyphénols seraient impliqués dans la prévention des cancers. Ils sont capables de limiter le développement des tumeurs induites expérimentalement par exposition à des agents carcinogènes. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie, etc.) à tous les stades de la cancérogenèse. Au stade d'initiation, ils agissent comme agents bloquants en empêchant l'activation de procarcinogènes, en piégeant les mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation des ADNs mutés. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agents supprimeurs de tumeurs. D'autre part, des preuves accablantes indiquent que les EOR sont impliqués à la fois dans l'initiation et la progression de cancer (Waris et Ahsan, 2006). En ce sens, les propriétés chimio-préventives des antioxydants comme les polyphénols sont généralement considérées comme étant dues à leur capacité à piéger les EOR endogènes (Qian et al. 2009). En outre, le stress oxydatif pourrait conduire à une augmentation des dommages oxydatifs de l'ADN qui peut être causée soit par une surproduction de radicaux libres et les EOR soit par une atteinte du système antioxydant endogène.

Les mécanismes d'action des polyphénols impliqués peuvent être très variés : prévention du stress oxydant, inhibition de la protéine kinase C et de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose, et inhibition de l'angiogenèse (Scalbert, 2003). Par ailleurs, les polyphénols d'huile d'olive et des grignons ont montré un effet antiprolifératif important contre les cellules tumorales (Menendez et al. 2008, Ramos et al. 2013). En outre, les polyphénols des extraits de margines ont manifesté une cyto-protection des cellules du cerveau due à l'action antioxydante prouvée de l'hydroxytyrosol (Schaffer et al. 2010). D'autres études récentes ont mis en évidence la relation entre la consommation des lignanes et la réduction du risque du cancer du sein post-ménopausique (Velentzis et al. 2009). Néanmoins, d'autres études sont encore nécessaires pour confirmer ces résultats.

II.8.5. Autres activités biologiques

Les polyphénols des margines et des grignons d'olive sont dotés également d'un certain nombre d'autres pouvoirs thérapeutiques. Il s'agit notamment de : l'activité antivirale (Lee Huang et al. 2003 ; Soler-Rivas et al. 2000), l'activité molluscicide (Kubo & Hanke, 1985), l'activité phytotoxique (Cappasso et al. 1992 ; Alliota et al. 2002), l'inhibition enzymatique (inhibition de la trypsine, lipase, glycérol déhydrogénase, et la glycérokinase) (Visioli et al. 2002 ; Polzoneti et al. 2004), l'effet chimio-préventif (inhibition de l'oxydation de l'ADN) (Quiles et al. 2002), et l'activité anti-athérogénique (inhibition de l'oxydation LDL) (Meyer et al. 1998). Parmi les biophénols des grignons et des margines, l'hydroxytyrosol est le plus actif et le plus exhaustivement étudié en raison de sa présence dans pratiquement tous les sous-produits d'huile et aussi pour ses activités biologiques de qualité supérieure et diverses (Obied et al. 2005). Ainsi, l'hydroxytyrosol peut avoir de multiples applications prometteuses dans les domaines du cosmétique et de la médecine. De nombreuses études sont concentrées sur les méthodes de sa récupération et ses éventuelles applications (Fernandez-Bolanos et al. 2002, Crea, 2002). En outre, les polyphénols pourraient limiter les maladies cardio-vasculaires et aussi exercer des effets protecteurs contre les maladies hormono-dépendantes telle que l'ostéoporose (Scalbert, 2003).

Ces données sont, cependant, encore insuffisantes pour apporter les preuves définitives de leurs effets protecteurs chez l'homme. En attendant, il est important de ne pas encourager une consommation excessive de polyphénols. Une telle surconsommation, rendue possible par la commercialisation de suppléments nutritionnels, pourrait avoir des effets toxiques (Scalbert, 2003).

III. Le cancer : Epidémiologie, Mécanisme et Traitement

Le cancer a longtemps été considéré comme une maladie de civilisation, touchant la population âgée et essentiellement liée au mode de vie des individus. Ce n'est plus le cas aujourd'hui puisqu'il s'est avéré que le cancer est une pandémie mondiale, n'épargnant aucun pays.

III.1. Epidémiologie du cancer

Les estimations pour l'année 2012 chiffrent l'incidence dans le monde à 14 millions de nouveaux cas avec 8,2 millions de décès liés au cancer (Ferlay, 2013). Aussi bien pour l'incidence que pour la mortalité, plus que la moitié des décès surviennent dans les pays moins industrialisés ou pays du sud (Ferlay et al. 2010; Parkin et al. 2005). Il existe pour tous les cancers de nettes variations géographiques qui diffèrent selon les sites de tumeur. Les cartographies des taux d'incidence standardisés pour l'âge sur la structure de la population mondiale (Fig. 17) montrent que pour tous les cancers pris dans leur ensemble, les taux les plus élevés sont en Europe, Amérique du Nord et Australie (Parkin et al. 2001). La même répartition peut être attribuée à la plupart des cancers comme les cancers du poumon ou du côlon, mais surtout les cancers hormono-dépendants (sein, endomètre, ovaire, prostate, testicule). Ceci est en accord avec la considération que le cancer est une maladie liée au «développement». Néanmoins, la répartition géographique des cancers liés à des agents biologiques comme des virus (virus du papillome humain et cancer du col utérin, virus des hépatites B et C et cancer du foie, virus d'Epstein-Barr et cancer du nasopharynx ou lymphome de Burkitt), des bactéries (*helicobacter pylori* et cancer de l'estomac) ou des parasites (schistosomia et cancer de la vessie, opistorchis viverrini et cholangiocarcinome) montre des taux très élevés dans les pays du Sud, et en particulier en Afrique et en Asie. Le cancer est donc un phénomène mondial et de fait l'a toujours été, même si son importance quantitative varie dans l'espace et dans le temps, en fonction des types histologiques de tumeur (Sasco, 2007).

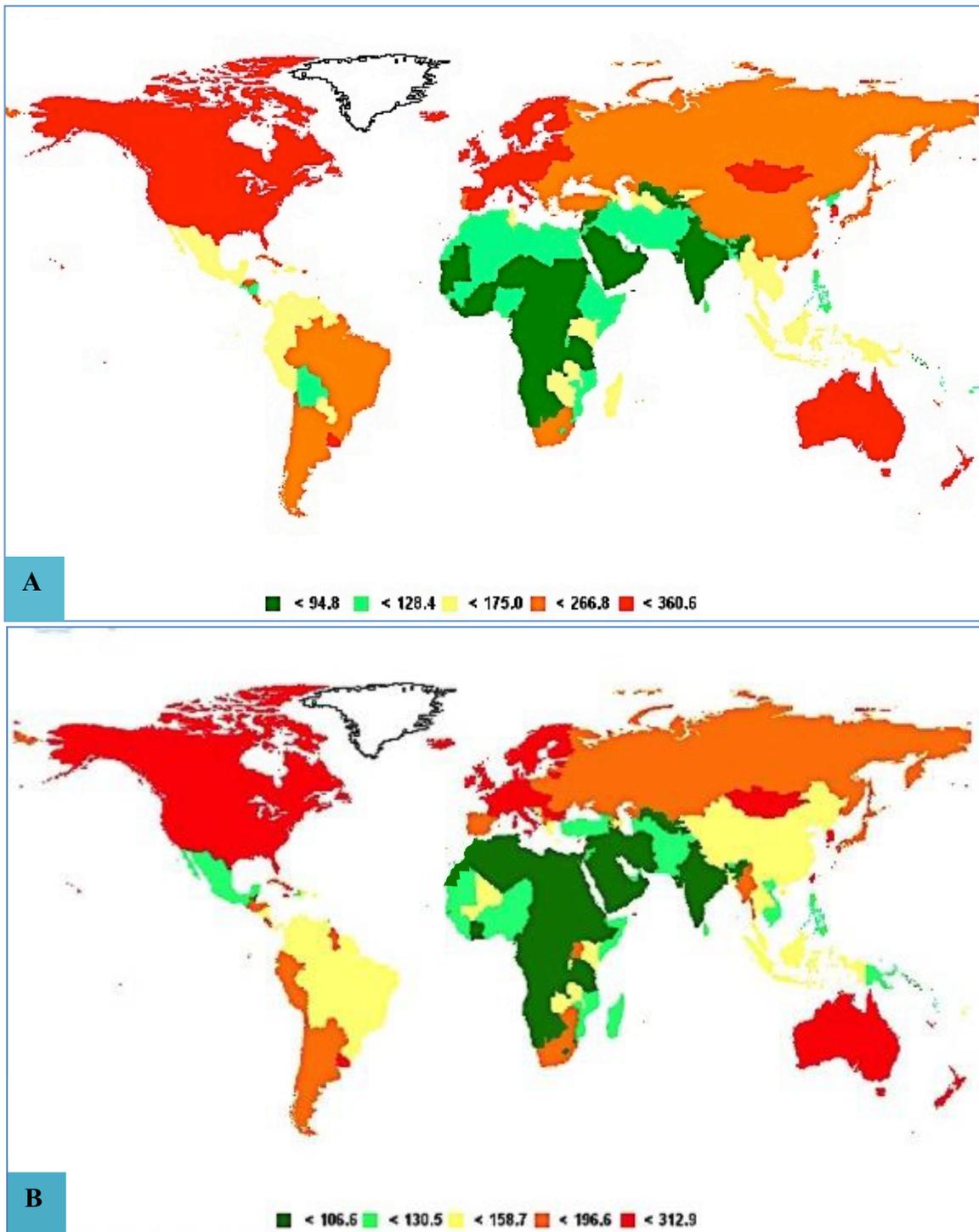


Figure 17 : Incidence de tous les sites de cancers (sauf les cancers cutanés) dans le monde, exprimée en TIS (Taux d'incidence standardisé, sur la population mondiale, exprimé en nombre de nouveaux cas pour 100 000 personnes et par an).

A: chez les hommes et B: chez les femmes (tous âges) (Ferlay et al. 2010).

Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (avec 1,8 million de cas, soit 13,0 % du total), du sein (1,7 million de cas, ou 11,9% du total) et le cancer colorectal (1,4 million de cas, ou 9,7% du total). Les causes les plus fréquentes de décès par cancer étaient les cancers du poumon (1,6 million de décès, 19,4% du total), du foie (0,8 million de décès, 9,1% du total) et de l'estomac (0,7 million de décès, ou 8,8% du total) (OMS, rapport décembre 2012). Le cancer du sein est aussi l'une des principales causes de décès par cancer dans les pays les moins développés. Il est en nette augmentation dans les pays du Maghreb, de l'Afrique du Sud, la Chine ou encore les pays d'Amérique du Sud et latine (Sasco, 2007). L'évolution des modes de vie et le régime d'alimentation dans ces pays est à l'origine de cette augmentation, mais aussi en partie parce que les progrès cliniques enregistrés contre la maladie ne profitent pas aux femmes vivant dans ces régions. La notion d'évolution au fil du temps est délicate à présenter (Sasco, 2003). Le nombre absolu de cas de cancer et de décès par cancer a beaucoup augmenté au cours des 30 dernières années. En 1980, il n'y avait «que» 6 300 000 cas, contre 10 millions en 2000 (Ferlay et al.2010), 11 millions en 2002 (Sasco, 2008) et plus de 14 millions en 2013 (Ferlay, 2013).

Les projections fondées sur les estimations de GLOBOCAN 2012 anticipent une augmentation substantielle de 15,7 millions de nouveaux cas de cancer par an en 2020 et de 19,3 millions d'ici 2025 en raison de la croissance démographique et du vieillissement de la population mondiale. Plus de la moitié de tous les cancers (56,8%) et des décès par cancer (64,9%) en 2012 ont été enregistrés dans les régions les moins développées du monde et ces proportions augmenteront encore d'ici 2025.

III.2. La cancérogenèse : un processus multi-étapes

Le mot « cancer » regroupe, en réalité, plusieurs centaines de maladies très différentes tant sur le plan biologique que sur le plan de leur histoire naturelle et de leur présentation clinique. Le processus de cancérogenèse est un processus complexe faisant intervenir plusieurs acteurs liés à la cellule mais aussi à son environnement. Ce processus est dicté par l'accumulation progressive d'altérations génétiques affectant des facteurs contrôlant la prolifération et la mort cellulaire. Il s'agit d'un phénomène dynamique qui repose sur une succession de phases de sélections et d'expansions clonales, chacune d'entre elles faisant suite à l'acquisition par une cellule d'un avantage de prolifération ou de survie. D'une manière générale, ce processus résulte de la perturbation d'un équilibre précaire entre facteurs d'agression de l'ADN et de la cellule et mécanismes de défense efficace au niveau de la cellule mais aussi de l'individu (Italiano, 2011).

La cancérogénèse repose sur la survenue d'aberrations génétiques successives qui perturbent de façon permanente la prolifération cellulaire. On distingue ainsi quatre étapes:

- **L'initiation:** elle est causée par un agent induisant une lésion définitive de l'ADN (par exemple mutation). Souvent, ces carcinogènes sont activés par réactions métaboliques (cytochrome p450). Exemples: carcinogènes chimiques comme les hydrocarbures polycycliques aromatiques (tabac), les amines aromatiques (colorants, industrie du caoutchouc..), les agents alkylants, l'aflatoxine b1, les virus, les radiations,... Cette étape est principalement influencée par les processus de réparation de l'ADN et de la prolifération cellulaire (Pitot et Loeb, 2002).
- **La promotion:** Elle est caractérisée par une instabilité génomique associée à un déséquilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Tubiana-Mathieu, 2002). Cette étape est généralement induite par un agent favorisant l'expression d'une lésion génétique, préalablement induite par un agent initiateur. Une réduction du temps écoulé entre l'initiation et l'apparition des tumeurs en présence d'agents promoteurs a été démontrée (Italiano, 2012). Exemples: hormones: estrogènes (cancer du sein), nutrition: alcool (tumeurs ORL), graisses alimentaires (cancers coliques), etc. Certains agents comme le tabac sont à la fois initiateur et promoteur: on parle de cancérogène complet.
- **La conversion :** la conversion d'une lésion pré-néoplasique en tumeur cancéreuse est toujours associée à l'accumulation de nouvelles mutations géniques, telles qu'elles sont observées dans les tumeurs cancéreuses avancées. La plus fréquente de ces mutations est celle du gène suppresseur de tumeur p53, observée dans plus de 50 % des cancers humains. De nombreuses autres mutations spécifiques ou non à une variété de tumeurs, sont observées (Soussi et al. 2000).
- **Progression**
Deux principales phases caractérisent cette étape, une phase in situ puis une phase d'invasion où s'enclenche l'ensemble des phénomènes (néo-angiogenèse, invasivité tumorale) (Figure 18) qui feront toute la gravité des processus tumoraux avec l'établissement possible de métastases (DeVita et al. 2008).
L'évolution du processus tumoral peut être résumée comme décrit dans la figure 19.

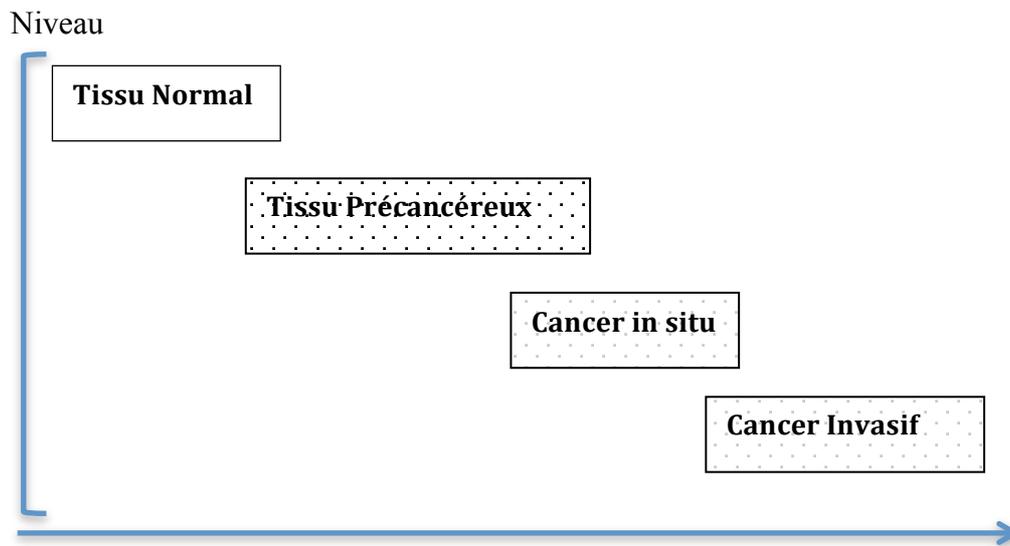


Figure 18: Accumulation d'anomalies génétiques et épi-génétiques

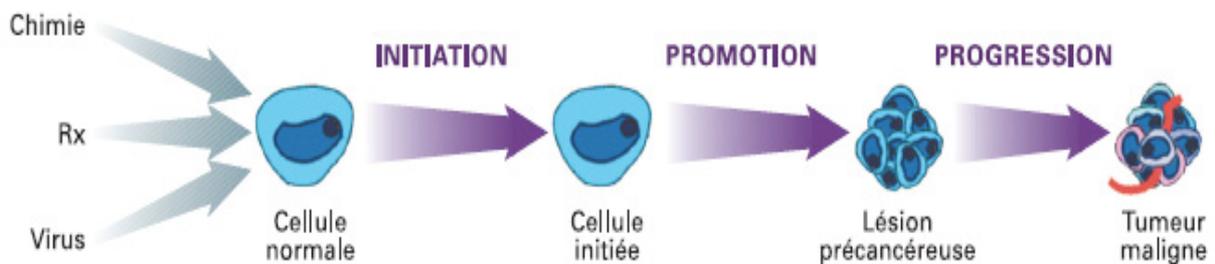


Figure 19 : Evolution du processus de la carcinogénèse

III.2.1. Anomalie génétique et gènes du cancer

La carcinogénèse est un processus à plusieurs étapes dans lequel les cellules normales acquièrent une malignité complète. Ces incidents donnent lieu conjointement à l'activation d'un oncogène, provoquant une prolifération incontrôlée de la cellule et à l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur qui déjoue l'élimination par apoptose des cellules endommagées (Busch, 1984). Le point de départ du processus de cancérisation est l'altération du matériel génétique d'une cellule.

a. Les oncogènes

Ce sont des gènes viraux introduits dans la cellule par l'action de certains virus en induisant une prolifération cellulaire. Ces gènes sont des formes altérées de gènes normaux d'origine cellulaire, les proto-oncogènes, capturés par les rétrovirus au cours de leur réplication. Ces proto-oncogènes sont conservés dans toutes les espèces (de l'insecte à l'homme) et jouent un rôle essentiel dans l'embryogenèse, dans la transcription de l'ADN. Ces gènes normaux

lorsqu'ils sont remaniés et/ou surexprimés deviennent des oncogènes. Par différents mécanismes, l'activation des proto-oncogènes en oncogènes peut mener à un cancer (Wack, 2005).

b. Les gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes

En parallèle, il existe des gènes jouant le rôle de frein et arrêtant la prolifération cellulaire, ils s'opposent ainsi à l'action des oncogènes; ce sont les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs. Ces gènes codent pour des protéines capables d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation post-mitotique et l'orientation irréversible vers la voie de l'apoptose. La mutation de ces gènes, liée cette fois à une perte de fonction, entraîne l'arrêt du contrôle du cycle cellulaire (Marshall, 1991). Ainsi les cellules ayant un matériel génétique modifié ne seront ni réparées, ni dirigées vers l'apoptose et se diviseront de façon anarchique et indépendante de l'organisme (Lodish et al. 2005). Aujourd'hui une trentaine de ces gènes, qui interviennent spécifiquement dans certains types de tumeurs, sont connus. Le plus fréquemment impliqué est p53.

III.2.2. Rôle de l'environnement

A patrimoine génétique identique, le taux d'incidence d'un cancer donné change de façon considérable lorsque le mode de vie et l'environnement (contaminants divers) changent (Sasco, 1989). Les lésions de l'ADN peuvent être provoquées par des facteurs limités aux cancérogènes chimiques (tabac), physiques (radiations) et biologiques (virus, bactéries, parasites) présents dans notre environnement en tenant compte de la multiplicité des agents et leurs interactions. Ces lésions peuvent rarement être hérédités. La détermination de la part des cancers attribuable à différents agents environnementaux est extrêmement controversée et varie selon les zones géographiques et le développement socio-économique. D'une manière générale, les polluants environnementaux les plus cités avec cancérogénicité démontrée sont: la génétique, l'alimentation, le tabac, la pollution de l'air extérieur, les résidus de chloration de l'eau, les pesticides, les dioxines, les radiations ionisantes et non ionisantes (champs électromagnétiques) (Sasco, 2007).

III.2.3. Les mécanismes de protection de l'ADN

L'ADN subit sans arrêt des lésions que les cellules doivent réparer au plus vite, sous peine de mourir ou de ne plus maîtriser leur prolifération. On estime à 100 000 le nombre de lésions infligées chaque jour aux chromosomes d'une cellule humaine.

Les lésions sont de natures très diverses et peuvent être provoquées par des agents endogènes ou exogènes. Les plus fatals des agents endogènes sont les dérivés de l'oxygène, qui apparaissent dans les mitochondries et détériorent les bases de l'ADN ou provoquent des cassures double brin. Parmi les agents exogènes, les rayons X et UV sont les plus manifestés, ainsi que de nombreuses molécules présentes dans l'air ou dans les aliments. Les rayons X induisent surtout des cassures simple-brin ou double-brin, tandis que les UV font apparaître des ponts entre bases d'un même brin ou des bases anormales. La vie ne serait ainsi pas possible sans l'existence de mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN (Italiano 2011). En cas de lésion, la cellule va activer la voie de signalisation (Lansdorp, 2000). Cette voie va stabiliser la protéine p53, induisant une surexpression de la protéine p21 et bloquant ainsi la prolifération cellulaire et stimulent les systèmes de réparation (Passos et al. 2007) pour donner aux cellules le temps de réparer la lésion de l'ADN avant la duplication des molécules d'ADN et la mitose. Ces systèmes sont multiples et très voisins, de la levure à l'homme. Il existe plusieurs systèmes de réparation des différentes lésions de l'ADN, et le choix de celui mis en œuvre dépend des lésions dans la cellule et les cellules voisines, ainsi que de l'agent causal.

III.2.4. L'immunosurveillance

A l'échelle cellulaire, les mécanismes de défense de la cellule se déclenchent en cas d'apparition de lésion de l'ADN (système de réparation). En immunosurveillance, on parle des mécanismes de défense de l'individu où le système immunitaire joue un rôle particulièrement important dans la protection de l'organisme contre l'apparition d'un cancer. Ce système assure aussi, de façon efficace, la protection contre les infections bactériennes, fongiques, parasitaires et virales (Andrieu et al. 1997). Le rôle de la défense du système immunitaire contre le développement des cancers a été postulé dans le cadre de la théorie de la "surveillance immunitaire" (Burnet, 1957). Bien que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et des anticorps spécifiques des tumeurs puissent être détectés chez des patients atteints de cancers, ces réponses immunitaires ne sont pas efficaces pour éliminer la maladie, dans tous les cas où celle-ci est détectable cliniquement. Ainsi, malgré cette surveillance, les cellules transformées devenant cancéreuses, arrivent par différentes manières à échapper au contrôle immunitaire et aboutissent au développement tumoral. Alors que des voies prometteuses sont mises en œuvre, il s'agit de l'immuno-prévention par la vaccination contre des virus associés à des cancers. Parmi les premières est la vaccination contre l'hépatite B afin de réduire le risque de cancer du foie (Sasco, 2007).

III.3. Traitement du cancer

Les traitements modernes sont basés principalement sur la chirurgie. En effet, en enlevant une grande partie (ou la totalité) des cellules cancéreuses, l'équilibre des forces dans l'organisme malade va pencher alors en faveur du système immunitaire. Viennent ensuite, la radiothérapie, l'immunothérapie et l'hormonothérapie, qui ont chacune leur place respective dans les protocoles de traitements et enfin, la chimiothérapie. Ces modalités thérapeutiques peuvent être utilisées seules ou en combinaison avec les autres thérapies. Le choix d'une stratégie thérapeutique repose sur divers facteurs: la taille de la tumeur, sa localisation, son type histologique, etc. Le but de tous ces traitements est de détruire les cellules malignes et/ou de bloquer leurs proliférations (Mordant, 2008). Cependant, leurs effets secondaires sont considérables.

III.3.1. La chirurgie

La chirurgie occupe une place majeure au sein de la stratégie thérapeutique de la plupart des tumeurs, et permet une guérison dans une large proportion des cas. Le plus souvent, lorsque c'est possible, c'est le premier traitement envisagé pour traiter un cancer. Ce traitement est radical si la tumeur n'a pas essaimé dans d'autres régions du corps. Sinon, et c'est souvent le cas, il faudra conjuguer d'autres traitements afin de détruire les cellules cancéreuses là où elles se trouvent (Lacave et al. 2005). L'exemple le plus fréquent est le traitement par chimiothérapie dans le cadre d'une tumeur du sein de grande taille; la réalisation d'une chimiothérapie avant l'intervention chirurgicale (on parle de chimiothérapie néo-adjuvante) peut permettre d'éviter une ablation complète du sein grâce à une réduction du volume tumoral.

III.3.2. La radiothérapie

La radiothérapie, née il y a plus d'un siècle avec la découverte de la radioactivité, est avec la chirurgie une des méthodes de traitement les plus anciennes et les plus utilisées dans la lutte contre le cancer. Elle est basée sur l'utilisation des radiations ionisantes pour détruire les cellules cancéreuses. Les rayonnements les plus utilisés en radiothérapie externe sont les rayonnements électromagnétiques de haute énergie ou photons (Bouvenot, 1994). Ces radiations peuvent entraîner des ruptures simple ou double-brin du niveau de l'ADN. Les ruptures simple-brin sont souvent sublétales, mais leur accumulation peut dépasser les capacités de réparation cellulaire. Les ruptures double-brin sont peu réparables et représentent le mécanisme dominant de la mort cellulaire radio-induite.

III.3.3. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est une technique qui consiste à modifier l'environnement hormonal chez les patients porteurs de tumeurs dépendantes des hormones sexuelles (œstrogènes pour le cancer du sein, androgènes pour le cancer de la prostate). De la même façon que la chimiothérapie, l'hormonothérapie peut être utilisée à visée curative (le plus souvent en phase adjuvante) ou à visée palliative (chez les patients métastatiques).

III.3.4. La chimiothérapie

Le principe général de la chimiothérapie anti-cancéreuse repose sur un traitement systémique, basé sur les mécanismes d'action des substances chimiothérapeutiques, détruisant des tissus tumoraux, plus sensibles aux dommages introduits par ces drogues, que les cellules normales. Bien que l'ensemble des constituants de la cellule peuvent être la cible de ces substances, l'ADN en reste la principale cible (Baillet, 2003). Ces drogues peuvent induire des perturbations fatales de la structure et des échanges énergétiques de la cellule. Ainsi, les chimiothérapies choisies doivent offrir des rapports efficacité / toxicité et bénéfices / risques positifs selon les drogues employées et les tumeurs traitées. Elle est très utilisée dans les cancers du sang (leucémies, lymphomes) mais aussi dans les tumeurs solides (en particulier le cancer du sein, de l'ovaire et du colon) (Kufe et al. 2003), soit pour réduire une tumeur avant une chirurgie (chimiothérapie néo-adjuvante), soit pour compléter l'action des autres traitements (chimiothérapie adjuvante), soit encore pour freiner l'évolution d'un cancer avancé (chimiothérapie palliative) (Bodin, 2011).

III.3.4.1. Problèmes d'utilisation de la chimiothérapie

a. Problèmes de toxicité

L'inconvénient majeur des médicaments cytotoxiques est leur action toxique de la chimiothérapie sur les cellules normales et plus particulièrement celles présentant un taux de renouvellement important (croissance est rapide) comme les cellules du sang par exemple. Deux grandes catégories de toxicités sont présentées (Kufe et al. 2003): les toxicités aiguës qui sont assez communes aux différents médicaments et les toxicités chroniques qui, au contraire pour la plupart, sont particulières à une famille thérapeutique donnée. Les toxicités aiguës atteignent principalement l'appareil digestif (nausées et vomissements, diarrhées ou constipation), la peau et les phanères (troubles cutanés, alopecie) et le système hématopoïétique (neutropénie, thrombopénie, anémie). Il existe également des toxicités spécifiques du type de drogue utilisée. Ainsi par exemple, des atteintes de l'appareil

cardiovasculaire sont principalement observées lors de l'utilisation d'anthracyclines, tandis qu'une neuro-toxicité sera plutôt observée avec des agents alkylants et des agents antimétabolites (Kufe et al. 2003).

b. La résistance aux médicaments anticancéreux ou chimio-résistance

Plusieurs types de résistance à la chimiothérapie ont été observés dans la pratique clinique, les deux principaux sont:

- La résistance intrinsèque survient d'emblée lors de l'administration des premières séances de chimiothérapie, sans phase de sensibilité initiale. De nombreuses tumeurs sont ainsi d'emblée résistantes: c'est le cas du mélanome, de nombreux sarcomes et de tumeurs cérébrales (Longley et Johnston, 2005).
- La chimiorésistance acquise : après une phase initiale de grande chimio-sensibilité, apparaît secondairement une progression de la maladie témoignant d'une résistance acquise. C'est le cas de nombreuses tumeurs solides comme les cancers du sein et de l'ovaire.

L'inhibition de l'apoptose dans les cellules résistantes peut ne pas être une caractéristique générale et la restauration des voies de l'apoptose peut ne pas être une stratégie applicable au traitement des cancers, en dehors de quelques cas particuliers. Il se pourrait que l'apoptose ne soit pas la voie la plus utilisée par les cellules tumorales conduisant à leur destruction par un traitement cytotoxique (Kyprianou et al. 1997 ; Beale et al. 2000 ; Soengas et al. 1999). Ainsi, le phénomène de chimio-résistance minimise l'action des médicaments utilisés en chimiothérapie et pousse de plus en plus les chercheurs à trouver en permanence de nouveaux produits actifs et/ou de nouvelles cibles cellulaires. Par conséquent, le développement de nouveaux agents anticancéreux efficaces avec une spécificité d'action naturelle et à effets secondaires réduits devient une nécessité incontournable.

III.3.5. L'apoptose une cible privilégiée pour la thérapie anticancéreuse

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire génétiquement contrôlé, qui a lieu naturellement dans les organismes pluricellulaires, aboutissant à la destruction d'une cellule via, entre autre, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, le désassemblage de la membrane nucléaire, la condensation du cytoplasme et sa fragmentation en corps apoptotiques (délimités par la membrane plasmique) et enfin l'élimination de ces corps apoptotique par phagocytose réalisée par les cellules voisines ou des macrophages.

Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire. Le tout n'entraîne aucune inflammation ni aucune perturbation des cellules environnantes. Ainsi, l'apoptose peut être définie comme une mort cellulaire programmée, impliquant le suicide des cellules en faveur du bon fonctionnement de l'organisme dans son ensemble (Kaufmann et Hengartner, 2001). Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire et est contrôlée par un ensemble de mécanismes cellulaires spécifiques (Elmore, 2007).

L'apoptose est nécessaire et vitale à l'organisme aussi bien au cours de l'embryogenèse que lors de l'activation du système immunitaire. En effet, durant le développement de l'organisme, les cellules sont produites en grandes quantités et selon des critères particuliers requis, certaines d'entre elles vont mourir par apoptose. Dans le cas où les lésions de l'ADN sont trop importantes, les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent être mis en défaut et la cellule déclenche le mécanisme d'apoptose. Dans ce cas, l'apoptose a pour rôle d'empêcher la transformation de la cellule porteuse de lésions de l'ADN, qui n'ont pu être réparées, en cellule cancéreuse. De manière très schématique, la cellule décide de se tuer plutôt que de tuer. Cependant, l'inhibition de l'apoptose ou une apoptose défectueuse entraîne le développement de cancers et de pathologies virales alors qu'une apoptose excessive peut entraîner des désordres tels que les désordres neuro-dégénératifs (Thatte et Dahanukar, 1997). Ainsi, la protéine p53, encore appelée «gardienne du génome», joue un rôle crucial dans le déclenchement de l'apoptose. Toutefois, des mutations de cette protéine surviennent dans plus de 50% des cancers. Ces mutations aboutissent à la synthèse d'une protéine p53 qui n'est plus capable de jouer son rôle d'induction de l'apoptose. Les cellules porteuses d'anomalies de l'ADN continuent alors de proliférer, d'accumuler d'autres anomalies, constituant ainsi le lit du cancer (Vakifahmetoglu et al. 2008).

Les voies de signalisation permettant de déclencher l'apoptose sont nombreuses et encore incomplètement connues, impliquant un grand besoin d'énergie (Solary et al. 2000). La voie «intrinsèque», dont les mécanismes d'activation ne sont pas tous identifiés, met en jeu la libération de cytochrome c mitochondrial dans le cytoplasme, ce qui permet, en conjonction avec divers facteurs protéiques, d'activer des caspases effectrices de l'apoptose (Figure 20).

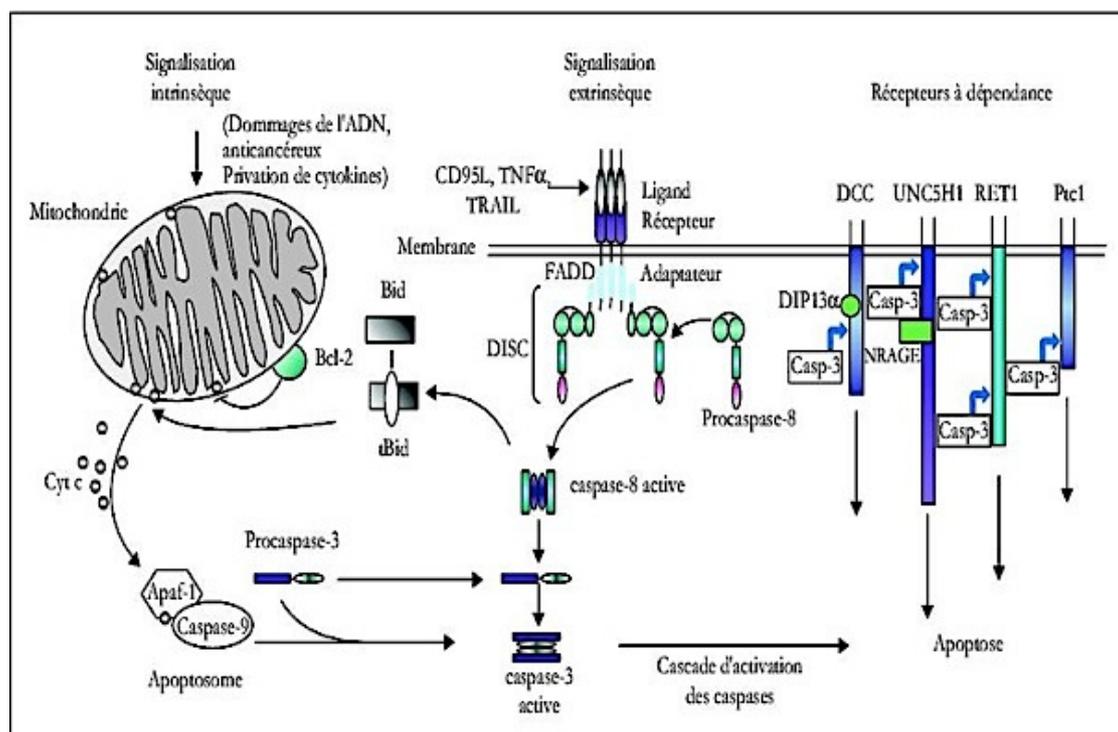


Figure 20 : Schéma récapitulatif des voies de l'apoptose (Ségal-Bendirdjian, 2005)

La voie « extrinsèque » passe par la mise en jeu de récepteurs de mort cellulaire à la surface de la cellule, ce qui permet l'activation des caspases, soit directement, soit après l'intervention du relais mitochondrial. La complexité et la redondance des voies de l'apoptose, ainsi que la variabilité de l'importance relative de ces voies dans les diverses lignées cellulaires, peuvent expliquer pourquoi nous ne disposons pas à l'heure actuelle d'une vision claire et synthétique des mécanismes de résistance liés à un défaut d'apoptose (Robert et al. 2002).

L'apoptose est considérée par de nombreux auteurs comme le mécanisme ultime de la mort cellulaire résultant d'un traitement par un médicament cytotoxique. En conséquence, l'efficacité d'un traitement dépendrait de la capacité des cellules tumorales à activer les voies de l'apoptose par la mise en jeu de l'expression de gènes initiant ou régulant ces voies. À l'inverse, la diminution de l'expression de ces gènes conduirait à une apoptose défective, donc à la résistance au médicament (Robert, 2002).

III.3.1. Effet antiprolifératif des polyphénols induit par voie apoptotique

Plusieurs études ont pu démontrer la relation entre les polyphénols, l'apoptose et le cancer sur l'aptitude de ces composés à agir comme chimio-prévention d'un cancer et/ou des agents chimio-thérapeutiques (Jang et al. 1997). Il a été démontré que certains polyphénols comme le resvératrol, la curcumine, la (-) épigallocatechine-3-gallate (EGCG) et le pterostilbène ont pu

CHAPITRE 2: Matériels et Méthodes

I. Matériel végétal

Ce travail a été effectué sur les margines et les grignons d'olive marocaine de la région Tadla/Azilal. Les échantillons ont été obtenus suite à l'extraction d'huile d'olive vierge des huileries semi-modernes (système discontinu d'extraction par presse) ou traditionnelles (mâasra) et ont été collectés dans différents sites de la région Tadla/Azilal: Béni Mellal, Krazza, Fkih Ben Salah, Afourar, Bni-âyat comme sites de la zone de plaine, El Ksiba, Demnat, Taghzirt, Aourir (périmètre de Taghzirt), et Azilal comme sites de la zone de montagne (Figure 22). Au total 30 échantillons ont été collectés à raison de 3 échantillons récoltés à différents points de collecte de chaque site. Après collecte, les échantillons des margines ont été conservés à une température de 4°C et les échantillons des grignons ont été conservés à température ambiante. La collecte des échantillons était faite pendant la période de décembre à mars de la campagne oléicole de 2010-2011. Une seule variété d'olive était l'origine de notre matériel végétal, la *Picholine Marocaine*, collectée au même stade de maturité d'olives: olives vertes-semi noires.

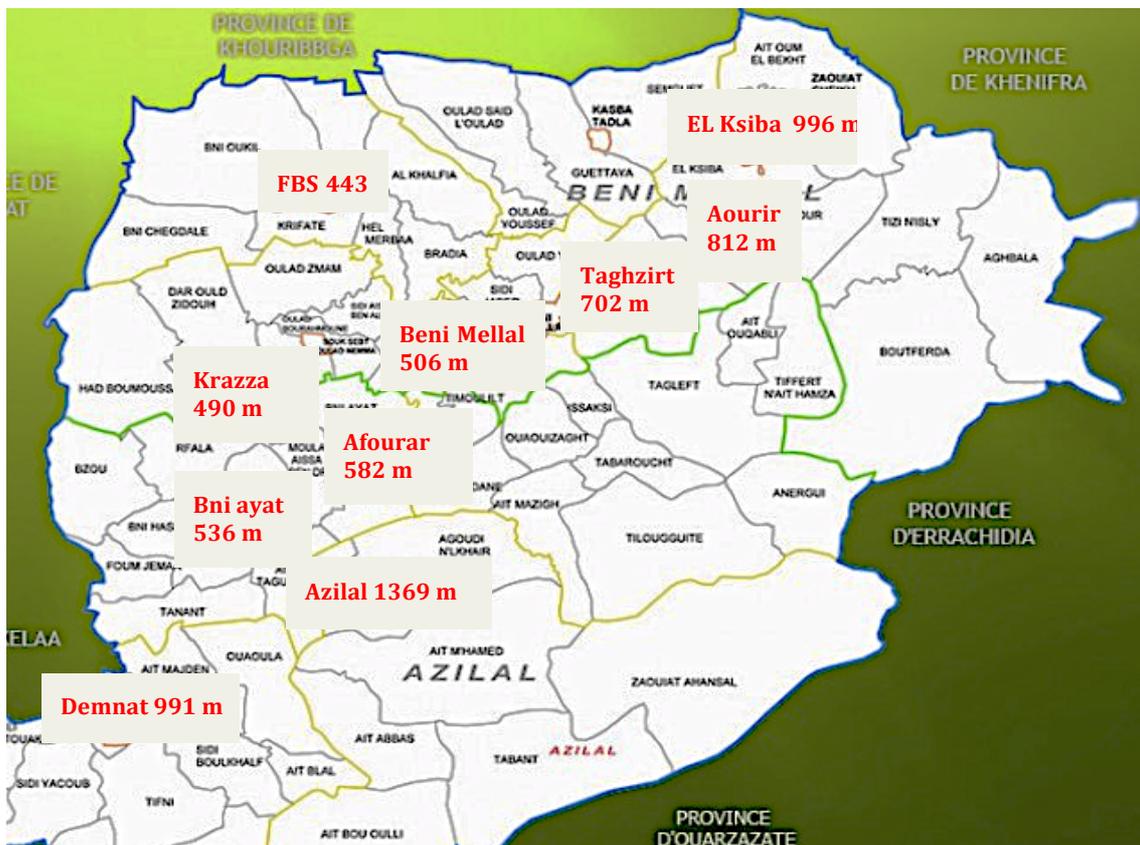


Figure 22 : Carte de la région Tadla-Azilal montrant les sites de collecte des échantillons avec l'altitude de chaque point.

II. Caractérisation chimique, extraction, dosage et identification des polyphénols dans les grignons et les margines

II.1. Analyse par spectroscopie Moyen Infra Rouge à Transformée de Fourier (FT-MIR)

Un spectromètre FT-MIR (Bruker Vector 22) muni du logiciel Opus 5.5 a été utilisé pour l'analyse des échantillons bruts des grignons et des margines en générant un spectre unique pour chaque échantillon. Ce spectromètre intégrant un interféromètre de Michelson, présente des avantages distincts par rapport aux spectromètres dispersifs. Les échantillons ont été déposés sans préparation sur une cellule à réflexion totale atténuée et équipée d'un cristal de diamant. Les spectres ont été enregistrés entre 4000 et 400 cm^{-1} .

II.2. Extraction des composés phénoliques

II.2.1. Extraction des polyphénols présents dans les grignons

Les grignons séchés ont été broyés dans un mixeur à café, tamisés puis dégraissés à l'hexane. Environ 60 g d'échantillon sont dégraissés par 500 ml d'hexane pendant 4 heures en utilisant l'appareil de Soxhlet.

Les échantillons des grignons dégraissés ont été ensuite soumis à une extraction solide-liquide à l'aide de l'appareil Soxhlet en utilisant l'éthanol. 60 g de chaque échantillon ont été placés dans une cartouche fixée à ballon à fond rond (500 ml de capacité) contenant 500 ml d'éthanol, et surmonté d'un réfrigérant. L'extraction est maintenue en continu pendant 12 h à 70 °C (Alu'datt et al. 2010). Les extraits éthanoliques des grignons ont été concentrés au rota-vapeur jusqu'à évaporation totale de l'éthanol et l'extrait est récupéré dans des flacons propres et conservés à - 18 ° C.

II.2.2. Extraction des polyphénols présents dans les margines

Avant de procéder à l'extraction des composés phénoliques, nous avons procédé au traitement et à la clarification des échantillons des margines en utilisant des centrifugations successives (4000 x g, 15 min). Après avoir aspiré le surnageant d'huile à la surface de la margine, le volume restant est centrifugé pendant 15 min à une vitesse de 4000 x g. Trois phases sont obtenues ; deux phases liquides représentant la phase aqueuse (margine), la phase huileuse en surface et un précipité solide (impuretés). Après élimination de la phase huileuse et des impuretés, un volume analogue d'hexane est ajouté à la margine (phase aqueuse).

Les tubes sont mélangés au vortex, pendant 3 min à 2500 tr/min, et centrifugés pendant 15 min à 4000 x g. Ensuite, la margine est récupérée après séparation complète des deux phases : l'hexane contenant les lipides en surnageant et la margine délipidée prête à une extraction liquide-liquide.

Les composés phénoliques des margines délipidées ont été extraits en utilisant la méthode d'extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle (1:1, v/v) par centrifugation. En effet, 100 ml d'acétate d'éthyle sont ajoutés à 100 ml de margine délipidée, le mélange est homogénéisé au vortex, pendant 3 min à une vitesse de 2500 tr/min, puis répartis dans des tubes à centrifugation. Après 10 min (à 4000 x g), on obtient deux phases: les margines en culot et l'acétate d'éthyle riche en composés phénoliques (surnageant) (Figure 23). La phase d'acétate d'éthyle est évaporée au rota-vapeur et les extraits phénoliques sont conservés dans des flacons à - 18 ° C.

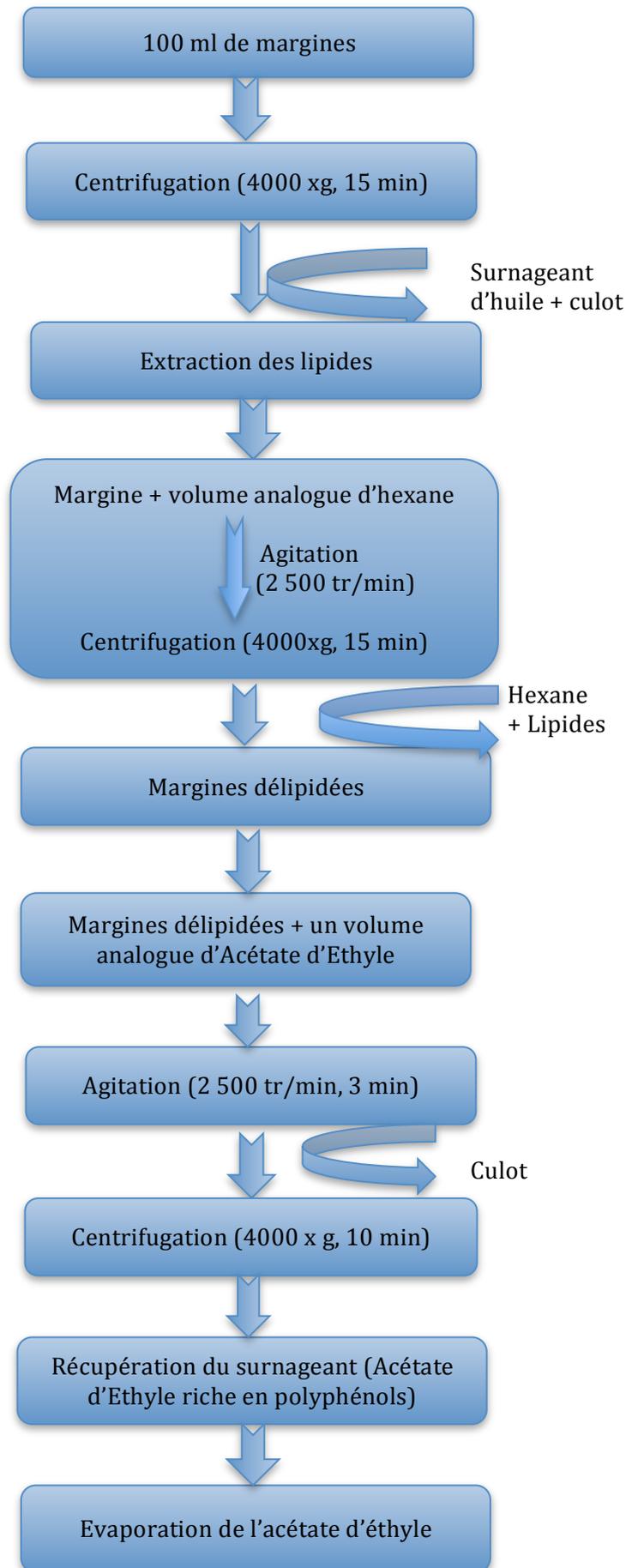


Figure 23 : Extraction des composés phénoliques des margines

II.3. Dosage des polyphénols totaux par la méthode du Folin-Ciocalteu

Cette méthode consiste en la mesure de l'absorbance de la coloration bleue du complexe de phosphotungstique—phosphomolybdique dans une solution alcaline à 760 nm (Waterman et Mole, 1994). La teneur totale des composés phénoliques dans chaque extrait a été évaluée par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu d'après le protocole de Scalbert et al. (1989) et Singleton et Rossi, (1965) avec quelques modifications. Brièvement, une quantité de 2,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu 0,2 N a été mélangée à 0,5 ml d'échantillon (extrait phénolique récupéré dans 2 ml d'éthanol). La réaction a été maintenue à l'obscurité pendant 5 minutes. Ensuite, 2 ml d'une solution de carbonate de sodium (75 g/l) a été ajoutée au mélange. Le développement d'une couleur bleue est obtenu après incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant une heure. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (V-630) à 760 nm pour les échantillons des grignons et à 765 pour les échantillons de margines. Les résultats sont rapportés à une courbe étalon standard en utilisant l'acide gallique. La teneur totale en composés phénoliques a été exprimée en équivalent d'acide gallique en g par Kg (g d'EAG / kg de matière sèche) pour les grignons et en gramme par litre (g d'EAG/ l d'échantillon) pour les margines.

II.4. Identification des composés phénoliques par HPLC-ESI- MS

Les analyses de chromatographie à haute performance en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse dont la source d'ionisation est un Electrospray (HPLC-ESI-MS) ont été effectuées à 279 nm à 30 °C en utilisant une colonne RP C18 (150 x 4,6) x 5 µm avec un appareil Thermo Fisher équipé d'une pompe quaternaire Surveyor couplé à un détecteur PDA (200 - 600 nm) et un LCQ (ESI) piège à ions du spectromètre de masse (Thermo Finnigan, San Jose, CA). Le volume injecté est de 20 µl. La phase mobile (0.5 ml/min) est composée de solvant A: TFA 0,05 % dans l'eau et le solvant B : 0,05% TFA dans de l'ACN. La durée totale de la migration est de 76 minutes. Les conditions d'ionisation ESI étaient sous une tension de pulvérisation de 4 KV, capillaire 350 °C, 14 V. L'azote pur est utilisé dans le transfert capillaire et l'hélium pur était utilisé comme gaz de collision. L'analyse complète des données de masse m/z a été obtenue en mode positif pour les grignons et en mode négatif pour les margines, elle varie de 100 à 2000 Da.

III. Etude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des grignons et des margines

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits phénoliques des grignons et des margines, nous avons réalisé deux types de tests différents: le test au DPPH et le test de Blanchissement au β -carotène.

III.1. Test au DPPH (2, 2'- diphenyl-1-picrylhydrazyle)

Ce test consiste en la réduction du composé 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle DPPH, en 2,2-diphényl 1 picryl hydrazine en présence de l'antioxydant provoquant ainsi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH• (Brand-Williams et al. 1995). La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue vers une coloration jaune, due au piégeage des radicaux libres par l'antioxydant (cas des composés phénoliques) par le transfert de l'atome H sur le DPPH• qui se transforme en DPPHH (Popovici et al. 2009, Molyneux, 2004).

Selon le protocole décrit par Kim et al. (2003), l'essai a été réalisé dans une plaque de microtitration à 96 puits. Les échantillons (extraits phénoliques) ainsi que le contrôle positif (l'acide ascorbique) sont dilués avec du méthanol pour préparer des solutions équivalentes à des concentrations de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 mg d'extrait/ ml. 150 μ l d'une solution de DPPH 0,004% sont introduits à la pipette dans chaque puits de la plaque suivie de 8 μ l de chaque solution. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 30 min et l'absorbance est mesurée à 540 nm en utilisant un lecteur de plaques de microtitration ELISA. L'expérience a été réalisée en trois essais.

III.1.1. Evaluation du potentiel anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire a été mesurée par la détermination de la réduction relative du radical DPPH• à un temps de référence où le % d'inhibition des radicaux libres a été calculé en utilisant la formule :

$$\% I = (DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{témoin}} / DO_{\text{témoin}}) \times 100$$

où :

I : % de l'activité anti-radicalaire.

DO_{échantillon} : absorbance de l'échantillon.

DO_{témoin} : absorbance du témoin.

III.2. Test de décoloration au β -carotène (BCBT)

Cette méthode consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C). L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène (Laguerre et al. 2007).

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de décoloration du β -carotène a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par Kartal et al. (2007). Pour préparer l'émulsion du β -carotène, 2 mg de ce dernier sont dissouts dans 1ml de chloroforme. La solution obtenue a été introduite dans un ballon contenant 2mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 80. Après évaporation du chloroforme, 100 ml d'eau distillée ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution, 2 ml sont transférés dans des tubes et 0,5 ml de chaque extrait (10 μ g/ml, 25 μ g /ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml) ont été ajoutés. L'incubation à l'obscurité et à température ambiante avait durée 24 heures. La lecture de l'absorbance a été effectuée au spectrophotomètre UV-VIS (model 752) à 490 nm. La solution du β -carotène plus l'acide linoléique était utilisée comme témoin négatif.

III.2.1. Evaluation du potentiel antioxydant

L'activité antioxydante relative après 24h est calculée selon la relation suivante :

$$\% \text{ AAR} = (\text{DO}_{\text{initiale}} - \text{DO}_{\text{finale}} / \text{DO}_{\text{initiale}}) \times 100$$

Où :

AAR : Activité Antioxydante Relative

DO_{initiale} : absorbance de l'échantillon avant incubation

DO_{finale} : absorbance de l'échantillon après 24h.

IV. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques des grignons et des margines

IV.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches utilisées dans cette étude : Echerichia Coli (Gram négatif), Streptococcus faecalis et Staphylococcus aureus (Gram positif) ont été isolées et identifiées dans le laboratoire de génie biologique de la faculté des sciences et techniques de Beni Mellal. Elles ont été cultivées pendant 12 h à 37 °C dans un milieu gélosé Mueller Hinton.

Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant 9 ml de bouillon nutritif et incubés à 37 °C pendant 24 h afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de Mc Farland ($0.5 \cdot 10^6$ ufc/ml).

IV.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits phénoliques des grignons et des margines a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosée comme décrit par Obied et al. (2007) et Bisignano et al. (1999) avec quelques modifications en concentrations. 100 µl de la solution standardisée d'inoculum ($3 \cdot 10^6$ ufc/ml) sont versés et uniformément répartis dans des boîtes de Pétri contenant chacune 15 ml du milieu gélosé Mueller Hinton solidifié. Des disques stériles en papier (6 mm de diamètre) ont été imprégnés de concentrations croissantes d'extraits phénoliques, dilués dans le DMSO, à raison de 20 µl par disque et ont été déposés soigneusement dans les boîtes. Les boîtes de Pétri étaient maintenues pendant 15 min à une température de 25 °C puis incubées à 37 °C pendant 24h. L'activité antibactérienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant les diamètres des zones d'inhibition (mm) formées autour des disques (diamètre du disque inclus). La sensibilité des bactéries cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition (Ponce et al. 2003): $\varnothing < 8$ mm: bactérie non sensible; $9 < \varnothing < 14$ mm: bactérie sensible; $15 < \varnothing < 19$ mm: bactérie très sensible et $\varnothing > 20$ mm: bactérie extrêmement sensible. Le DMSO était utilisé comme témoin négatif. Les antibiotiques : Amoxicilline 25 µg, Chloramphénicol 30 µg, et ceftriaxone 30 µg (OXOID UK) ont été utilisés comme contrôle positif.

V. Etude de l'activité antitumorale *in vitro* des extraits phénoliques des grignons et des margines

V.1. Lignées tumorales, réactifs et culture cellulaire

V.1.1. Lignées tumorales

Les deux lignées cellulaires utilisées pour les différentes expérimentations sont: l'adénocarcinome du sein humain (MCF7) et le mastocytome murin (P815).

V.1.2. Produits et réactifs

DMSO, DMEM et FCS, EDTA, PBS, SDS, MTT, Tris HCl, Tris base, Protéinase K, Isopropanol, Binding Buffer, Annexine-biotine, Streptavidine-FITC, TBE, agarose, bleu de trypan, sont achetés chez Sigma (St Quentin, France).

V.1.3. Culture cellulaire

Après récupération des cellules congelées de l'azote liquide, elles sont transférées rapidement dans des tubes à centrifugation en présence de milieu de culture. Les cellules sont lavées 2 à 3 fois par du PBS en centrifugeant à 1400 tours/min pendant 10 mn pour éliminer le DMSO. Après lavage, le surnageant est jeté et le culot récupéré. Ce dernier contenant les cellules est mis dans des flasques à ouverture inclinée et ventilée en présence du milieu de culture. Les flasques sont ensuite incubés dans une atmosphère humide à 37 °C et 5 % CO₂.

Dans le cas des cellules adhérentes (MCF7) et après avoir jeté le surnageant contenu dans le flasque de culture, les cellules sont lavées par du PBS avant de les décoller. Ce lavage a pour but d'éliminer les traces restantes du sérum de veau fœtal qui est considéré comme un inhibiteur de l'action de la trypsine. Ensuite, On ajoute 1 ml de Trypsine-EDTA (0,25% et 0,1%, respectivement) et les cellules sont incubées à 37°C. Ces dernières se décollent du plastique au bout de quelques minutes. La suspension cellulaire est alors récupérée et lavée deux fois par centrifugation avec du PBS puis répartie dans de nouveaux flasques dans du milieu de culture (DMEM complet supplémenté avec 5% de SVF, 100 µl/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine et 0,2% de sodium bicarbonate). L'incubation est effectuée dans une atmosphère humide à 37°C et à 5% de CO₂.

◆ Comptage cellulaire

Avant la réalisation du test de cytotoxicité, on procède au comptage cellulaire pour déterminer le volume de la suspension cellulaire correspondant au nombre de cellules à mettre dans chaque puits d'une plaque de microtitration. A 20 μl de la suspension cellulaire, on ajoute 160 μl de milieu de culture et 20 μl d'une solution de bleu de trypan. Ce dernier colore les cellules mortes exclues du comptage. Pour dénombrer les cellules, on utilise la lame de Malassez sur laquelle on dépose une goutte (10 à 25 μl) du mélange à l'aide d'une micropipette. Après avoir attendu quelques minutes pour que les cellules sédimentent, on peut compter le nombre de cellules dans les 25 rectangles quadrillés, généralement on compte dans 10 rectangles, au microscope au grossissement 40. Le volume d'un rectangle quadrillé étant de 0,01 μl , en comptant 10 rectangles, il suffit alors de multiplier le résultat par 10 000 pour obtenir le nombre de cellules par ml.

Le but étant d'obtenir une suspension de 1 à 1.5×10^4 cellule /ml à incuber dans 100 μl de milieu de culture complet par puits à fond plat des plaques de micro-culture de 96 puits (Bioster, Bastia di Rovolon, Italy). Cette micro-culture ainsi obtenue est mise en incubation 24 heures avant la réalisation des tests de cytotoxicité.

V.2. Etude de l'effet cytotoxique *in vitro*

Pour déterminer l'activité antitumorale *in vitro* des extraits phénoliques des grignons et des margines, nous avons réalisé le test de cytotoxicité contre deux lignées tumorales, une en suspension, le mastocytome murin (P815) et l'autre adhérente, l'adénocarcinome du sein humain (MCF7).

V.2.1. Test MTT (Methyl Tetrazolium Test)

Ce test a été réalisé comme il a été décrit et modifié par Mosmann, (1983) en utilisant le réactif MTT (Bromure de 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Il est effectué en appliquant des doses décroissantes des extraits phénoliques, préalablement solubilisés dans du DMSO, obtenues par des dilutions de demi en demi, dans 100 μl de milieu de culture DMEM complet (supplémenté avec 5% de SVF, 100 UI/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycine et 0,2% de sodium bicarbonate), en partant de la concentration initiale de 10 mg/ml. La concentration la plus forte du test à savoir 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ainsi obtenue, est celle du premier puits de chaque plaque de micro-culture. Les puits suivants recevront successivement 100 μl dilués de demi en demi.

Chaque essai est réalisé en double et répété trois fois avec les témoins : positif (méthotrexate) et négatif (DMSO). Ces micro-cultures sont incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. La durée d'incubation, qui est la durée d'exposition des cellules aux extraits phénoliques est de 24 h.

◆ Evaluation et révélation de l'activité cytotoxique

La révélation de l'action cytotoxique est effectuée à l'aide du réactif MTT. Au bout de la période d'incubation (24h) et dans les conditions de culture citées ci-dessus, on ajoute 20 µl d'une solution de MTT (5mg/ml de PBS). Après 4 heures d'incubation dans les mêmes conditions de culture, on ajoute 100 µl d'une solution de HCl / Isopropanol (24 :1) afin de dissoudre le produit de formazan bleu-violet intracellulaire formé par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. Une heure plus tard, on procède à la lecture de la densité optique (DO) à deux longueurs d'ondes 540 nm et 630 nm en utilisant le lecteur spectro-photométrique de microplaques Multiscan MicroELISA.

La détermination de l'activité antiproliférative est réalisée en évaluant la concentration de l'extrait inhibant 50% de la croissance cellulaire (IC₅₀) par rapport à un témoin cultivé dans les mêmes conditions en l'absence du composé étudié.

Ainsi, l'effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines (pourcentage de lyse des cellules), peut être mesuré en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de lyse} = 100 \times (1 - DO_1 / DO_0)$$

où DO₀ et DO₁ sont les densités optiques correspondant respectivement au contrôle négatif et aux cellules traitées par les extraits phénoliques.

V.2.2. Test de cytotoxicité contre les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)

Pour évaluer l'effet de nos extraits sur les cellules normales chez l'homme, nous les avons testé sur les globules blancs sanguins d'un homme sain en utilisant le test MTT (Méthyl Tétrazolium Test) décrit ci-dessus. Dans un premier temps, nous avons procédé à l'isolement des globules blancs.

◆ Isolement des globules blancs

Les globules blancs sont séparés du reste des constituants sanguins en utilisant le Ficoll qui sert à réaliser un gradient de densité. Dans un tube contenant environ 6 ml de ce dernier, on verse doucement, avec une pipette, le même volume de sang humain dilué au 1/2 dans du PBS. On maintient le tube très incliné (presque horizontale) et on dépose le sang par la pipette au niveau de l'ouverture pour qu'il ne se mélange pas avec le Ficoll. On obtient alors deux couches bien séparées; celle du sang (en haut) et celle du Ficoll (en bas). Après centrifugation à 1400 tours/mn pendant 30 mn, on obtient quatre couches qui sont du haut vers le bas : le sérum, les globules blancs, le Ficoll et les globules rouges. La bande blanche des globules blancs est la plus mince. Ces cellules sont ensuite récupérées dans un tube stérile, lavées deux fois par du PBS et comptées pour tester leur sensibilité à l'effet cytotoxique des extraits en utilisant le test MTT.

V.3. Recherche de la mort cellulaire programmée (Apoptose)

V.3.1. Test de fragmentation de l'ADN

Les cellules tumorales P815 ont été incubées en présence des extraits phénoliques des grignons et des margines (Concentrations correspondantes à l'IC₅₀) pendant 24 h à 37 °C. Les cellules sont ensuite récupérées et lysées par un tampon de lyse contenant 100mM Tris HCl, 0.5M EDTA, 10% SDS, 5M NaCl et 20mg/ml Protéinase K. La dégradation est complète après 2-3 heures à 37 °C sous agitation constante. Ensuite, on ajoute l'isopropanol au lysat et les échantillons sont agités jusqu'à précipitation complète de l'ADN (10-20 min). Après précipitation, l'ADN est transféré dans des Eppendorfs et on ajoute 60 µl d'une solution de dissolution contenant 10 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5. La dissolution complète de l'ADN requiert quelques heures sous agitation constante à 37 °C. Enfin, 5 à 10 µl (en fonction de la taille de l'échantillon) d'une solution tampon de charge (50% glycérol, 1mM EDTA pH 8, 0,25% bleu de bromophénol) sont rajoutés et l'ADN est soumis à l'électrophorèse. Les échantillons d'ADN ont été déposés sur un gel d'agarose à 2 % et les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse horizontale (25 V pendant 4 h). Le gel est marqué par le bromure d'éthidium qui permet de visualiser les bandes d'ADN sous lumière UV (310 nm). The O'RangeRuler™200bp DNA et l'ADN des cellules cultivées en milieu sans sérum de veau foetal ont été utilisés comme contrôles positifs. L'ADN des cellules normales non traitées a été utilisé comme contrôle négatif.



Figure 24: Électrophorèse sur gel d'agarose

V.3.2. Test de marquage des caspases à l'Annexine V-Biotine Streptavidine (FITC)

En phase précoce de l'apoptose, il y a translocation de la phosphatidyl-sérine à l'extérieur de la membrane plasmique. Celle-ci est mise en évidence par marquage spécifique à l'annexine V couplée à un fluorophore et analysée par microscopie à fluorescence.

Ce test a été réalisé sur la lignée cellulaire P815. Une suspension cellulaire d'environ 106 cellules /ml a été traitée par 25 µg/ml d'extraits phénoliques. Après 24 heures d'incubation à 37 °C et 5% de CO₂, les cellules ont été récupérées et lavées deux fois par du PBS puis transférées dans des tubes eppendorf dans 0,5 ml de milieu de culture. 100 µl de la solution Binding Buffer et 5 µl d'Annexine-biotine sont rajoutés. La suspension est passée au vortex et ensuite incubée à 4°C pendant 30 mn à l'obscurité. Après centrifugation (1400 tours/min) et lavage au PBS, 0,5 µg de Streptavidine-FITC dans 100 µl de solution binding buffer sont ajoutés au culot cellulaire suivi d'une incubation à température ambiante dans l'obscurité pendant 15 à 30 min. Enfin, on met 20 à 50 microlitres de la suspension cellulaire entre lame et lamelle et on observe au microscope à fluorescence.

CHAPITRE 3 : Caractérisation chimique des grignons, des margines et leur extraits phénoliques

La composition des margines et des grignons varie à la fois qualitativement et quantitativement en fonction de plusieurs facteurs. Les composants principaux des margines et des grignons sont les composés phénoliques, les sucres et les acides organiques (Dermeche et al. 2013). En comparaison aux margines riches en eau, la teneur en matière sèche est élevée dans les grignons. La cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont les composants caractéristiques des grignons (Aranda et al. 2007). Toutefois, les matières grasses, protéines et sels minéraux sont également présents en quantités significatives dans les sous produits d'huile d'olive (Rodriguez et al. 2008).

La majorité des composés organiques présents dans les margines et les grignons rentre dans la composition chimique de l'olive. Au cours du processus d'extraction d'huile, ces composés se distribuent entre la partie solide (grignons), l'huile et l'eau de végétation (margines) (Bianchi, 1999). Le fruit d'olive est riche en composés phénoliques, mais seulement 2% du contenu total du fruit est retenu dans la phase huileuse, et les 98% passent dans les sous produits (Rodis et al. 2002 ; Lesage Meessen et al. 2001).

Par rapport à la littérature, les principales familles de polyphénols identifiées dans les grignons et les margines d'olive sont les phénols simples ou phényles alcools, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les sécoïridoïdes (phénols glycosides et leurs dérivés) et les lignanes. La plus part de ces familles ont été rapportées par des auteurs comme étant les composés phénoliques majoritaires des sous produits d'huile d'olive (Ramos et al. 2013; Suarez et al. 2010; Obied et al. 2007).

L'objectif de ce chapitre est de quantifier et d'identifier les composés phénoliques présents dans les extraits phénoliques des grignons et des margines d'olive en fonction de la zone géographique. D'abord, une caractérisation structurale par spectroscopie moyen infra-rouge a été réalisée pour les échantillons bruts des margines et des grignons. Ensuite, par des méthodes de Folin Ciocalteux et de LC-MS respectivement, nous avons déterminé la teneur totale en polyphénols et identifié les composés phénoliques majoritaires des extraits des grignons et des margines.

I. Etude phytochimique

I.1. Analyse par spectroscopie Moyen Infrarouge (MIR)

L'analyse par spectroscopie infra-rouge est la première étape de caractérisation des grignons et des margines d'olive. Les spectres MIR des échantillons des grignons montrent un profil spectroscopique identique, même s'ils proviennent de différentes zones géographiques. La figure 25 illustre deux spectres typiques; un de la zone de plaine et l'autre de montagne.

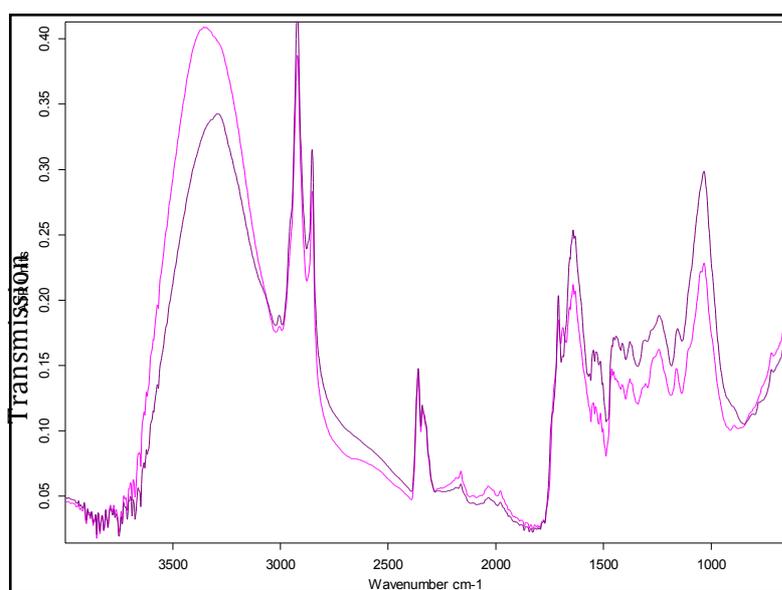


Figure 25 : Spectres MIR typiques de deux échantillons de grignons.

Les bandes: 3400 cm^{-1} : (OH), 2940 cm^{-1} : asymétrique (CH_2) et 2850 cm^{-1} : symétrique (CH_2), 1720 cm^{-1} : ($\text{C}=\text{O}$), 1100 cm^{-1} : ($\text{C}-\text{O}$), 1650 cm^{-1} : ($\text{C}=\text{C}$), $1400 - 1350\text{ cm}^{-1}$: (COO) et/ou ($\text{C}-\text{N}$).

Les spectres MIR présentent une bande intense à 3400 cm^{-1} qui pourrait correspondre au groupement hydroxyle OH (Ibarra, 1989). Une autre bande a été détectée dans l'intervalle $1300-1000\text{ cm}^{-1}$ incluant la bande à 1100 pourrait être attribuée à la liaison C-O. La présence de ces deux groupements pourrait probablement être attribuée à la cellulose (Kolokassidou et al. 2009). Le spectre montre aussi des fines bandes: asymétrique CH_2 à 2925 cm^{-1} , symétrique CH_2 à 2850 cm^{-1} et une bande moyenne à 1720 cm^{-1} correspond à la double liaison $\text{C}=\text{O}$ peuvent indiquer la présence d'acides gras, composantes caractéristiques de l'huile. Dans la région $1400-1000\text{ cm}^{-1}$, le spectre montre plusieurs bandes à faible intensité aux alentours de 1400 à 1350 cm^{-1} qui pourraient correspondre aux groupements C-N. En outre, la présence d'une bande à 1650 cm^{-1} pourrait être attribuée à la vibration d'élongation $\text{C}=\text{C}$. La présence des groupements C-O, C-H, CH_2 et C-N pourrait probablement être due à des composés comme les polyphénols et les protéines (Paradkar & Irudayaraj, 2002).

Les échantillons des mêmes zones ont été analysés également pour les margines.

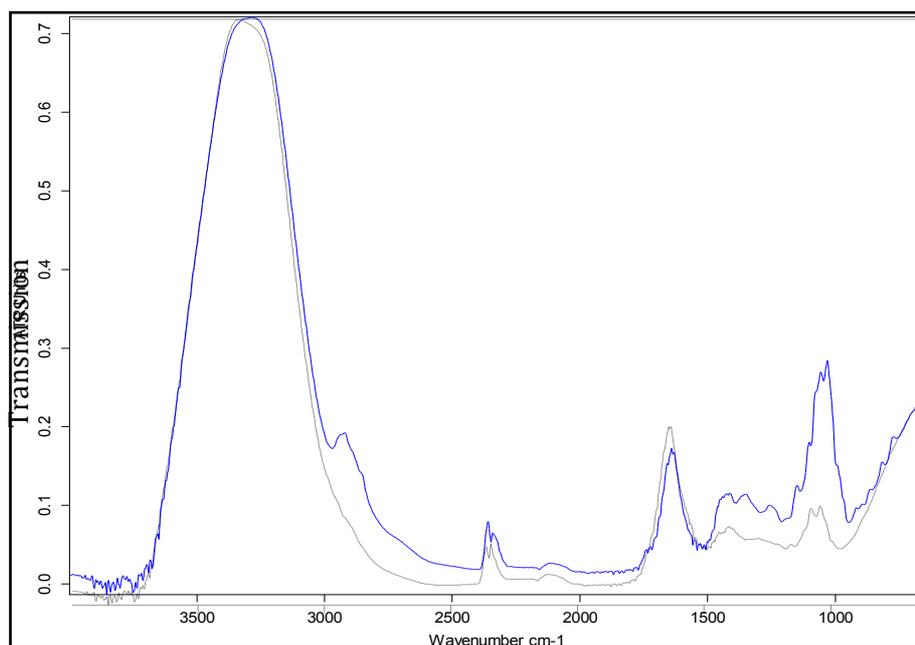


Figure 26: Spectres MIR typiques de deux échantillons de margines.

Les bandes: 3440 cm^{-1} : (OH), 2850 cm^{-1} : (C-H), 1100 cm^{-1} : (C-O), 1650 cm^{-1} : (C=C), 1400 cm^{-1} : (COO).

L'analyse des spectres MIR des extraits phénoliques des margines des différentes zones géographiques montre également des profils spectroscopiques similaires (Figure 26). La bande intense à 3440 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation OH du groupe hydroxyle pourrait indiquer la présence de l'eau ou les polyphénols. Les échantillons présentent une petite bande d'élongation aliphatique à 2880 cm^{-1} caractéristique de la liaison C-H et une bande moyenne d'ester: C-O autour de 1100 cm^{-1} , qui pourraient indiquer la présence d'acide gras (huile). Nous avons noté aussi la présence d'une fine bande à 1650 cm^{-1} qui pourrait correspondre à la vibration d'élongation C=C. Les bandes d'absorption à 1400 cm^{-1} pourrait être attribuée au groupement COO-. Ainsi, les groupements C-O et COO- et C-H peuvent être due à des composés phénoliques.

I.2. Caractérisation des facteurs d'influence sur l'extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols présents dans nos échantillons a été précédée par une caractérisation des facteurs pouvant influencer ce procédé.

I.2.1. Effet du temps d'extraction sur la teneur en polyphénols

On constate que le rendement augmente au fur et à mesure que le temps d'extraction augmente. D'après la figure 27, la durée nécessaire pour récupérer le maximum de composés phénoliques a été estimée à 12h car la différence de concentration en polyphénols extraite entre 12h et 14h ne dépasse pas 0,1 g/kg.

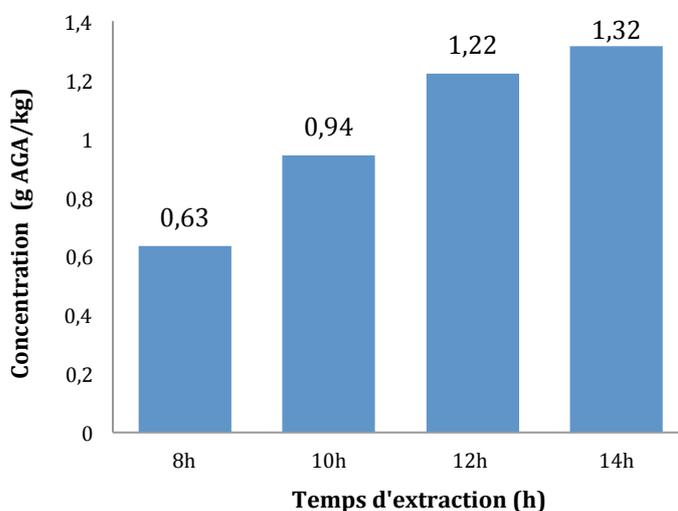


Figure 27: Effet du temps d'extraction sur la teneur totale en polyphénols.

La durée d'extraction (8, 10, 12 heures et 14 h d'extraction) a été réalisée à une température de 70 °C. Trois cycles ont été réalisés pour chaque temps d'extraction.

I.2.2. Effet du solvant d'extraction sur la teneur en polyphénols

Les résultats de la Figure 28 montrent que l'éthanol semble être plus approprié que l'acétone pour l'extraction des polyphénols des grignons d'olive et ce pour tous les échantillons.

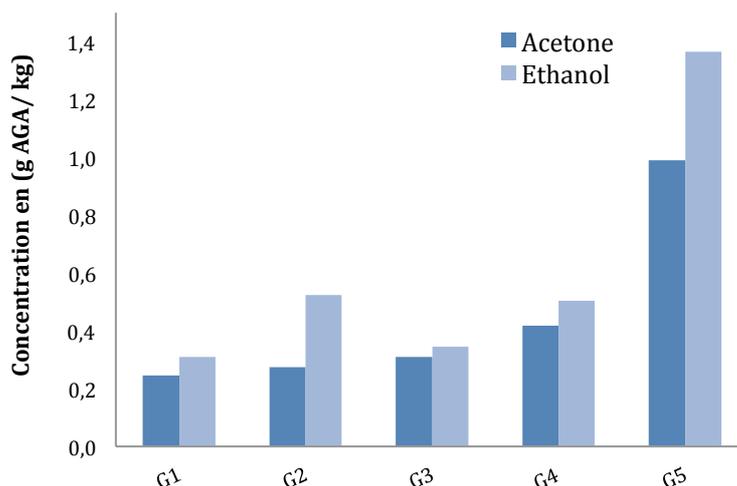


Figure 28 : Effet du solvant d'extraction sur la teneur totale en polyphénols.

G1 à G5 : extraits phénoliques de 5 cinq échantillons de grignons. Les échantillons ont subi les mêmes conditions d'extractions (temps : 12h, température : 70 °C, nombre de cycles : 3) pour les deux solvants.

1.2.3. Effet de la période de collecte et du temps de stockage d'olives

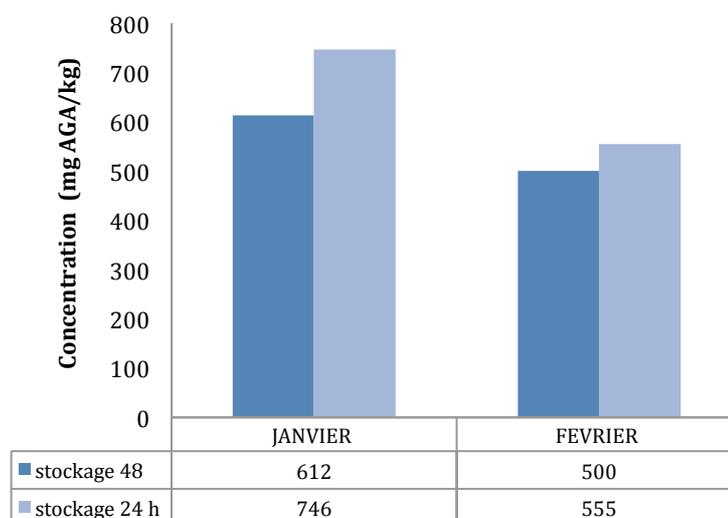


Figure 29: Effet du temps de stockage d'olive avant trituration et de la période de collecte sur la teneur en polyphénols totaux (mg/kg).

D'après la Figure 29, les échantillons récoltés en janvier sont plus riches en polyphénols que ceux récoltés en février. Aussi, les échantillons dérivés d'olives qui n'ont pas subi une longue durée de stockage avant trituration renferment une teneur plus élevée que ceux stockés longtemps. L'effet de la période de collecte et du temps de stockage des olives avant trituration est aussi important que l'effet du solvant et du temps d'extraction.

I.3. Détermination de la teneur totale en polyphénols dans les extraits des margines et des grignons

Le détermination de la teneur en polyphénols totaux est la deuxième étape de la caractérisation des grignons et des margines d'olive. Après extraction des polyphénols des grignons (extraction à l'éthanol) et des margines (extraction à l'acétate d'éthyle), leur teneur totale a été dosée et ce pour dix échantillons originaires de dix zones bioclimatiques de la région Tadla-Azilal répartis entre plaine (Béni Mellal, Fkih ben salah, Afourar, Bni âyat, et Krazza) et montagne (Azilal, Taghzirt, El Ksiba , Demnat et Aourir).

Les gammes étalon ont été élaborées en utilisant l'acide gallique. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6: Teneur totale en polyphénols dans les extraits des grignons et des margines.

Sites de collecte	Teneur en polyphénols totaux des grignons (g AGA/kg) ^a	Teneur en polyphénols totaux des margines (g AGA /l) ^b
Béni Mellal	0,555±0,002	5,29±0,153
Taghzirt	0,692±0,095	8,80±0,728
El Ksiba	0,950±0,017	5,27±0,163
Fkih ben salah	0,5±0,018	3,61±0,131
Bni âyat	0,404±0,003	4,09±0,03
Krazza	0,492±0,001	1,32±0,040
Afourar	0,551±0,027	5,17±0,057
Azilal	0,970±0,041	10,10±0,015
Demnat	0,746±0,003	6,84±0,010
Aourir	0,612±0,021	5,23±0,083

Les résultats représentent la moyenne de deux expérimentations indépendantes ± l'écart type de deux répétitions chacune.

^a Teneur en polyphénols totaux exprimée en gramme d'acide gallique par kilogramme de matière sèche de grignons.

^b Teneur en polyphénols totaux exprimée en gramme d'acide gallique par litre de margines.

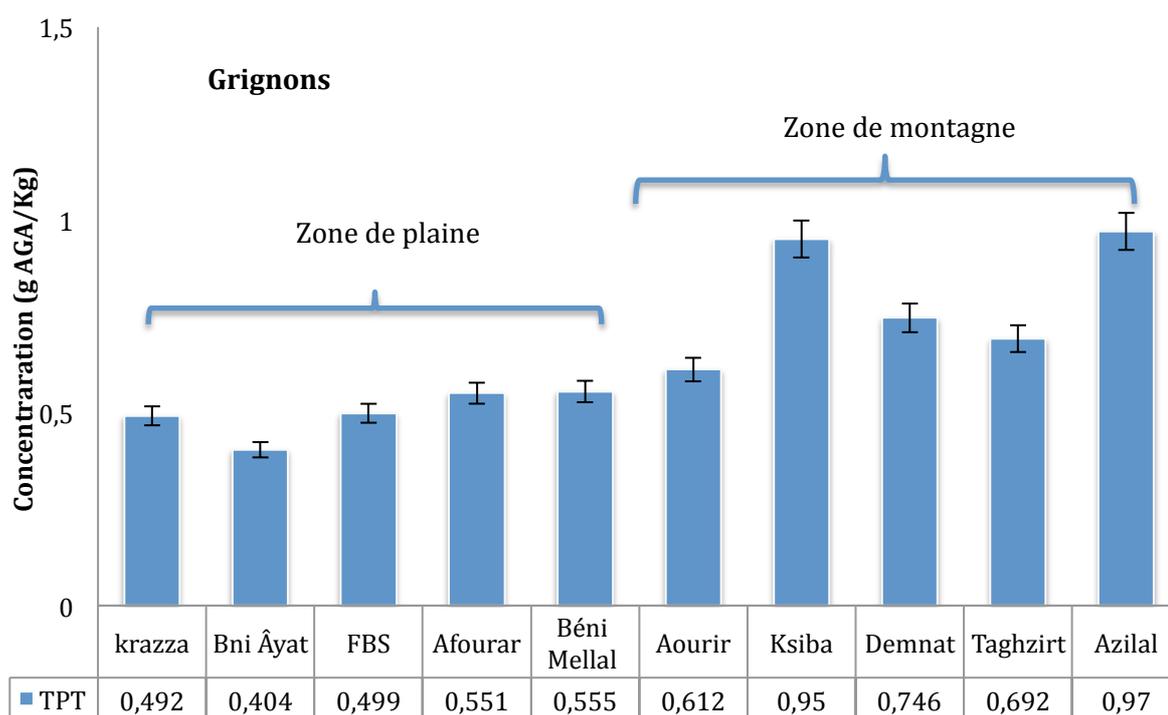
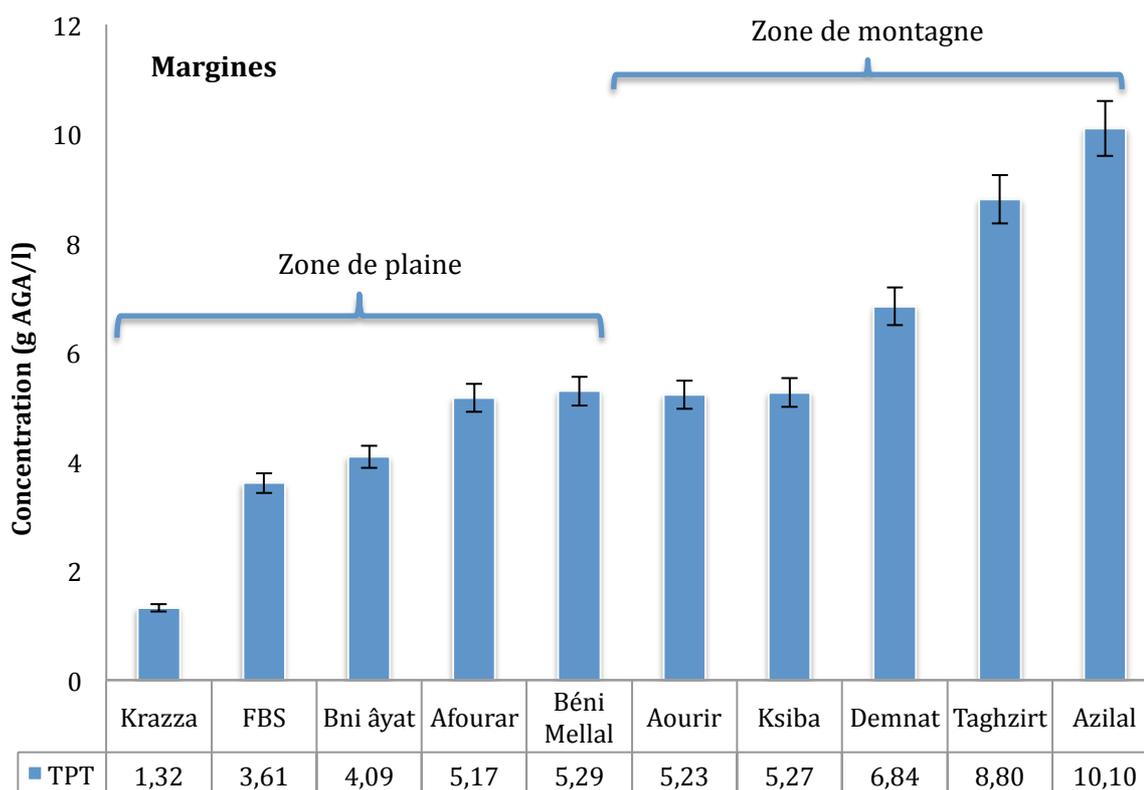


Figure 30: Teneur en polyphénols totaux dans les extraits phénoliques des grignons et des margines d'olive.

La quantification des polyphénols totaux dans les extraits phénoliques des grignons et des margines était faite pour dix sites de collecte de la région Tadla-Azilal. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes de deux répétitions chacune.

TPT : Teneur en Polyphénols Totaux

Comme cela a été cité précédemment dans la littérature, ces résultats confirment la richesse des margines en polyphénols totaux, en concentration 10 fois plus élevée que les grignons. Aussi, la teneur totale en composés phénoliques est fortement corrélée à l'origine géographique.

Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées dans les zones montagneuses aussi bien pour les extraits des grignons que pour ceux des margines (Figure 30). Ainsi, pour les grignons, les concentrations en polyphénols des extraits des zones de montagne : El Ksiba , Azilal et Demnat sont de l'ordre de 0,950 g/kg, 0,970 g/kg et 0,746 g/kg, respectivement. Pour les margines les concentrations les plus élevées en polyphénols ont été enregistrés dans les extraits originaires des périmètres d'Azilal, de Taghzirt et Demnat avec 10,10 g/l, 8,80 g/l et 6,84 g/l, respectivement. Au niveau des zones de plaine, les échantillons analysés présentent des valeurs moyennes de l'ordre de 0,5 g/kg pour les grignons et de 3,90 g/l pour les margines.

I.4. Discussion

La composition chimique des grignons caractérisée par infra-rouge estimée similaire à celle des acides humiques, est riche essentiellement en composés phénoliques, acides aminés et minéraux (Kolokassidou et al. 2009). Les groupements et liaisons chimiques identifiés (Fig. 25) constituaient une base pour l'identification de cette composition caractérisée également par Aranda et al. (2007) et Dermeche et al. (2013) qui confirment que, en plus des carbohydrates (polysaccharides, cellulose et hémicellulose), protéines et minéraux, les grignons sont essentiellement riches en composés phénoliques (acides, sucres, mélanine et lignine). En ce qui concerne les margines, les groupements chimiques détectés (Fig. 26) suggèrent la présence de composés organiques tel que les acides gras et les composés phénoliques en plus de l'eau, majeur constituant des margines (Dermeche et al. 2013; Piotrowska et al. 2006 ; Leasage Meessen et al. 2001).

Cette composition, et plus particulièrement la fraction phénolique, peut varier en fonction de plusieurs paramètres. D'après les travaux de Leasage-Meessen et al. (2001) ; Allouche et al. (2004); Obied et al. (2005); Dermeche et al. (2013), la variété d'olive et sa maturité, les conditions climatiques et géographiques, les pratiques de cultures d'olivier, et le système d'extraction d'huile sont les principaux facteurs d'influence. En effet, la teneur totale en composés phénoliques dans nos extraits semble être fortement corrélée à l'origine bioclimatique (Figure 30). Les valeurs les plus élevées ont été trouvées dans les extraits

originaires des zones montagneuses (elles varient entre 5,23 et 10,10 g/l pour les margines et entre 0,612 à 0,970 g/kg, pour les grignons), ce qui met en évidence l'impact des conditions géographiques et climatiques sur la détermination de la teneur en polyphénols dans les plantes (Dermeche et al. 2013 ; Obied et al. 2005 ; De Marco et al. 2007).

En effet, la région de Tadla-Azilal est caractérisée par un climat continental avec un froid intense en hiver et un été très chaud. La température varie de 3°- 4 °C à 48 - 50 °C avec une grande variation de précipitations. Les régions montagneuses sont caractérisées par des sols pauvres et de larges périodes de sécheresse par rapport aux zones de plaine caractérisées par des sols riches et irrigués (Juili et al. 2013), ce qui peut suggérer un important degré de stress environnemental principalement dans les zones montagneuses. Dans cette perspective, Boscaiu et al. (2010) ont trouvé une corrélation positive entre le degré du stress environnemental (la nature du sol, les variations de température et la sécheresse) et la teneur en composés phénoliques accumulés dans les plantes. Ainsi, cette corrélation indique l'importance des métabolites secondaires, en particulier les polyphénols, dans les mécanismes de défense des plantes contre le stress environnemental.

Toutefois, les teneurs en polyphénols dans les margines rapportées dans la littérature oscillent entre 2 à 5,5 g/l pour les margines italiennes et françaises (Leasage-Meessen et al. 2001 ; De Marco et al. 2007 ; Piotrowska et al. 2006), et de 10 à 12 g/l pour les margines tunisiennes et marocaines (Noubih et al. 2007; Ben Sassi et al. 2006), et peuvent atteindre les 50 g/l pour les margines égyptiennes (Afify et al. 2009). Le dosage des polyphénols dans nos extraits des margines avec des concentrations qui atteignent les 10 g/l pour les extraits des zones de montagne et les 5,23 g/l pour les zones de plaine, reste dans le même ordre de grandeur que celui avancé dans la littérature à l'exception des travaux de Afify et al. (2009) où la teneur en polyphénols totaux dépasse largement les teneurs déterminées dans nos extraits.

Par ailleurs, dans les extraits des grignons de certains travaux antécédents, les teneurs en polyphénols sont de l'ordre de 2 à 21 g/kg pour les grignons australiens, italiens et jordaniens (Aranda et al. 2007 ; Alu'Datt et al. 2010 ; Obied et al. 2007) et peuvent dépasser les 33 g/kg pour les grignons portugais (Ramos et al. 2013). Avec de tels teneurs, les valeurs que nous avons déterminées sont 15 à 20 fois au dessous de la moyenne. Toutefois, il faut tenir compte que nous ne comparons pas les extraits phénoliques des sous-produits d'huile d'olive dérivés de la même espèce et mode de culture d'olivier, ni du même système d'extraction d'huile.

Aussi, les conditions d'extraction des polyphénols ne sont pas les mêmes.

Les composés phénoliques sont détectés en concentrations variables dans les sous-produits d'huile d'olive en fonction aussi de leur polarité influençant ainsi leur répartition dans les grignons et les margines. Les margines se caractérisent par une teneur totale en polyphénols plus élevée que celle des grignons. La richesse des margines en polyphénols, de nature humique (Hamdi et Garcia., 1991), plus grande que celle de la phase huileuse et des résidus solides (grignons), résulte des propriétés amphiphiles, mais essentiellement hydrophiles de ces composés (Graille, 2003 ; Léger, 1999). En effet, les caractéristiques chimiques des composés phénoliques solubles dans l'eau induisent la différence de répartition entre l'eau et l'huile, et la majeure partie de ces composés migrent à partir des grignons (déchets solides) vers les margines (la phase liquide), ce qui procure à ces derniers une richesse en polyphénols 5 à 10 fois plus élevée que les grignons (Dermeche et al. 2013).

Nous avons remarqué également que la teneur en polyphénols totaux est différente d'un échantillon à un autre appartenant à la même zone géographique. Cela peut s'expliquer par la dégradation des composés phénoliques dans l'échantillon dans le cas de longue durée de stockage des olives avant trituration, par conséquent une diminution de la teneur en polyphénols par l'action de l'oxydation (Dermeche et al. 2013 ; Khoufi et al.2006 ; Roig et al. 2006; Bazoti et al. 2006) et/ou au système d'extraction d'huile utilisé (Chimi, 2006).

Par ailleurs, il a été démontré que l'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale et dépend d'un certain nombre de paramètres influençant directement la teneur en polyphénols dans les extraits. Nous avons montré que l'éthanol est le solvant le plus approprié à l'extraction des polyphénols des grignons par rapport à l'acétone (Fig. 28) et ce à un temps d'extraction estimé à 12 heures à une température de 70 °C pendant 3 cycles continus (Fig. 27). L'influence de la période de collecte et la durée de stockage des olives avant trituration a aussi été évaluée (Fig. 29). Les échantillons collectés à une période précoce de la campagne oléicole (Janvier) et qui n'ont pas étaient stockés longtemps (24h) contiennent une quantité en polyphénols plus élevée que les échantillons collectés tardivement (Février) et qui ont été stockés plus longtemps (48h).

En effet, une méthode et un solvant appropriés préservent en totalité les propriétés biologiques de ces principes actifs. Chaque groupe de polyphénols procure un procédé et un solvant d'extraction approprié. Pour les polyphénols des résidus solides (grignons), l'extraction à l'éthanol ou à l'acétone est la meilleure technique utilisée (Mahmoud et al.

2013; Druzynska et al. 2007). Les résultats de Mohsen & Ammar, (2009) ont montré que l'éthanol était le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques, suivi du méthanol et de l'eau. Obied et al. (2005) a pu démontrer que la fraction éthanolique contient la teneur la plus élevée en polyphénols présents dans les grignons en comparaison aux fractions extraites par l'hexane et l'acétone.

D'autres études similaires (Visioli et al. 1999 ; De Marco et al. 2007) considèrent l'acétate d'éthyle comme le solvant le plus approprié à l'extraction des composés phénoliques des margines, en raison de sa haute sélectivité aux composés hydrosolubles, principalement les sucres et ainsi les composés phénoliques qui y sont liés, en particulier les phénols glycosides, présents en grande concentration dans les margines.

Le temps d'extraction joue aussi un rôle important dans la détermination de la quantité en polyphénols. D'après les travaux de Alu'Datt et al. (2010), le temps, la température et le nombre de cycles influencent directement la teneur totale en composés phénoliques.

Enfin, nombreuses études ont mis en évidence l'effet de la période de récolte (Roig et al. 2006) et de stockage des olives avant trituration (Bazoti et al. 2006) sur la quantité en polyphénols dans les sous produits d'huile. En effet, nombreux auteurs recommandent la collecte des olives à un stade précoce de la campagne oléicole ainsi que la trituration des olives juste après la cueillette ou leur stockage dans de bonnes conditions (Obied et al. 2005 ; Dermeche et al. 2013 ; Allouche et al. 2004) afin de préserver les caractéristiques qualitatives et quantitatives des composés phénoliques à extraire.

En résumé, les grignons et les margines sont essentiellement riches en composés phénoliques. Le dosage des polyphénols a montré que les extraits des margines sont plus riches en polyphénols que ceux des grignons et que les extraits originaires des zones montagneuses possèdent les teneurs les plus élevées que ceux issus des zones de plaine. Cette teneur dépend essentiellement des conditions climatiques et géographiques de la région Tadla-Azilal; l'effet du stress environnemental en est le principal facteur.

II. Caractérisation des extraits phénoliques des grignons et des margines par HPLC-MS

Les extraits phénoliques des grignons et des margines ont ensuite été analysés par la HPLC-MS afin d'identifier et caractériser les composés phénoliques présents dans les grignons et les margines. Les échantillons (extraits phénoliques) des grignons analysés sont ceux originaires de Béni Mellal, Krazza, Azilal et Aourir. Par rapport aux grignons, le nombre d'échantillons des margines était enrichi. Les extraits analysés sont ceux originaires de Béni Mellal, Krazza, Aourir, Azilal, en plus de Fkih Ben Salah et Taghzirt afin de se rapprocher davantage de la composition phénolique des margines qui a été évaluée 10 fois plus riche que celle des grignons. Le choix des échantillons se justifie par la différence bioclimatique des zones étudiées (plaine/montagne).

L'identification des polyphénols a été réalisée par interprétation des spectres de masse correspondant à chaque pic (m/z) et confirmée par comparaison des temps de rétention avec ceux de la littérature (Figures 31 et 32). Cinq classes de polyphénols ont pu être identifiées aussi bien dans les extraits des grignons que ceux des margines: les phénols simples, les dérivés sécoïridoïdes, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les lignanes.

Les tableaux 7 et 8 regroupent les principaux composés identifiés dans les extraits des grignons et des margines, respectivement.

II.1. Identification des composés phénoliques présents dans les extraits des grignons

En général, 34 composés phénoliques ont été identifiés dans l'ensemble des extraits phénoliques des grignons répartis entre zones de plaine et de montagne (Figure 31, Tableau 7).

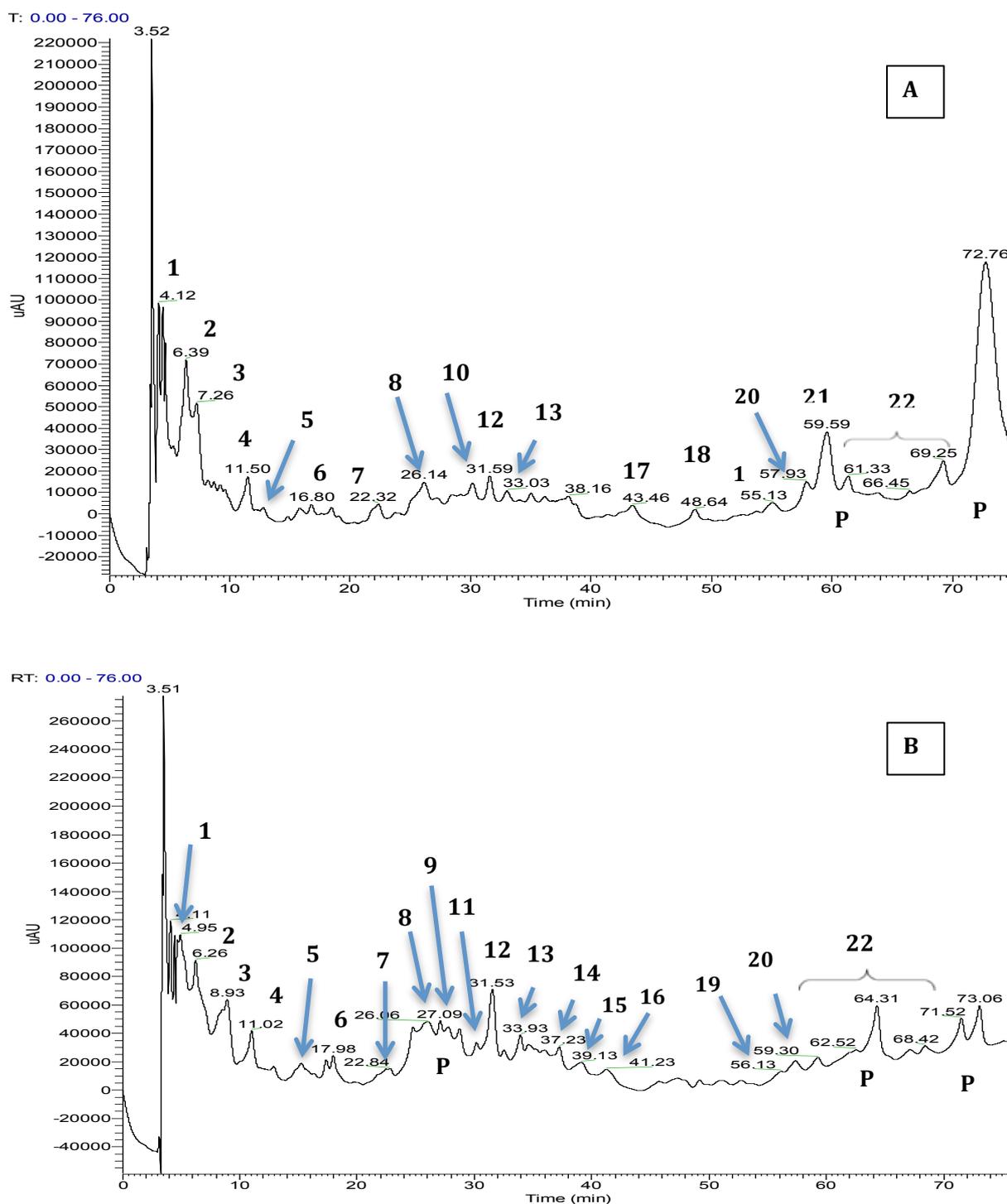


Figure 31 : Chromatogrammes HPLC du profil phénolique des extraits des grignons.

A: extrait d'une zone de plaine (Béni Mellal) ; B : Extraits d'une zone de montagne (Azilal)

Identification des pics: (1) Hydroxytyrosol glucoside, (2) Hydroxytyrosol, (3) Tyrosol, (4) Acide Vanillique, (5) Acide Sinapique, (6) Acide Syringique, (7) Acide Caféique, (8) Acide Elénolique , (9) Oleuropéine aglycone, (10) Verbascoside, (11) Rutine, (12) Lutéoline, (13) Quercétine, (14) Lutéoline-7-rutinoside, (15) Lutéoline-7-glucoside, (16) Apigénine, (17) Methoxylutéoline, (18) Naringénine (19) Ligstroside aglycone, (20) Ligstroside, (21) Oleuropéine, (22) dérivés sécoïridoïdes, (P) Substances polymériques.

Tableau 7: Composition phénolique des extraits des grignons.

Composés	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ m/z	Plaine		Montagne		Références ^b
		Béni Mellal	Krazza	Azilal	Aourir	
Les phénols simples						
Hydroxytyrosol	155/153	ID	ID	ID	ID	1, 2, 3, 5, 7, 10, 15
Tyrosol	139/137	ID	ID	ID	ID	1, 2, 3, 5, 8, 11, 14
Les acides phénoliques						
Ac. Vanillique	169/167	ID	ID	ID	ID	3, 4, 7, 9, 14, 15
Ac. Caféique	181/179	ID	ID	NI	ID	1,2, 4, 5, 6, 12, 15
Ac. Sinapique	225/223	ID	ID	ID	ID	4,14
Ac. 3,4,5 triméthoxybenzoïque	213/211	ID	ID	ID	ID	17
Ac. Dihydroxymandélique	185/183	ID	ID	ID	NI	3
Vanilline	153/151	ID	ID	ID	ID	2, 4, 5, 9,18
Les dérivés sécoïridoïdes						
Oleuropéine	541/539	ID	ID	ID	ID	1, 2, 3, 7, 9, 12, 13
3,4-DHPEA-EA ^c	379/377	ID	NI	ID	ID	2, 5, 7, 8, 15
3,4-DHPEA-EDA ^c	321/319	ID	NI	NI	NI	2, 7
Dérivés Oleuropéine	309/307	NI	ID	NI	ID	2, 7, 8
Dérivés Oleuropéine	369/367	NI	NI	ID	ID	7, 2
Ac. Elénolique	243/241	ID	ID	ID	ID	2, 3, 5, 7, 14, 15
Ligstroside	525/523	ID	NI	ID	ID	1, 2, 3, 4
p-DHPA-EA ^c	363/361	NI	ID	ID	NI	2, 5, 7, 8, 15
Dérivés Ligstroside	337/335	ID	NI	ID	NI	2, 8,9
Dérivés Ligstroside	395/393	ID	ID	NI	ID	8
Dérivés Ligstroside	293/291	ID	NI	ID	ID	8
3,4-DHPEA-AC ^c	197/195	NI	NI	NI	ID	2, 3, 5
Hydroxytyrosol glucoside	317/315	ID	ID	ID	ID	3, 7, 9
Oléoside	391/389	ID	NI	NI	NI	1, 3, 4, 9
11-Methyl-oleoside	405/403	NI	ID	NI	NI	9
Verbascoside	625/623	ID	ID	NI	NI	1, 3, 4, 9
Les flavonoïdes						
Apigénine	271/269	NI	ID	ID	ID	1, 2, 4, 5, 14, 15
Lutéoline	287/285	ID	ID	ID	ID	1, 2, 3, 5, 9, 8,14
Lutéoline-7-glucoside	449/447	NI	NI	ID	ID	1, 2, 3, 4, 5, 9, 15
Lutéoline-7-rutinoside	595/593	NI	NI	NI	ID	9,4
Methoxyluteoline	301/299	NI	ID	NI	ID	8
Naringénine	273/271	NI	ID	ID	NI	16
Nüzhenide	685/683	NI	ID	ID	NI	15
Quercétine	303/301	ID	NI	ID	NI	1,4, 14
Rutine	611/609	NI	NI	NI	ID	1, 2, 4, 5, 6, 9, 14
Les lignanes						
Pinorésinol	359/357	NI	NI	NI	ID	2, 5, 14, 15

ID: Identifié ; NI : Non Identifié.

^a Masse/Charge (m/z) en mode positif.

^b (1) Obied et al. (2007), (2) Suarez et al. (2009), (3) Aranda et al. (2007), (4) Dermeche et al. (2013), (5) Serra et al. (2012), (6) Allu'datt et al. (2010), (7) Ramos et al. (2013), (8) De La Torre Carbot et al. (2005), (9) Cardoso et al. (2005), (10) Romero et al. (2002), (11) Alhamad (2012), (12) Obied (2008), (13) Amro (2002), (14) Obied et al. (2005), (15) Suarez et al. (2010), (16) Mc Donald et al. (2001), (17) Juarez et al. (2008), (18) Leesage-Meessen (2001), 19 Dobson and Christie (2002).L

^c 3,4-DHPEA-EA : Oleuropein aglycon, p-DHPA-EA: Ligstroside aglycon, 3,4-DHPEA-EDA: Oleuropein aglycon isomère en forme aldéhyde, 3,4-DHPEA-AC : Hydroxytyrosol acétate.

Comme première remarque, la composition phénolique est variable d'une zone géographique à l'autre et aussi entre les échantillons de la même zone géographique.

Les composés les plus abondamment identifiés sont l'hydroxytyrosol et le tyrosol comme phénols simples, suivi par les dérivés sécoïridoïdes notamment l'oleuropein, ligstroside, l'hydroxytyrosol glucoside, l'acide élénolique, le verbascoside et ligstroside aglycon. Viennent ensuite les flavonoïdes : la lutéoline et ses dérivées, la quercétine et la naringénine. Enfin, pour les acides phénoliques, nous avons identifié l'acide vanillique, caféique, 3,4,5 trimethoxybenzoïque, sinapique et la vanilline. Les lignanes (pinorésinol) ont été détectés uniquement dans les grignons d'Aourir.

II.2. Identification des composés phénoliques présents dans les extraits des margines

45 composés phénoliques ont pu être identifiés dans l'ensemble des extraits des margines des six périmètres analysés aussi bien de la zone de plaine que de montagne. (Figure 32, Tableau 8).

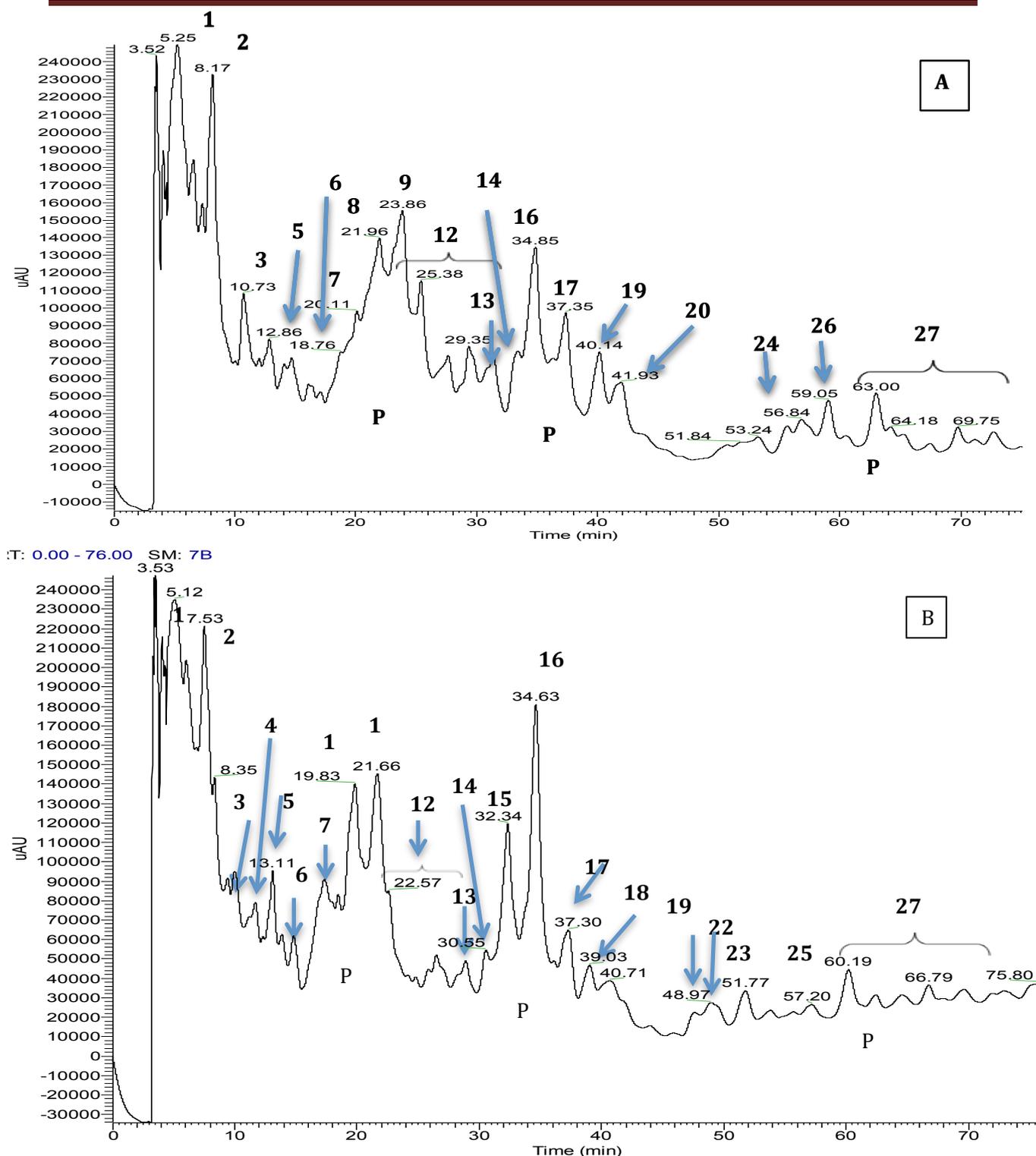


Figure 32: Chromatogrammes HPLC d'extraits phénoliques de margines.

A: extrait d'une zone de plaine (Béni Mellal) ; B : Extraits d'une zone montagneuse (Azilal)

Identification des Pics: (1) Hydroxytyrosol glucoside, (2) Hydroxytyrosol, (3) Tyrosol, (4) acide Vanillique, (5) Acide Sinapique, (6) Acide Syringique, (7) Acide Cafféique, (8) Acide p-coumarique, (9) Acide Dihydroxymanelique, (10) Vanilline, (11) Acide 3,4,5 Trimethoxybenzoïque, (12) Dérivés sécoïridoides, (13) Verbascoside, (14) Rutine, (15) Lutéoline-7-rutinoside, (16) Lutéoline-7-glucoside, (17) Lutéoliné, (18) Apigénine, (19) Nüzhenide, (20) Quercétine, (21) Apigénine-7-rutinoside, (22) Apigénine-7-glucoside, (23) Oleuropéine, (24) Oleuropéine aglycone, (25) Ligstroside, (26) Ligstroside aglycone, (27) Dérivés sécoïridoides (P) Substances polymériques.

Tableau 8: Identification des composés phénoliques dans les extraits des margines.

Composés	[M-H] ⁻ (m/z)	Régions de plaine			Régions de montagne			Références*
		Béni Mellal	Krazza	FBS	Azilal	Aourir	Taghzirt	
Les phénols simples								
Hydroxytyrosol	153	ID	ID	ID	ID	ID	ID	1, 3, 4, 5,
Tyrosol	137	ID	ID	ID	ID	ID	ID	3, 4, 5, 6, 14
Les acides phénoliques								
Ac. Vanillique	167	NI	NI	NI	ID	ID	NI	9 14
Ac. Cafféique	179	NI	ID	ID	NI	ID	ID	1, 4, 5, 6,
Ac. p-coumarique	163	NI	ID	NI	NI	NI	NI	3, 4, 7, 13
Ac. Sinapique	223	ID	ID	NI	NI	NI	ID	2, 13
Ac. Syringique	197	ID	NI	NI	ID	NI	NI	2, 3, 7, 13
Ac. Caffeol quinique	353	ID	NI	NI	NI	NI	NI	9
Ac. Dihydroxymandelique	183	NI	NI	NI	NI	ID	ID	12
Ac. 3,4,5 triméthoxybenzoïque	211	NI	ID	ID	ID	ID	NI	7
Ac. Tetrahydroxymandelique	215	NI	ID	NI	NI	NI	NI	12
Vanilline	151	NI	NI	NI	ID	NI	NI	4, 9, 13
Les dérivés sécoïridoïdes								
Oleuropein	539	NI	NI	ID	NI	ID	ID	1, 9, 13, 14, 16
3,4-DHPEA-EA ^c	377	NI	ID	ID	NI	NI	NI	9
3,4-DHPEA-EDA ^c	319	ID	NI	NI	NI	NI	NI	5
ME 3,4 DHPEA-EA ^c	409	ID	NI	ID	NI	ID	ID	11
Dérivés Oleuropein	333	NI	NI	NI	NI	NI	ID	10
Dérivés Oleuropein	365	NI	NI	ID	NI	NI	ID	11
Dérivés Oleuropein	307	NI	NI	NI	NI	NI	ID	10
Ligstroside	523	NI	NI	ID	ID	ID	ID	10, 13
p-DHPA-EA ^c	361	ID	NI	ID	NI	NI	NI	5,
Dérivés Ligstroside	337	ID	NI	ID	NI	NI	ID	10
Dérivés Ligstroside	393	NI	ID	ID	NI	ID	NI	10
Dérivés Ligstroside	291	NI	NI	ID	NI	NI	NI	10
Ac. Elénolique	241	NI	NI	NI	ID	NI	NI	12
Ac. Elénolique glucoside	405	NI	ID	NI	NI	NI	NI	2
3,4-DHPEA-AC ^c	195	ID	NI	NI	NI	NI	NI	12
Hydroxytyrosol glucoside	315	ID	ID	ID	ID	ID	ID	8
Oleoside	389	ID	NI	NI	NI	ID	NI	9
11-méthyl-oleoside	403	NI	NI	NI	NI	ID	ID	9
6-β-glucopyranosil-oleoside	551	NI	ID	NI	NI	NI	ID	9
Verbascoside	623	ID	ID	ID	ID	NI	NI	1, 5, 9, 14
Les flavonoïdes								
Apigénine	269	NI	NI	ID	NI	NI	ID	1, 2, 10,13
Apigénine-7-glucoside	477	NI	ID	NI	NI	ID	ID	2, 13
Apigénine-7-rutinoside	577	NI	NI	ID	ID	ID	ID	2, 13
Lutéoline	285	ID	NI	NI	ID	NI	NI	2, 5, 10,13
luteoline-7-glucoside	447	ID	NI	NI	ID	NI	NI	5, 9, 13, 14
Luteoline-7-rutinoside	593	NI	NI	NI	ID	ID	ID	2, 9, 13
Méthoxyluteoline	299	NI	NI	ID	NI	NI	NI	10
Naringénine	271	NI	ID	NI	NI	NI	ID	17
Nüzhenide	685	ID	NI	ID	NI	ID	ID	2, 15
Quercétine	301	NI	ID	NI	NI	NI	NI	1, 13
Rutine	609	ID	NI	ID	ID	NI	NI	9, 13, 14
Les lignanes								
Pinoresinol	357	NI	ID	NI	ID	ID	ID	2
1-Acétoxypinoresinol	415	ID	NI	NI	ID	NI	ID	2

ID : Identifié ; NI: Non Identifié. ^a Masse/Charge (m/z) en mode négatif.

^b (1) Obied et al. (2007), (2) Obied et al. (2005), (3) Bertin et al. (2011), (4) Lesage-Meessen et al. (2001), (5) De Marco et al. (2007), (6) Allouche et al. (2004), (7) Juarez et al. (2008), (8) Ramos et al. (2013), (9) Cardoso et al. (2005), (10) De La Torre Carbot et al. (2005), (11) Suarez et al. (2009), (12)

Aranda et al. (2007), (13) Dermeche et al. (2013), (14) Romero et al. (2002), (15) Silva et al. (2006), (16) Visioli et al. (2002), (17) McDonald et al (2001).

^c 3, 4-DHPEA-EA : Oleuropein aglycon, p-DHPA-EA: Ligstroside aglycon, 3,4-DHPEA-EDA : Oleuropein aglycon isomère en forme aldéhyde, ME 3,4 DHPEA-EA : oleuropein aglycon en forme méthylée, 3,4-DHPEA-AC : Hydroxytyrosol acétate.

D'après le tableau 8, la composition phénolique des margines varie également d'une zone géographique à l'autre et d'un échantillon à l'autre appartenant à la même zone géographique. En comparaison à la composition phénolique des grignons, les mêmes familles de polyphénols ont été identifiées dans les extraits phénoliques des margines. Ainsi, les résultats du tableau 8 montrent la présence des phénols simples dans l'ensemble des extraits des margines: hydroxytyrosol et le tyrosol. Nous avons identifié également les dérivés sécoïridoïdes : oleuropein et ligstroside, l'hydroxytyrosol glucoside, l'acide élénolique et son isomère : l'acide élénolique glucoside et le verbascoside. Les flavonoïdes ont aussi étaient détectés dans la majorité des extraits phénoliques notamment la lutéoline, la lutéoline-7-glucoside, l'apigénine-7-glucoside et la nüzhenide. Les acides phénoliques, quand à eux, sont aussi présents dans les extraits des margines. Les acides les plus identifiés sont l'acide vanillique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique et l'acide sinapique. Par rapport aux extraits des grignons, les lignanes : le pinorésinol et le 1-acétoxy-pinorésinol ont été détectés dans l'ensemble des extraits testés sauf dans l'extrait de Fkih Ben Salah.

Compte tenu des résultats des figures 31 et 32, des molécules à masse moléculaire supérieure à 1000 Da (de 800 à 2000 Da) ont été détectées sous forme de large pic. Aussi, différents composés non identifiés ont été observés à diverses masses (m/z) produisant de multiples fragments d'ions MS. Des techniques comme la LC-MS/MS combinée à LC-UV sont nécessaires pour l'identification et la caractérisation de ces composés.

II.3. Discussion

L'objectif de ce chapitre était d'identifier les polyphénols dans les extraits des grignons et des margines originaires des différentes zones bioclimatiques de la région Tadla-Azilal. Après avoir déterminé la teneur en polyphénols totaux dans le chapitre précédent, nous avons identifié les composés phénoliques dans ces mêmes extraits. Cela nous donne un point de repère pour les prochains chapitres qui traiteront de l'effet inhibiteur des composés phénoliques sur les activités antioxydante, anti-radicalaire, antibactérienne et antitumorale. En effet, nous aurons besoin de déterminer les concentrations inhibitrices de ces extraits phénoliques naturels dans les tests *in vitro* et de comparer leur effet à celui des produits chimiques témoins.

Dans la deuxième partie de ce chapitre et en utilisant la HPLC-MS, 34 composés ont été identifiés dans les extraits des grignons et 45 composés dans ceux des margines, confirmant ainsi la richesse des sous-produits d'huile d'olive marocaine en polyphénols. En fait, la composition phénolique dans ces extraits est très variable. D'après les travaux de Bianco et al. (2003) et Bertin et al. (2011), 10 à 20 composés phénoliques ont été identifiés dans les margines, tandis que Obied et al. (2007) et Suarez et al. (2009) ont pu en identifier entre 18 et 22 composés dans les extraits phénoliques des grignons. La liste des composés phénoliques identifiés dans les extraits des grignons et des margines n'a jamais été exhaustive, elle varie d'une étude à l'autre et d'une région à l'autre.

Compte tenu des résultats obtenus (Tableaux 7 et 8), la composition chimique diffère d'une zone à l'autre et aussi d'un échantillon à l'autre appartenant à la même zone géographique. Toutefois, l'ensemble des extraits analysés contient les cinq familles de polyphénols majoritaires identifiées à savoir les phénols simples, les acides phénoliques, les dérivés sécoïridoïdes, les flavonoïdes et les lignanes. Pour les grignons comme pour les margines, les composés majoritaires en matière d'abondance en polyphénols identifiés dans nos extraits sont les dérivés sécoïridoïdes, les phénols simples et les flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Suarez et al. (2010); Suarez et al. (2009); Ramos et al. (2013) et De Marco et al. (2007). En outre, compte tenu des résultats obtenus, la variation de la composition phénolique dans nos échantillons semble être fortement liée à l'impact des conditions bioclimatiques. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une caractérisation des polyphénols des grignons et des margines d'olive s'effectue en fonction de la zone géographique.

Ainsi, les régions montagneuses présentent une abondance en polyphénols en comparaison aux régions de plaine confirmant ainsi les résultats de la première partie de ce chapitre.

La composition phénolique des margines et des grignons a été étudiée dans différents travaux récents (Ramos et al. 2013 ; Dermeche et al. 2013 ; Bertin et al. 2011). Cette fraction phénolique était identifiée riche en hydroxytyrosol et en dérivés sécoïridoïdes et est caractérisée par une grande complexité (Obied et al. 2007; Bertin et al. 2011; Leasage-Meessen et al. 2001; Capasso et al. 1992; De Marco et al. 2007; Ramos et al. 2013). Ces données sont en accord avec nos résultats (Tableaux 7 et 8). En effet, nos résultats montrent que l'hydroxytyrosol est le composé identifié majoritaire dans les extraits phénoliques des grignons et des margines d'olives marocaines. L'hydroxytyrosol est le résultat de l'hydrolyse de l'oleuropéine (Capasso, et al.1994). Ce biophénol a été l'objet de nombreuses études. Il a été identifié et caractérisé dans les grignons et les margines d'olives et avait démontré son efficacité en tant qu'agent antioxydant majeur (Suarez et al. 2009 ; De Marco et al. 2007 ; Allouche et al. 2004), antiathérogène et cardio-protecteur (Obied et al. 2005; Visioli et al. 2002), chimio-préventif (Fabiani et al, 2002), antimicrobien (Obied et al. 2005 ; Bisignano et al, 1999), anti-inflammatoire (Obied et al. 2005 ; De La Puerta et al, 1999) et antiprolifératif (Ramos et al. 2013). Le tyrosol a aussi été détecté dans l'ensemble des extraits des margines et des grignons. Ce phénol était identifié dans les grignons d'olives caractérisé par son pouvoir antioxydant important (Obied et al. 2007).

Les dérivés sécoïridoïdes : oleuropéine, un ester de l'acide élénolique et de l'hydroxytyrosol, identifié également parmi les composés majoritaires dans les extraits des grignons et des margines. Ce composé a été identifié dans différentes études (Suarez et al. 2009, Romero et al ; 2002 ; Dermeche et al. 2013; Visioli et al. 2002, Obied et al. 2008) par son important pouvoir antioxydant, antimicrobien et cardio-protecteur. Il a été identifié dans l'ensemble des extraits des grignons, tandis que nous n'avons parvenu à l'identifier que dans trois extraits des margines. L'oleuropéine dans ces extraits a probablement été dégradé en acide élénolique et hydroxytyrosol par une estérase durant le processus d'extraction d'huile (Visioli et al. 2002). Ce fut probablement le cas de l'oleuropéine dans ces échantillons, vu leur richesse en hydroxytyrosol.

Le ligstroside et le verbascoside ont également été identifiés dans nos extraits. L'identification et la caractérisation de ces composés dans les extraits des sous produits d'huile diffèrent d'une étude à l'autre. Ils ont été caractérisés par De Marco et al. (2007) et

Obied et al. (2008) comme étant de bons agents antioxydants dans les résidus d'huile d'olive italienne et australienne. D'autres études ont focalisé leurs travaux plus particulièrement sur le verbascoside et ses multiples propriétés bénéfiques pour la santé (Liu et al. 2003). C'est un biophénol assez complexe caractérisé par son pouvoir antioxydant, chimio-préventif, anti-hypertensif, anti-inflammatoire et antimicrobien (Obied et al. 2008; Obied et al. 2005 ; Obied et al. 2007 ; Amro et al. 2002).

Autres dérivés sécoïridoïdes étaient détectés aussi bien dans les extraits des margines que ceux des grignons avec une abondance observée dans les extraits des margines en particulier ceux originaires des zones montagneuses. Les plus répondus sont 3,4-DHPEA-EA (oleuropéine aglycone) et son isomère en forme aldéhyde 3,4-DHPEA-EDA (Suarez et al. 2010 ; Suarez et al. 2009 ; Servili et al. 1999). Le 3,4-DHPEA-EDA et l'hydroxytyrosol glucoside, autres composés dérivés de l'oleuropéine étaient détectés dans nos extraits, ils ont été caractérisés comme étant des antioxydants majeurs (Suarez et al. 2009 ; De Marco et al. 2007; Obied et al. 2008, Amro et al. 2002). L'acide élénolique, principal fragment de la dégradation de l'oleuropéine, a été surtout trouvé dans les extraits des grignons. C'est un important agent antimicrobien et antiviral (Obied et al. 2005).

Concernant les dérivés du ligstroside, le plus abondant est le ligstroside aglycone (p-DHPA-EA). Ce composé a été caractérisé par Suarez et al. (2009); De Marco et al. (2007) et Ramos et al. (2013). D'autres dérivés de l'oleuropéine et du ligstroside ont été identifiés: hydroxytyrosol acétate: 3,4-DHPEA-AC; acide élénolique glucoside; oléoside ; 11-méthyl-oléoside ; 6- β -glucopyranosil-oléoside (Cardoso et al ; 2005 ; Aranda et al. 2007) aussi bien dans les margines que dans les grignons avec une légère abondance en richesse pour les extraits des margines (Tableaux 7 et 8). L'abondance de ces dérivés pourrait être expliquée par la dégradation des polyphénols qui pourrait être due au stockage des olives avant trituration et ou la collecte peu tardive de quelques échantillons; où l'oleuropéine et ligstroside sont dégradés en hydroxytyrosol, tyrosol et en divers ions fragments (De Marco et al. 2007; Capasso et al. 2002; Bianco et al. 2003).

Les flavonoïdes qui ont été identifiés dans nos extraits sont la lutéoline et ses dérivés; la lutéoline-7-glucoside et la lutéoline-7-ruthinoside. Ces composés ont été identifiés abondants dans les extraits des sous-produits d'huile de nombreux travaux antérieurs (Dermeche et al. 2013 ; De Marco et al. 2007, Suarez et al. 2009). L'apigénine et ses dérivés: l'apigénine-7-glucoside et l'apigénine-7-ruthinoside ont été trouvés uniquement dans les extraits des

margines contrairement aux résultats de Dermeche et al. (2013) qui les ont identifiés uniquement dans les extraits des grignons algériens. Toujours d'après les travaux de Dermeche et al. 2013, la quercetin, la naringénine et la vanilline peuvent aussi être considérées parmi les flavonoïdes les plus abondants en particulier dans les extraits des grignons (Cardoso et al. 2005 ; McDonald et al. 2001), confirmant ainsi nos résultats. Peu d'informations sur leurs propriétés biologiques sont disponibles, à part la quercétine qui a été caractérisée comme un agent anticancéreux prouvé (Lee et al. 2006). Enfin, la rutine, composé caractéristique des grignons (Romero et al. 2002; Cardoso et al. 2005) et la nüzhenide, principal phénol identifié dans le fruit d'olive (Silva et al. 2006 ; Servili et al. 1999) sont des composés très minoritaires dans nos extraits. Ces molécules disposent d'un pouvoir antioxydant important (Obied et al. 2005 ; Silva et al. 2006).

Concernant les acides phénoliques, l'acide sinapique, vanillique et caféique ont été identifiés dans la majorité des extraits (Tableaux 7 et 8). Ces composés sont les phénols les plus fréquemment signalés dans les grignons et les margines d'olive (Ramos et al. 2013 et Obied et al. 2008; Juarez et al. 2008, Obied et al. 2005). Ils sont caractérisés par leur pouvoir antioxydant, antiathérogène et anti-inflammatoire (De Marco et al. 2007 ; De La Puerta et al. 1999). L'acide p-coumarique et l'acide syringique (Bertin et al. 2011; Leasage-Meessen et al. 2001; Dermeche et al. 2013) ont été identifiés uniquement dans les extraits des margines. De nouveaux acides phénoliques ont été aussi détectés, l'acide dihydroxymandélique et tetrahydroxymandélique identifiés pour la première fois par Aranda et al. (2007), l'acide 3,4,5 triméthoxybenzoïque caractérisé par Juarez et al. (2008), et l'acide cafféol-quinique identifié par Cardoso et al. (2005).

Enfin, les lignanes (pinorésinol et 1-acetoxypinorésinol), composés minoritaires, leurs teneurs vont de simples traces à des proportions qui peuvent dépasser 1 % et atteindre dans certains cas les 3% (Milder et al. 2009) dans les extraits de plantes. Ils ont surtout été détectés dans les extraits des margines des zones montagneuses. Ces composés ont été caractérisés par Suarez et al. (2008) ; Suarez et al. (2009) et Serra et al. (2012) dans les grignons espagnols ainsi que dans les margines algériennes (Dermeche et al. 2013). Les données sur leurs activités biologiques ne sont pas bien développées dans la littérature. Néanmoins, des études récentes ont mis en évidence la relation entre la consommation des lignanes et la réduction du risque du cancer du sein post-ménopausique (Velentzis et al. 2009).

Les molécules à masse moléculaire supérieure à 1000 Da, identifiées dans la majorité des échantillons étudiés (Fig. 31 et 32), peuvent être attribuées à des substances polymériques en association avec les sécoïridoïdes mentionnés précédemment et les flavonoïdes glucosides. Nous émettons l'hypothèse que ces composés sont des polymères qui peuvent correspondre à des polysaccharides, à la mélanine et/ou à des protéines (Aranda et al. 2007 ; Dermeche et al. 2013 ; Capasso et al ; 2002 ; Hamdi et al. 1993).

Par conséquent, la fraction phénolique des margines et des grignons se caractérise par une grande diversité et varie fortement entre les études (Bianco et al. 2003 ; Servili et al. 1999). A titre d'exemple, Juarez et al. (2008) ont identifié dans les margines espagnoles : l'acide férulique, l'acide 3,4,5 triméthoxybenzoïque, et de l'acide p-hydroxybenzoïque. Visioli et al. (2002) ont rapporté que l'oleuropéine est le composé phénolique majeur dans les margines italiennes, alors que Allouche et al. (2004) n'ont pas réussi à identifier ce composé dans les margines tunisiennes. Parmi les principaux composés phénoliques qui ont été détectés dans les extraits des margines espagnoles, l'acide férulique, l'acide p-coumarique, l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide 3,4,5 triméthoxybenzoïque, et l'acide syringique, l'hydroxytyrosol, le tyrosol, le verbascoside, la lutoliné-7-glucoside, la rutine, et l'oleuropéine (Juarez et al, 2008 ; Romero et el. 2002). Dermeche et al. (2013) avaient détecté d'autres composés dans les margines algériennes: l'oleuropéine, le ligstroside, le verbascoside, la lutéoline et ses isomères, la quercétine, l'acide vanillique, l'acide cinnamique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide caféique, l'acide syringique, et l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique. D'autres études ont identifié dans les extraits des margines françaises (Lesage-Messen et al. 2001) et tunisiennes (Bouزيد et al. 2005): l'acide vanillique, l'acide férulique et la vanilline comme principaux polyphénols.

L'hydroxytyrosol, le tyrosol, le verbascoside, la lutéoline-7-glucoside, oleuropéine aglycone, le ligstroside, la lutéoline, le catéchol, l'acide gallique, l'acide syringique, l'acide p-coumarique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide 4-phényl acétique, et l'acide transcinammique ont été identifié en tant que composés majoritaires dans les margines italiennes (Capasso et al. 1992; Casa et al. 2003).

Par ailleurs, Dermeche et al. (2013) ont détecté d'autres composés dans les grignons algériens: l'acide gallique, l'acide cinnamique, luteolin-4-glucoside et hydroxytyrosol-10-b-glucoside. Dans les grignons jordaniens, les composés majoritaires sont : la catéchine, la protocatéchine, l'épicatéchine et l'acide benzoïque. D'autres études ont pu identifier dans les grignons

d'autres composés phénoliques majoritaires comme le tyrosol et l'hydroxytyrosol (Aranda et al. 2007; Fernandez-Bolanos et al. 2002; Allouche et al. 2004), l'oleuropéine (Mulinacci et al. 2001 ; Aranda et al ; 2007), l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique (Lesage-Meessen et al. 2001; Bianco et al. 2003), le verbascoside, l'acide élénolique (Mulinacci et al. 2001), le catéchol (Fiorentino et al. 2003) et la rutine (Romero et al. 2002). Des composés mineurs ont été également identifiés dans les grignons, il s'agit de l'acide caféoyl-quinique, la lutéoline glucoside-4, l'hydroxytyrosol-10-b-glucoside, la lutéoline-7-rutinoside, ligstroside et leurs dérivées, 11-méthyl oléoside, et l'oléoside (Cardoso et al. 2005 ; Dermeche et al. 2013).

D'une manière générale, la composition phénolique des sous-produits d'huile d'olive est caractérisée par une large complexité, elle peut varier d'une région et d'une étude à l'autre en fonction de plusieurs paramètres (Dermeche et al. 2013).

La deuxième partie de ce chapitre a permis de montrer que les margines et les grignons d'olives marocaines sont riches en polyphénols naturels notamment: les phénols simples (Tyrosol et hydroxytyrosol), les acides phénoliques (l'acide vanillique, p-coumarique, caféique, sinapique, et syringique), les flavonoïdes (lutéoline, apigénine et leur dérivées, la quercétine, la rutine et la vanilline), les dérivés sécoïridoïdes (oleuropein, ligstroside, verbascoside, oleuropéine aglycone, ligstroside aglycone, hydroxytyrosol glucoside, ...), et les lignanes (pinorésinol et 1-acetoxypinorésinol). Le dosage de ces composés phénoliques a montré que nos résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature pour les composés qui avaient déjà été quantifiés. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle caractérisation est réalisée sur les extraits phénoliques des grignons et des margines du Maroc. Les structures des composés majoritaires identifiés sont représentées en annexe.

CHAPITRE 4: Activité antioxydante et antimicrobienne *in vitro* des extraits phénoliques des grignons et des margines

Pendant ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, notamment les polyphénols, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a considérablement augmenté, pas uniquement pour les recherches scientifiques en santé humaine et produits alimentaires mais aussi pour le grand public (De Marco et al. 2007). En effet, les polyphénols sont connus depuis plusieurs décennies pour leur activité antioxydante (Harman 1954). Cette activité a été ensuite confirmée par des études plus récentes (Djeridane et al. 2006; Bertin et al. 2011; Ranalli et al. 2003, Amro et al. 2002 ; Visioli et al. 1999). L'inhibition de différents types de dommages oxydatifs a été étudiée (Paiva-Martins et al. 2001 ; Casalino et al. 2002 ; Deiana et al. 1999) en utilisant différentes méthodes de mesure de l'activité antioxydante, qui ont été évaluées ultérieurement (Antolovich et al. 2002, Obied et al. 2005).

Par ailleurs, l'activité antioxydante des extraits phénoliques des sous-produits d'huile d'olive (grignons et margines) avait déjà été testée (Obied et al. 2007 ; Bertin et al. 2011 ; Obied et al. 2008 ; Suarez et al. 2009). Ces essais *in vitro* ont permis de montrer un effet le plus souvent inhibiteur des réactions d'oxydation. L'un des premiers travaux traitant les sous-produits d'huile comme source potentielle d'antioxydants naturels a été publié en 1988 (Sheabar et Neeman, 1988).

L'activité antimicrobienne quand à elle, a été recensée au début du XX^{ème} siècle (Link 1929) mais a été rarement explorée. La plus part des travaux sur cette activité s'intéressaient aux conséquences écologiques et environnementales (Moreno et al. 1989) ou à des applications agronomiques (Capasso et al. 1995). L'activité antimicrobienne des extraits des sous produits d'huile d'olive a été rapidement reconnue et a été liée au contenu phénolique (Niaounakis et Halvadakis, 2004). En effet, l'activité des extraits phénoliques et des biophénols purifiés extraits des margines et des grignons a été testée contre plusieurs germes pathogènes de l'Homme (Bisignano et al. 1999; Aziz et al. 1998, Obied et al. 2007).

Au delà de la démonstration de l'activité antioxydante et antimicrobienne des polyphénols, peu d'études se sont attachées à comparer à la fois, l'effet inhibiteur de l'oxydation et du développement microbien des extraits phénoliques des grignons à celui des margines, et moins encore l'évaluation de ces effets par rapport à la zone bioclimatique dont ils sont originaires.

L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier l'effet antioxydant des extraits phénoliques des grignons et des margines, en tenant compte des observations précédentes et en se basant sur des essais *in vitro*. Deux tests avaient été choisis pour l'évaluation de ces activités. Le premier consiste en le piégeage des radicaux libre du réactif DPPH et le deuxième consiste en l'analyse de la capacité antioxydante déterminée par la mesure de l'inhibition de la dégradation oxydative de l'acide linoléique en utilisant le test de blanchissement au β -carotène (BCBT).

Ces résultats devraient apporter de nouveaux éléments, notamment sur l'activité antioxydante de ces extraits en tenant compte de leur origine bioclimatique. En particulier, quels sont les extraits les plus actifs ? À quelle concentration ? Existe-t-il des synergies entre le contenu phénolique (composition chimique) d'un extrait et ses propriétés biologiques ? Enfin, le lien entre la concentration en polyphénols d'un extrait et son pouvoir antioxydant (étude de corrélations).

Du point de vue effet antimicrobien, l'objectif est de déterminer la sensibilité des souches bactériennes aux extraits phénoliques des grignons et des margines en fonction de leur composition phénolique. Ces résultats pourraient, par exemple, contribuer à l'explication du comportement de certains agents pathogènes humains sous l'effet des extraits de plantes.

I. Activité antioxydante

Le chapitre précédent nous a permis d'identifier et de caractériser plusieurs familles de polyphénols dans les extraits des grignons et des margines. Au sein de ces familles, et à la lumière des études antécédentes, plusieurs composés sont dotés de pouvoir antioxydant important. Dans cette partie nous testons *in vitro*, l'activité antioxydante de ces extraits phénoliques en vue de leur valorisation en tant qu'antioxydants naturels dans le but d'apporter une contribution au traitement des maladies dans lesquelles le stress oxydatif est incriminé (notamment le cancer). Le nombre d'échantillons analysés a été limité à quatre, deux pour les grignons et deux pour les margines représentant chacun un échantillon de la zone de plaine (extrait de Béni Mellal) et un de la zone de montagne (extrait d'Azilal).

I.1. Dosage de l'activité anti-radicalaire par le test au DPPH

Le DPPH, radicale libre très réactif de couleur violette qui se réduit en un composé de couleur jaune en présence des antioxydants. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des composés testés.

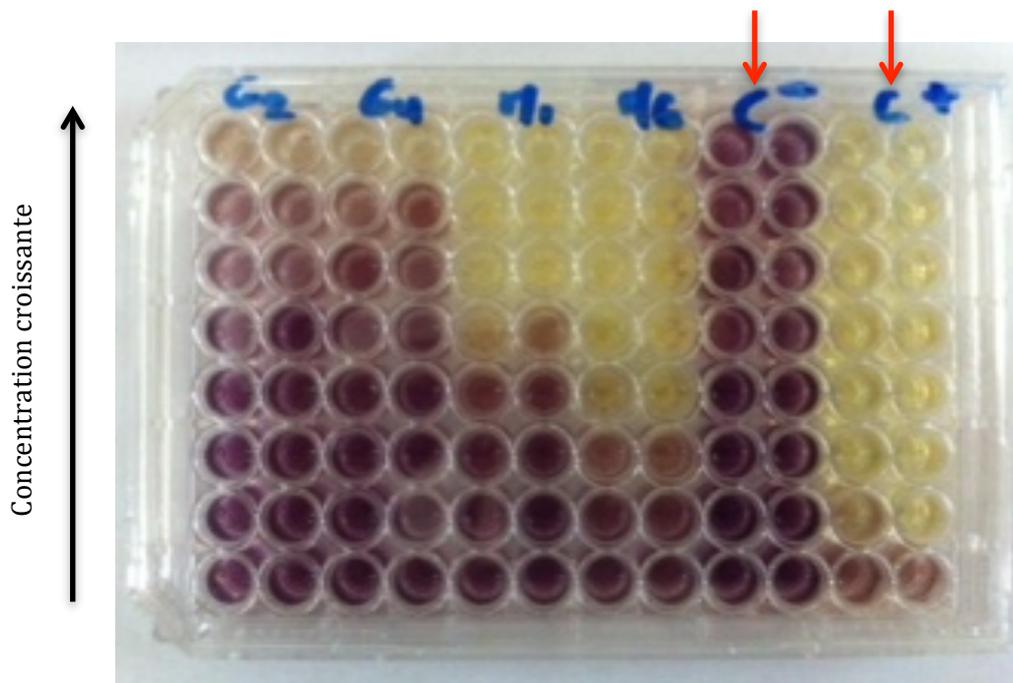


Figure 33: Illustration d'une plaque de 96 puits soumise au test anti-radicalaire par le DPPH

Les flèches verticales indiquent les puits contrôles : C⁻ contrôle négatif ne contenant pas d'extraits, C⁺ contrôle positif (l'acide ascorbique).

G2 et G4 : extraits des grignons des périmètres de Béni Mellal et d'Azilal, respectivement.

M1 et M6 : extraits des margines des périmètres de Béni Mellal et d'Azilal, respectivement.

Tableau 9: Activité anti-radicalaire des extraits phénoliques des grignons et des margines d'olive.

Concentration (µg/ml)	Grignons		Margine		Acide ascorbique *
	Plaine	Montagne	Plaine	Montagne	
200	56,18 ± 7,77	57,84 ± 7,68	91,87 ± 1,01	91,72 ± 0,63	92,81 ± 0,66
100	31,45 ± 12,95	34,93 ± 11,97	91,31 ± 1,34	91,41 ± 1,10	92,58 ± 0,38
50	25,37 ± 8,00	25,98 ± 4,94	72,17 ± 5,59	91,97 ± 0,86	92,90 ± 0,83
25	21,03 ± 5,30	18,26 ± 5,10	43,74 ± 5,16	80,19 ± 13,92	92,91 ± 0,71
12,5	25,20 ± 7,91	16,80 ± 6,85	24,48 ± 7,46	51,85 ± 10,93	92,55 ± 0,56
6,25	17,23 ± 4,79	12,68 ± 2,87	18,41 ± 3,20	38,29 ± 11,50	83,36 ± 3,49
3,125	17,07 ± 9,86	7,26 ± 8,76	9,63 ± 3,94	23,08 ± 5,74	48,16 ± 9,76

* Contrôle positif.

Les valeurs, exprimées en pourcentage d'inhibition des radicaux libres du DPPH, représentent la moyenne de 3 analyses ± écarts-types. La coloration verte est utilisée pour une activité anti-radicalaire du même ordre que le contrôle, tandis que la coloration rose indique une activité faible mais reste dans la limite des valeurs inférieures du contrôle. Les cases non colorées correspondent à des pourcentages très faibles par rapport à l'acide ascorbique.

Les extraits de plaine : représentent l'extrait phénolique originaire de la ville de Béni Mellal
 Les extraits de montagne : représentent l'extrait phénolique originaire d'Azilal.

Les résultats, exprimés en pourcentage de piégeage des radicaux libres (Tableau 9), révèlent que tous les extraits testés sont des antioxydants. A 200 µg/ml, les extraits phénoliques des margines ont présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée; 91,87 % ± 1,01 pour l'extrait de plaine et 91,72% ± 0,63 pour l'extrait de montagne. Ces valeurs sont dans le même ordre que l'acide ascorbique pris comme référence (92,81% ± 0,66). Pour les extraits des grignons, l'activité anti-radicalaire reste significativement inférieure vis à vis du contrôle positif; 56,18% ± 7,77 pour l'extrait de plaine et 57,84 % ± 7,68 pour l'extrait de montagne et ce pour la concentration la plus élevée (200µg/ml).

Les deux extraits des grignons et des margines montrent une activité anti-radicalaire dose dépendante (Figure 34) avec une relation linéaire à des concentrations inférieures à 200 µg/ml (Margines/plaine $R^2 = 0,869$; Margine/montagne $R^2 = 0,952$; Grignons/plaine $R^2 = 0,722$; Grignons/montagne $R^2 = 0,883$; Acide ascorbique $R^2 = 0,998$).

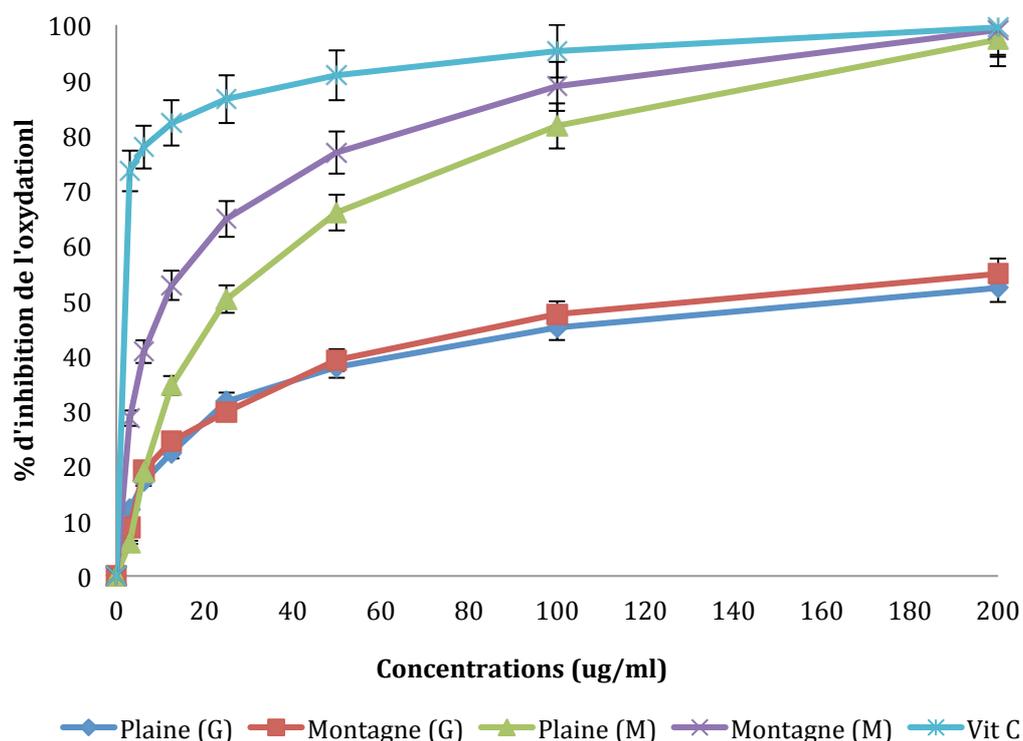


Figure 34: Activité anti-radicalaire des extraits phénoliques des grignons et des margines d'olive (test au DPPH)
(G) : Grignons ; (M) : Margines.

Table 10: Effet anti-radicalaire (IC_{50}) des extraits phénoliques des grignons et des margines.

(IC_{50} μ g/ml)	Grignons	Margines	Acide ascorbique*
Plaine	168 \pm 48	30.7 \pm 4.4	3.2 \pm 0.6
Montagne	157.7 \pm 34.9	11.7 \pm 5.6	

Activité anti-radicalaire (IC_{50} μ g/ml) est identifiée comme étant la concentration nécessaire au piégeage de 50 % des radicaux libres du DPPH.

* Contrôle positif.

Le tableau 10, avec les valeurs de l' IC_{50} , illustre clairement l'activité antiradicalaire marquante des extraits des margines par rapport à celle des grignons, elle est environ 14 fois plus élevée pour les extraits de montagne et 5 fois plus pour les extraits de plaine (différence significative < 0,05%). Néanmoins, elle reste légèrement inférieure à celle de l'acide ascorbique.

I.2. Test de blanchissement au β -carotène (BCBT)

Les modèles de microémulsion fournissent un moyen de mesurer non seulement la capacité antioxydante, mais aussi l'accessibilité de l'antioxydant au substrat. L'oxydation se produit dans les micelles, et donc les antioxydants de nature hydrophobe devraient inhiber la chaîne d'oxydation de manière plus efficace (Obied et al. 2007). Le test de blanchissement à la β -carotène (BCBT) est l'une des meilleures techniques pour ce genre de molécules (Rice-Evans, 1995), il est fréquemment appliqué pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

Les mêmes extraits ont été testés par la technique du BCBT. Dans cette analyse la capacité antioxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition de la dégradation oxydative de l'acide linoléique en mesurant le pourcentage de décoloration du β -carotène, selon la méthode décrite par Kartal et al. (2007).

Nous avons noté que les extraits phénoliques des grignons et des margines protègent tous les deux l'acide linoléique et par conséquent minimisent la décoloration du β -carotène dans le test BCBT (Figure 35). Pour les extraits des margines et en particulier ceux de la zone de montagne, ils ont toujours montré une capacité élevée pour l'inhibition de l'oxydation avec une $IC_{50} = 81,3 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$, quand aux extraits de la zone de plaine, ils ont été moins actifs contre l'oxydation de l'acide linoléique ($IC_{50} = 131,8 \pm 10,3 \mu\text{g/ml}$). En revanche, les extraits des grignons ont montrée une activité antioxydante moins importante. Par ailleurs, et contrairement aux résultats du test au DPPH, les extraits de la zone de montagne ont révélé un pouvoir antioxydant très faible (moins de 50% de l'inhibition de l'oxydation à la concentration la plus élevée : $200\mu\text{g/ml}$) par rapport aux extraits de la zone de plaine ($139,1 \pm 4,56 \mu\text{g/ml}$).

Aucune différence significative n'a été observée entre les extraits de la zone de plaine aussi bien pour les grignons que pour les margines : $IC_{50} = 131,8 \pm 10,3 \mu\text{g/ml}$ et $IC_{50} = 139,1 \pm 4,56 \mu\text{g/ml}$, respectivement.

Nous avons constaté aussi que l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique est fortement liée à la concentration en polyphénols totaux (Margines/plaine $R^2 = 0,878$; Margine/montagne $R^2 = 0,938$; Grignons/plaine $R^2 = 0,971$; Grignons/montagne $R^2 = 0,983$).

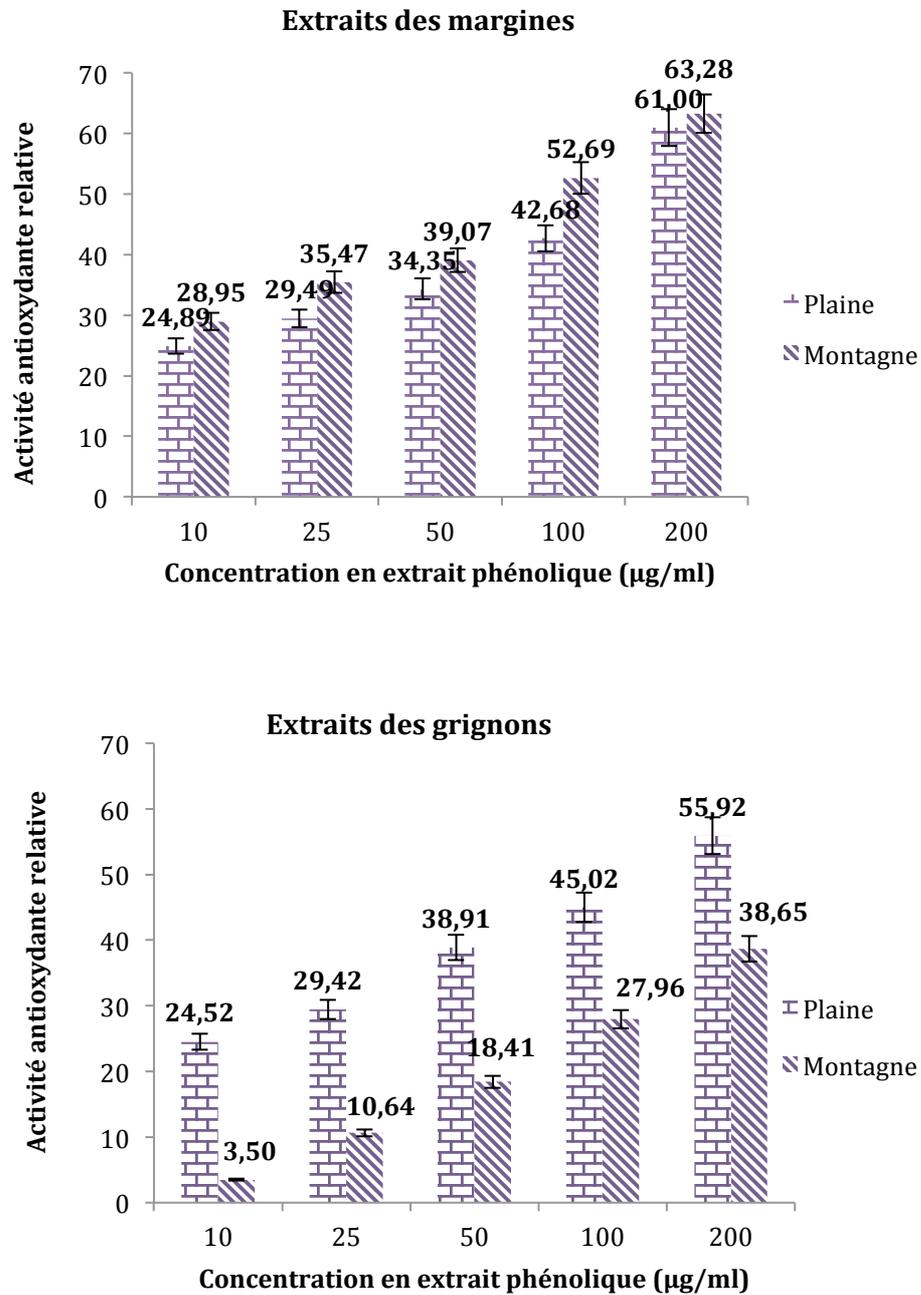


Figure 35 : Activité antioxydante des extraits phénoliques des grignons et des margines (Test BCBT).

Les valeurs son exprimées en % de l'activité antioxydante relative (AAR).

La zone Plaine : représente les extraits originaires du périmètre de Béni-Mellal

La zone Montagne : représente les extraits originaires du périmètre d'Azilal.

I.3. Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante

Le niveau de corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante est un aspect intéressant, mais il faut toujours prendre en considération que les composés phénoliques répondent différemment au test, selon la classe des polyphénols, car les polyphénols totaux n'incorporent pas tous les antioxydants présents dans un extrait (Tawaha et al. 2007).

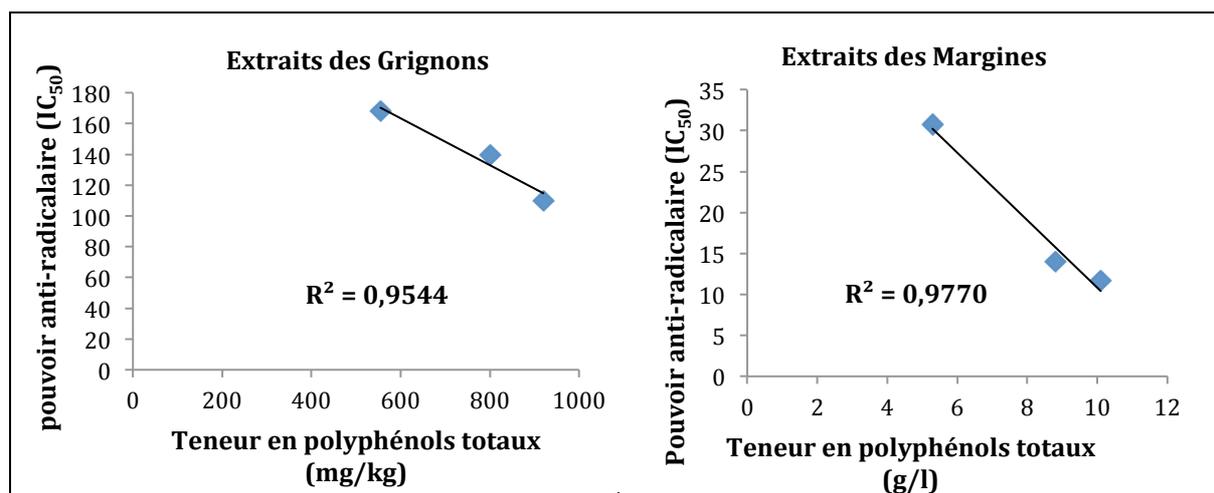


Figure 36: Corrélation entre le pouvoir antioxydant et la teneur en polyphénols totaux des extraits phénoliques des margines et des grignons.

Le coefficient de corrélation entre la teneur en polyphénols des extraits phénoliques et l'activité antioxydante est fortement significatif ; $R^2 = 0,954$ et $R^2 = 0,977$, respectivement pour les grignons et les margines indiquant une très bonne corrélation entre ces deux paramètres.

I.4. Discussion

La détermination de l'activité antioxydante des extraits de plantes nécessite une évaluation multidimensionnelle des activités antioxydantes (Frankel et Meyer, 2000) combinée à des tests simples, rapides et peu coûteux. Ainsi, le piégeage des radicaux libres du DPPH et le test de blanchissement au β -carotène BCBT ont été choisis pour cette étude.

Les résultats diffèrent sensiblement selon le test utilisé. Cela peut s'expliquer par la sensibilité de chaque test par rapport aux extraits analysés.

Avec la méthode au DPPH, tous les extraits testés se sont avérés actifs pour le piégeage des radicaux libres du DPPH (Tableau 9), cette activité a été fortement liée à la concentration en extrait phénolique. Les valeurs de l' IC_{50} , inversement proportionnelles à l'activité antioxydante, ont montré que les extraits des margines se sont avérés plus puissants que les extraits des grignons (Tableau 10). Les extraits des margines de la zone de montagne (extrait d'Azilal) se sont révélés encore plus actifs que ceux de la zone de plaine (extrait de Béni Mellal). Il est intéressant de noter que la valeur de l' IC_{50} des extraits des grignons est 14 fois supérieure à celle des extraits des margines (Tableau 10).

Ces résultats peuvent être attribués à la teneur élevée en composés phénoliques dans les extraits de margines en comparaison aux extraits des grignons. Il a été démontré dans le chapitre 3 que la teneur en polyphénols totaux dans les extraits des margines était 5 à 10 fois plus importante que celle dans les grignons notamment dans les extraits de la zone de montagne. Toutefois, les résultats obtenus ont confirmé l'existence d'une bonne corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire au DPPH et la teneur en polyphénols totaux. En effet, les extraits des grignons et des margines ont montré un coefficient de corrélation linéaire de $R^2 = 0,954$ et $R^2 = 0,977$ respectivement (Fig. 36), indiquant que 95 % et 97% de la capacité antioxydante est due à la contribution des composés phénoliques et qu'ils représentent les antioxydants dominants dans ces extraits. Ces résultats sont conformes aux travaux de Suarez et al. (2009); Obied et al. (2007); Wong et al. (2006); Turkmen et al. (2007); Djeridiane et al. (2006) et Athamena et al. (2010), qui ont montré une corrélation positive entre le contenu phénolique des extraits de plantes et l'activité antioxydante.

Dans le test BCBT, concernant les extraits des margines, l'efficacité des extraits de la zone de montagne a été confirmée. La corrélation entre le pouvoir antioxydant et la concentration en extrait a été confirmée aussi dans ce test. Les extraits des margines, aux concentrations testées (10 à 200 µg/ml) étaient aptes à inhiber l'oxydation de l'acide linoléique de 50 % à des concentrations de $131,8 \pm 10,3$ µg/ml pour la zone de plaine et de $81,3 \pm 1,2$ µg/ml pour la zone de montagne. Quand aux extraits des grignons de la zone de plaine, ils ont été légèrement moins puissants avec une $IC_{50} = 139,1 \pm 4,56$ µg/ml, mais reste dans le même ordre de grandeur.

Cependant, en comparaison aux résultats du test au DPPH, l'activité antioxydante du test BCBT produite par les extraits des grignons de la zone de montagne s'est avérée moins importante que celle des extraits de la zone de plaine. En fait, ces extraits n'ont pas pu inhiber 50% de l'oxydation de l'acide linoléique. Ceci est probablement dû à la haute spécificité de l'essai du blanchissement au β-carotène pour les composés lipophiles (Obied et al. 2007). Les polyphénols de l'extrait des grignons de la zone de plaine pourraient être plus hydrophobes que ceux contenu dans l'extrait de la zone de montagne. Ce résultat suggère le paradoxe de polarité de Porter, selon lequel les antioxydants polaires sont plus souvent actifs dans les solutions lipidiques homogènes que les antioxydants apolaires, tandis que ces derniers sont plus efficaces dans les milieux émulsionnés que leurs homologues polaires (Lopez-Giraldo et al. 2007; Porter et al. 1993). Etant donné que le test de blanchissement au β-carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β-carotène, alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficace dans la protection des lipides.

Dans le même sens, Obied et al. (2007) montre que ce phénomène suggère la nature plus hydrophobe des antioxydants présents dans les grignons, qui peuvent être attribués à l'hydrolyse de certains composés présents dans les extraits comme le verbascoside, ce qui leur procure un pouvoir antioxydant puissant. Ceci peut être en accord avec nos résultats (Tableau 7) vu que le verbascoside a été détecté uniquement dans les extraits de la zone de plaine alors qu'il n'a pas été détecté dans les extraits montagneux.

Toutefois, la comparaison avec les travaux antécédents des données de bio-activités est entravée par l'absence de méthodes standard pour la mesure de l'activité antioxydante, aussi les conditions et les techniques de mesure et d'analyse des données sont très variables (Obied et al. 2007). Pour exemple, les valeurs de l'IC₅₀ du test DPPH rapportées dans la littérature oscillent entre 99,7 et 101,3 µg/ml dans les extraits phénoliques des grignons italiens (Cioffi et al. 2010) et sont de l'ordre de 119,33 µg/ml pour les grignons portugais (Ramos et al. 2013). Les IC₅₀ des extraits des margines ont également été mesurées. Leur valeurs varient entre 2,61 et 5,27 ppm dans les margines françaises (Leesage-Meessen et al. 2001). Avec des valeurs de l'IC₅₀ de nos extraits qui varient entre 157,7 à 168 µg/ml pour les grignons et entre 11,7 et 30,7 µg/ml pour les margines, et bien que la comparaison ne porte pas sur les extraits de la même espèce ni les mêmes conditions d'analyses, les valeurs sont estimées proches.

Par ailleurs, l'activité antioxydante dépend fortement de la nature et de la composition phénolique. L'activité la plus élevée est attribuée aux extraits qui contiennent essentiellement l'hydroxytyrosol, les dérivés sécoïridoïdes et les flavonoïdes dans leur profil phénolique (De Marco et al. 2007; Suarez et al. 2007). Ces données sont en accord avec nos résultats qui ont montré que les extraits des margines, en particulier ceux issus de la zone de montagne sont riches en ces composés (extrait d'Azilal, Tableau 8 du chapitre précédent). En outre, la présence d'un cycle aromatique et des groupements hydroxyle permet la délocalisation de l'électron non apparié, limitant ainsi la réactivité du radical formé (Laguerre et al. 2007). Ces données suggèrent l'importance de l'hydroxylation à la position ortho du noyau aromatique de ces composés, par rapport aux composés phénoliques avec un seul groupe hydroxyle.

En effet, l'hydroxytyrosol a été identifié parmi les antioxydants les plus puissants pour le piégeage des radicaux libres (Ramos et al 2013; De Marco et al 2007; Obied et al. 2005; Leesage-Messen et al. 2001 ; Visioli et al. 1999). En référence aux structures chimiques des composés phénoliques présents dans les extraits étudiés (Annexe), l'hydroxytyrosol a une structure 3,4- dihydroxyl liée à un cycle aromatique. Ceci confère une plus grande activité de l'hydroxytyrosol par rapport au tyrosol par exemple, qui a une structure similaire, mais avec seulement un groupe hydroxyle lié à un cycle aromatique (Suarez et al. 2009). D'autres études ont confirmé le potentiel significatif des dérivés sécoïridoïdes dans l'activité anti-radicalaire, en particulier l'oleuropéine, le verbascoside, l'hydroxytyrosol glucoside et l'oleuropéine aglycone (Suarez et al 2009; Amro et al, 2002 ; Obied et al 2007).

D'après la publication de Obied et al. (2008), les composés phénoliques qui ont une activité antioxydante la plus marquée sont le 3,4-DHPEA-EDA et le verbascoside. Aussi, le 3,4-DHPEA-EA et l'hydroxytyrosol glucoside identifiés comme des antioxydants majeurs, car ils dérivent de l'oleuropéine, plus précisément de l'hydroxytyrosol (Suarez et al. 2009 ; Suarez et al. 2010 ; De Marco et al. 2007). Ces composés possèdent tous une structure caractérisée par deux groupements hydroxyle à la position ortho liés à leur cycle aromatique, ce qui leur procure une importante activité anti-radicalaire. En revanche, les dérivés du ligstroside (p-DHPA-EA par exemple) présentent une activité antioxydante plus faible que les dérivés de l'oleuropéine. Cela peut être expliqué par la présence d'un seul groupement hydroxyle lié à leur cycle aromatique. Par ailleurs, Fki et al. (2005) ont mesuré l'activité anti-radicalaire des acides phénoliques, et ils ont ainsi démontré une activité antioxydante élevée de l'acide caféique. La présence de deux groupements hydroxyle à la position ortho dans leur structure, leur confère ce niveau élevé de pouvoir antioxydant. Cependant, les composés avec un seul groupement hydroxyle comme l'acide p-coumarique et l'acide syringique montrent une faible activité (Fki et al. 2005).

Enfin, les flavonoïdes, en particulier la lutéoline, la lutéoline -7- glucoside, la quercetin et la rutine, ont toujours montré une activité antioxydante importante (Suarez et al. 2007 ; De Marco et al. 2007 ; Pietta, 2000). Leur structure caractéristique avec trois cycles aromatiques leur procure une importante activité spécifiquement due à la présence à la fois de 3 à 5 groupes hydroxyles. En comparaison, l'activité de la lutéoline et ses isomères devrait être supérieure à celle de l'apigénine en raison de la présence de deux groupes hydroxyles en position ortho.

D'une manière intéressante, ces données sont compatibles avec nos résultats, les extraits de la zone de montagne sont riches en ces composés aussi bien pour les extraits des grignons que pour ceux des margines (Tableau 7 et 8).

L'évaluation de l'activité antioxydante est un processus assez complexe et dépend de plusieurs variables (Frankel et Meyer, 2000). Ainsi, les polyphénols se trouvent en générale en mélange dans les tissus végétaux et il est possible que l'activité d'un composé donné puisse être modulée par la présence d'autres molécules. Nous suggérons ainsi l'effet de synergie entre les composés phénoliques majeurs dans ces extraits qui devrait être pris en considération dans ce genre d'activités (Bourgou et al. 2008).

Si ces essais *in vitro*, simples et rapides, ont pu montrer un avantage important dans l'étude de l'effet antioxydant des extraits phénoliques dans le traitement potentiel des phénomènes du stress oxydatif, aussi dans les chapitres suivants, nous nous intéresserons plus particulièrement à tester le potentiel thérapeutique de ces extraits pour le traitement des cellules tumorales.

En résumé, ces tests nous ont permis de montrer que les extraits phénoliques des grignons et des margines représentent une source de principales familles d'antioxydants : les phénols simples, les dérivés sécoïridoïdes, les flavonoïdes, et les acides phénoliques. Les extraits phénoliques des margines, en particulier ceux originaires des régions montagneuses, sont riches en ces composés et sont plus actifs que ceux des grignons dans les réactions d'inhibition de l'oxydation. Cette activité a été suggérée être en relation étroite avec la teneur et la nature des composés présents dans ces extraits.

II. Activité antimicrobienne

Les mêmes échantillons analysés pour l'activité antioxydante ont été analysés pour l'activité antimicrobienne, un échantillon de la zone de plaine (extrait de Béni Mellal) et un de la zone de montagne (extrait d'Azilal) pour les grignons comme pour les margines. Chacun des quatre extraits phénoliques a été testé sur les 3 souches bactériennes : *Escherichia Coli* (Gram-), *Streptococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* (Gram +). L'essai a consisté à déposer un volume d'extrait sur le milieu gélosé afin d'avoir des concentrations finales de 1,25, 2,50 et 5 mg/disque. Ces concentrations ont été définies par rapport aux concentrations inhibitrices rapportées dans la littérature (Obied et al. 2007). La mesure du diamètre permet de mesurer la sensibilité de chaque souche aux extraits étudiés par rapport aux contrôles positifs (antibiotiques utilisés : l'Amoxicilline, le chloramphénicol et le céftriaxone).

Le Tableau 11 présente les résultats de l'activité antimicrobienne des quatre extraits.

Aucune activité antimicrobienne n'est observée pour le contrôle négatif (DMSO), par contre les souches étudiées ont été toutes sensibles au contrôle positif (antibiotiques) à l'exception de *Escherichia coli* et du *Staphylococcus aureus* à l'amoxicilline (25 μ g).

L'ensemble des extraits testés se sont avérés inactifs ou faiblement actifs contre *Escherichia coli* et les *Streptococcus faecalis*, seul l'extrait des margines/montagne a montré une activité inhibitrice de croissance contre *Streptococcus faecalis* (15 \pm 0,2 mm) avoisinante celle de l'amoxicilline 25 μ g (15,45 \pm 0,45).

Tableau 11: Activité antimicrobienne des extraits phénoliques des grignons et des margines.

Substances testées (dose/disque)		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)*		
		Souches bactériennes		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
Extraits phénoliques des grignons :				
Plaine	1.25 mg	0	13,2±0,4	0
	2.50 mg	0	14,6±0,1	0
	5 mg	11,65±0,75	15,7±0,7	11,1±0,1
Montagne	1.25 mg	0	0	0
	2.50 mg	0	12,7±0,7	0
	5 mg	12,65±0,65	15±0,8	0
Extraits phénoliques des margines:				
Plaine	1.25 mg	0	0	0
	2.50 mg	0	12,7±0,3	0
	5 mg	0	14,55±0,35	0
Montagne	1.25 mg	0	0	0
	2.50 mg	0	13,2±0,42	0
	5 mg	11,3±0,3	12,85±0,55	15±0,2
Antibiotiques:				
Amoxicilline	25 µg	0	0	15,45±0,45
Chloramphénicol	30 µg	28,75±0,55	14,2±0,5	22,3±0,5
Céftriaxone	30 µg	19,05±0,45	15,6±0,4	25,8±0,2

Les résultats représentent la moyenne de 3 analyses ± SD.

*Diamètre de la zone d'inhibition (mm) incluant le diamètre de 6 mm du disque;
0 mm indique qu'il n'y a pas de zone d'inhibition.

La souche *Staphylococcus aureus* s'est avérée sensible à tous les extraits, et ce de manière dose-dépendante. A faibles concentrations, les extraits montrent différentes actions antibactériennes, mais à 5 mg/disque, tous les extraits sont actifs contre cette souche avec des zones d'inhibitions similaires à celles des contrôles positifs (Chloramphénicol : 14,2±0,5 mm ; Céftriaxone : 15,6±0,4 mm). *Streptococcus faecalis* et *Escherichia coli* semblent être résistantes même à concentration élevée.

Aucune différence significative d'activité n'a été observée entre les extraits phénoliques des grignons et des margines quelque soit leur zone d'origine (plaine ou montagne).

II.1. Discussion

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons pu caractériser les extraits phénoliques des grignons et des margines en tant qu'agents antioxydants par rapport à leur teneur en composés phénoliques et à la composition chimique liée à la fonctionnalité de chacun de ces composés. Dans cette seconde partie, l'objectif était de vérifier si ces caractéristiques présentent aussi un trait spécifique pour l'activité antimicrobienne de ces mêmes extraits.

Nos résultats ont montré que seul le *Staphylococcus aureus* était sensible à tous les extraits phénoliques testés. L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements produits dans leur environnement tels que la température, le pH, et à certains extraits naturels, due à l'absence de la membrane externe de leur paroi cellulaire (Balentine et al. 2006) ainsi qu'à la composition chimique des extraits (Moreno et al, 1989). Parmi les composés phénoliques les plus actifs sur ce type de bactéries, l'hydroxytyrosol et la lutéoline qui ont montré une bonne activité inhibitrice contre cette souche (Obied et al. 2007, Capasso et al. 1995).

D'autres travaux ont montré que les flavonoïdes en particulier la quercétine (Shan et al. 2007) et la lutéoline (Askun et al. 2009) sont des substances antibactériennes importantes en particulier contre les bactéries à gram positif. Diverses activités antimicrobiennes ont été signalées également pour l'acide caféique (Aziz et al. 1998), le verbascoside (Didry et al. 1999), l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol (Obied et al. 2007; Medina et al. 2007; Bisignano et al. 1999). Les travaux de Ramos-Cormenzana et al. (1996); Gonzalez et al. (1990); et Moreno et al. (1989) ont rapporté que l'activité antimicrobienne était due essentiellement aux phénols simples et aux acides phénoliques. Bisignano et al. (1999) avaient montré que les composés identifiés dans les grignons tels que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol (Bisignano et al. 1999), l'acide vanillique, l'acide p-coumarique et l'acide 4-hydroxybenzoïque (Soler-Rivas et al. 2000), peuvent manifester une activité antibactérienne importante. Par ailleurs, d'autres études ont montré que le pouvoir bactéricide significatif des extraits des margines est principalement lié à leurs teneurs en monomères phénoliques, tels que le tyrosol et l'hydroxytyrosol (Yanguí et al. 2009 ; Yanguí et al. 2010).

Ceci peut être en accord avec nos résultats en ce qui concerne la souche *Staphylococcus aureus* (Gram+), vu que les extraits testés sont riches en ces composés, notamment en hydroxytyrosol, en flavonoïdes et en acides phénoliques.

Cependant, ces extraits n'ont montré aucune activité contre le *Streptococcus faecalis* (Gram+) sauf pour l'extrait margine/montagne qui a été actif à la concentration la plus élevée (5mg/disque). Ces résultats restent généralement compatibles avec d'autres travaux similaires qui suggèrent les différences des procédures suivies et la pureté relative des substances utilisées dans les essais (Aziz et al. 1998; Bisignano et al. 1999; Capasso et al. 1995).

Par ailleurs, *Escherichia coli* (Gram -) s'est montrée très résistante à tous les extraits testés. Ces résultats sont compatibles avec les résultats de Obied et al. (2007) qui ont montré qu'aucun de leurs extraits dérivés des sous produits d'huile d'olive n'a été actif contre l'*Escherichia coli*. La résistance des bactéries Gram négatif peut être rationalisée en tenant compte des différences de composition de la paroi cellulaire par rapport à celle des Gram positif. Les bactéries à Gram négatif ont une composante de lipopolysaccharides dans leur membrane externe qui les rend plus résistantes à des composés antibactériens. Toutefois, les biophénols des extraits des grignons de la zone de plaine était plus hydrophobe que ceux de la zone de montagne, comme en témoigne les résultats du test BCBT, ce qui aurait pu renforcer leur activité contre les bactéries à Gram négatif (Obied et al. 2007). Ceci n'a pas été le cas dans notre test, sauf pour l'extrait des margines/montagne qui a montré une activité antimicrobienne contre le *Streptococcus faecalis* aussi importante que l'amoxicilline. Cet extrait avait montré une activité antioxydante élevée dans le test BCBT. En fait, l'activité antimicrobienne varie selon la nature de l'extrait et le Gram des bactéries. Néanmoins, elle peut être attribuée aussi à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar (Hayouni et al. 2007) ainsi qu'à la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne. Ces deux caractères peuvent influencer beaucoup sur les résultats. Ainsi, Natarajan et al. (2005) et Fazeli et al. (2007) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits organiques et hydro-éthanoliques que la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Bien que nos extraits soient riches en composés phénoliques dotés d'un pouvoir bactéricide significatif, nous avons constaté que leur activité était plus élevée contre les bactéries à Gram positif que contre celles à Gram négatif (Obied et al. 2005).

Enfin, pas de corrélation observée entre le pouvoir antimicrobien et la teneur en polyphénols ($R^2 = 0.00$). Des résultats similaires ont été obtenus par Perez et al. (1992) lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des margines.

Confirmant ces données, il n'y a pas de méthode standard ou de critères d'évaluation pour la détermination de l'activité antimicrobienne dans les extraits de plantes (Hadacek et Greger, 2000; Nostro et al. 2000).

La différence des souches bactériennes, du test antimicrobien utilisé, des milieux de croissance, de la taille de l'inoculum et de la concentration en micro-organismes, fait que la comparaison des données antimicrobiennes des extraits de plantes est très difficile (Obied et al. 2007). D'après la publication de Guesmi & Boudabous, (2006), certaines études ne révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis des bactéries aussi bien pour les Gram positif que négatif.

Dans cette deuxième partie, nous avons montré que la sensibilité d'une bactérie à l'effet antimicrobien d'un extrait phénolique observée *in vitro* est difficile à vérifier. Dans nos essais, ces extraits phénoliques, aux concentrations testées, étaient aptes à inhiber le développement de certaines souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*). Cependant, ces concentrations n'ont pas suffi à inhiber le développement d'autres microorganismes (*Streptococcus faecalis* et *Escherichia coli*). Ceci pourrait être en relation avec la concentration en polyphénols ainsi qu'à la nature de la composition phénolique de l'extrait ce qui suggère qu'avec des composés purifiés, l'activité antimicrobienne pourrait probablement être plus importante.

CHAPITRE 5: Activité antitumorale *in vitro* des extraits phénoliques des grignons et des margines

Les résultats présentés dans les chapitres précédents nous ont permis d'identifier les composés phénoliques des extraits des grignons et des margines et de mettre en évidence les teneurs en polyphénols totaux dans ces extraits à l'égard de plusieurs paramètres d'influence. D'autre part, nos résultats ont montré que ces extraits phénoliques, de part leur forte activité inhibitrice des réactions d'oxydation et le rôle déterminant qu'ils peuvent jouer dans la prévention des maladies du stress oxydatif, sont des molécules d'intérêt dans l'étude d'inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes.

L'objectif de ce chapitre est de s'intéresser au pouvoir cytotoxique potentiel des extraits phénoliques des grignons et des margines en évaluant leur activité anticancéreuse *in vitro* vis-à-vis des cellules tumorales. En effet, nous avons étudié l'activité cytotoxique de ces extraits en fonction de la concentration en polyphénols, de la composition chimique des extraits et de la lignée tumorale utilisée. Une évaluation de la cytotoxicité de ces extraits sur les cellules normales (PBMC) a aussi été réalisée afin de déterminer le risque des effets secondaires sur les cellules saines de l'organisme comparativement à la chimiothérapie conventionnelle.

Peu d'études ont été consacrées à l'évaluation des propriétés antiprolifératives des extraits phénoliques des grignons et des margines contre les cellules cancéreuses. Une seule publication avait été trouvée, celle de Ramos et al. (2013) qui ont montré que les extraits phénoliques des grignons ont un pouvoir antiprolifératif important contre la lignée cellulaire MDA-MB-231 du cancer du sein humain. Néanmoins, il a été rapporté que les polyphénols extraits des végétaux peuvent influencer le mécanisme biochimique et moléculaire de la cancérogénèse (Sakakibara et al. 2003). Dans le présent travail, nous avons évalué les propriétés cytotoxiques *in vitro* de ces extraits phénoliques contre ces lignées tumorales à savoir P815 et MCF7, la première étude à ce jour. Cette approche devrait permettre d'identifier dans une première partie quels extraits sont plus actifs contre la prolifération des cellules cancéreuses et si tel est le cas aussi pour les cellules normales de notre organisme.

Dans une seconde partie nous avons cherché à mieux comprendre le mécanisme de la mort des cellules cancéreuses induit par ces extraits. Ainsi, le test de la fragmentation de l'ADN cellulaire et le test de marquage des capasses à l'Annexine-V-Biotine ont été effectués dans cette étude. Ces résultats devraient nous permettre de mieux appréhender le rôle potentiel des polyphénols des extraits des sous-produits d'huile d'olive dans le traitement du cancer.

I. Etude *in vitro* de l'effet cytotoxique

Dans les études de cytotoxicité des extraits de plantes, plusieurs mécanismes peuvent entrer en jeu entre la cible et l'agent cytotoxique. Toutefois, l'effet des polyphénols sur des lignées cellulaires tumorales est le plus souvent inducteur de la diminution du nombre de tumeurs ou de leur croissance (Yang, 2001). La compréhension des mécanismes sous-jacents à ces différences de sensibilité pourrait permettre de mieux comprendre la réaction des cellules tumorales.

I.1. Evaluation de l'activité cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines

L'activité cytotoxique *in vitro* des extraits phénoliques a été mesurée par le test MTT contre les lignées tumorales P815 à différentes concentrations (0,4 - 50 µg/ml). Cette activité a été évaluée pour les extraits des grignons et des margines des différents périmètres de collecte de la région Tadla-Azilal : Azilal, Taghzirt, El Ksiba , Demnat et Aourir comme périmètres de la zone de montagne ainsi que Béni Mellal, Fkih Ben Salah, Krazza, Bni âyat et Afourar comme périmètres de la zone de plaine. Les résultats de cette étude sont portés sur les figures 37 et 38.

En toute première observation, nous notons que les différents extraits montrent une activité cytotoxique dose-dépendante contre la lignée tumorale P815 (Figures 37 et 38). En effet, le pouvoir cytotoxique augmente au fur et à mesure qu'on augmente la concentration de l'extrait.

En comparant les valeurs des IC₅₀ (Figure 39) et d'une façon globale, les extraits phénoliques des margines sont significativement plus efficaces à inhiber la prolifération des cellules tumorales avec des IC₅₀ rangées entre 5,2 à 15,5 µg/ml que les extraits des grignons avec des IC₅₀ qui varient de 3,2 à 33 µg/ml.

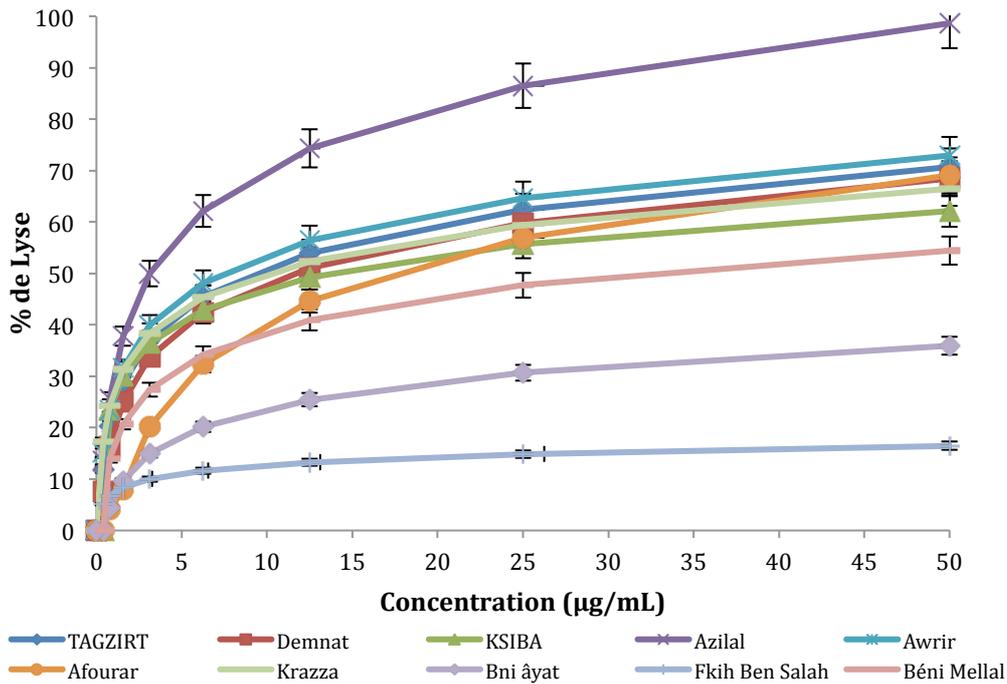


Figure 37 : Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits phénoliques **des grignons** contre la lignée P815 après 24 h d'exposition à des concentrations de 0,4 à 50 µg/ml d'extrait.

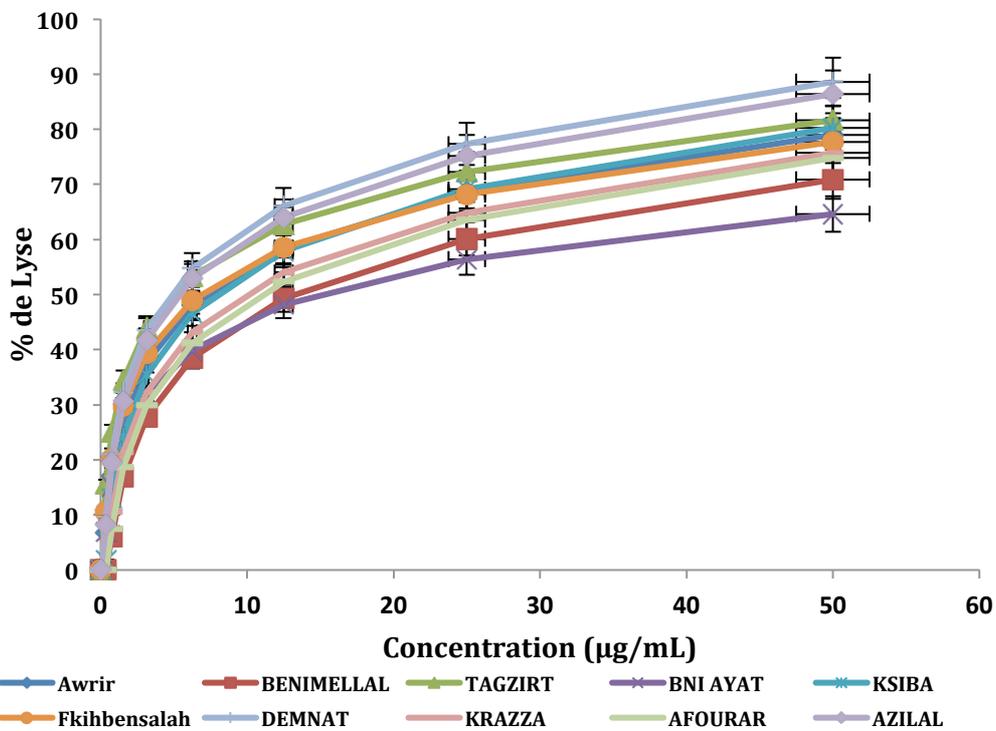


Figure 38: Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits phénoliques **des margines** contre la lignée P815 après 24 h d'exposition à des concentrations de 0,4 à 50 µg/ml d'extrait.

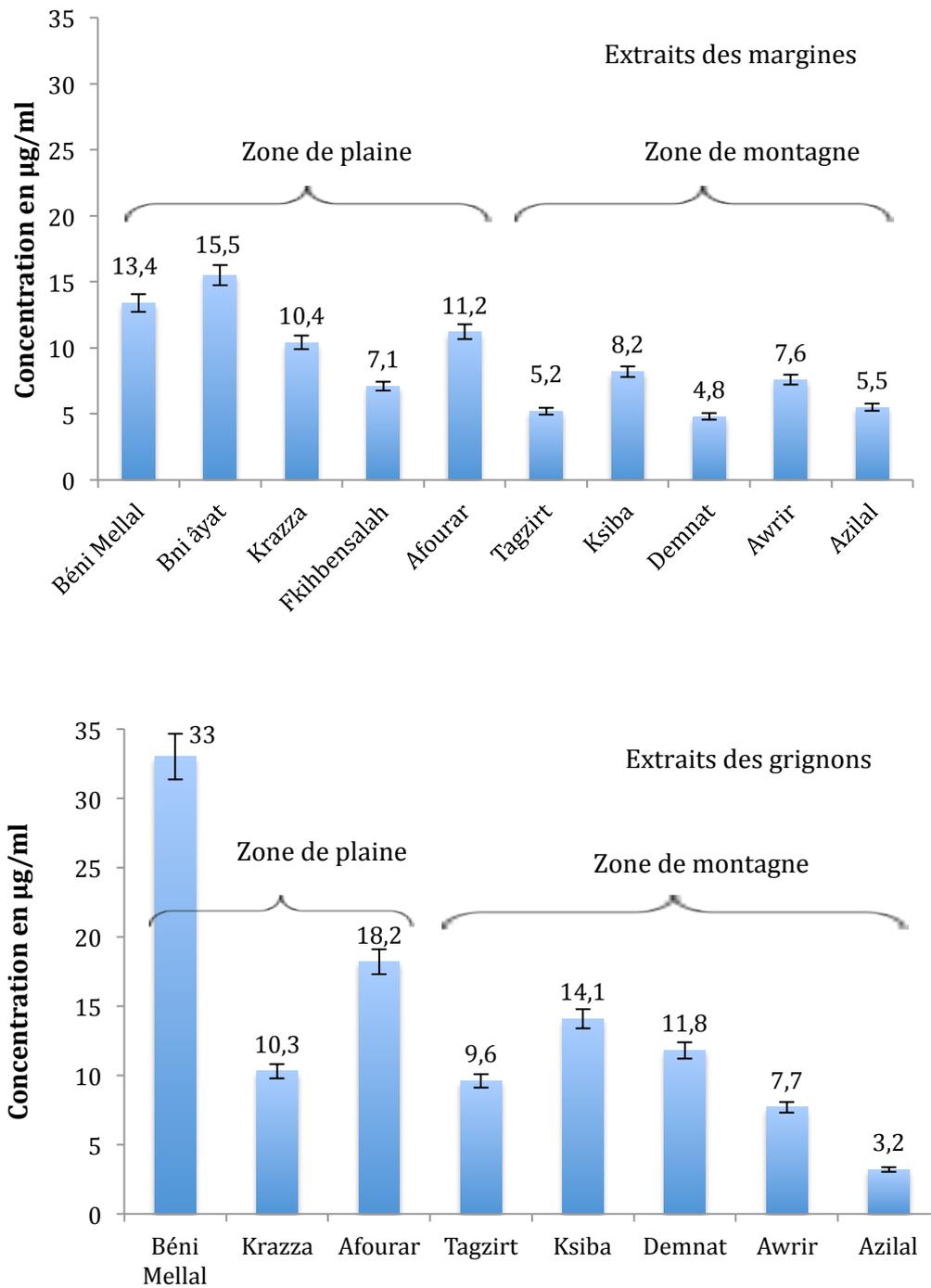


Figure 39 : Valeurs des IC_{50} de l'activité cytotoxique des extraits des grignons et des margines. IC_{50} est la concentration inhibitrice nécessaire à la destruction de 50% de la culture cellulaire. Plus la valeur de l' IC_{50} est faible, plus l'activité inhibitrice de l'extrait est importante. Les IC_{50} des extraits des grignons des sites Bni âyat, et Fkih Ben Salah ne figurent pas sur le diagramme car ils ont présenté une faible activité cytotoxique (inférieure à 50% de lyse cellulaire).

En parallèle, les extraits de la zone de montagne ont présenté une activité cytotoxique relativement élevée par rapport à ceux de la zone de plaine. Si nous comparons la moyenne des IC₅₀ des extraits des deux zones ; pour les margines, elle est de 6,26 µg/ml pour la zone de montagne et de 11,5 µg/ml pour la zone de plaine. Pour les grignons, elle est de 9,28 µg/ml, pour la zone de montagne et de 20,5 µg/ml pour la zone de plaine. En effet, d'après les figures 34 et 35 à forte concentration (50 µg/ml), le pourcentage de lyse des extraits des margines varie entre 64% et 86% tandis que celui des grignons a montré une large variabilité allant de 16 à 98 %.

D'une manière intéressante, les extraits des grignons d'Azilal montrent une activité cytotoxique marquante avec un pourcentage de lyse de 98% et une IC₅₀ de 3,2 µg/ml. En revanche, les extraits de Bni âyat et Fkih Ben Saleh ont montré une faible activité avec un pourcentage de lyse qui ne dépasse pas les 36% (Figure 37).

Ces résultats peuvent être expliqués dans un premier temps par la teneur en polyphénols dans chaque extrait (Ramos et al. 2013). Elle est relativement élevée dans les extraits des margines que dans ceux des grignons et encore plus élevée dans les extraits des zones de montagne que ceux de plaine (chapitre 3). Une parfaite corrélation a été observée entre la teneur en polyphénols et le pouvoir antiprolifératif avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,985$.

L'activité antiproliférative semble bien être liée aussi à la concentration utilisée et à la composition phénolique des extraits testés. En fait, la relation entre la composition chimique d'un composé phénolique et son comportement vis-à-vis des cellules cancéreuses est une hypothèse à ne pas négliger (Ramos et al. 2013).

Les figures 40 et 41 montrent l'aspect (observation au microscope optique) des cellules P815 traitées avec des concentrations correspondant à l'IC₅₀ des extraits des grignons et des margines de deux points de collecte de la zone de montagne (Azilal et Aourir) et deux de la zone de plaine (Béni Mellal et Krazza).

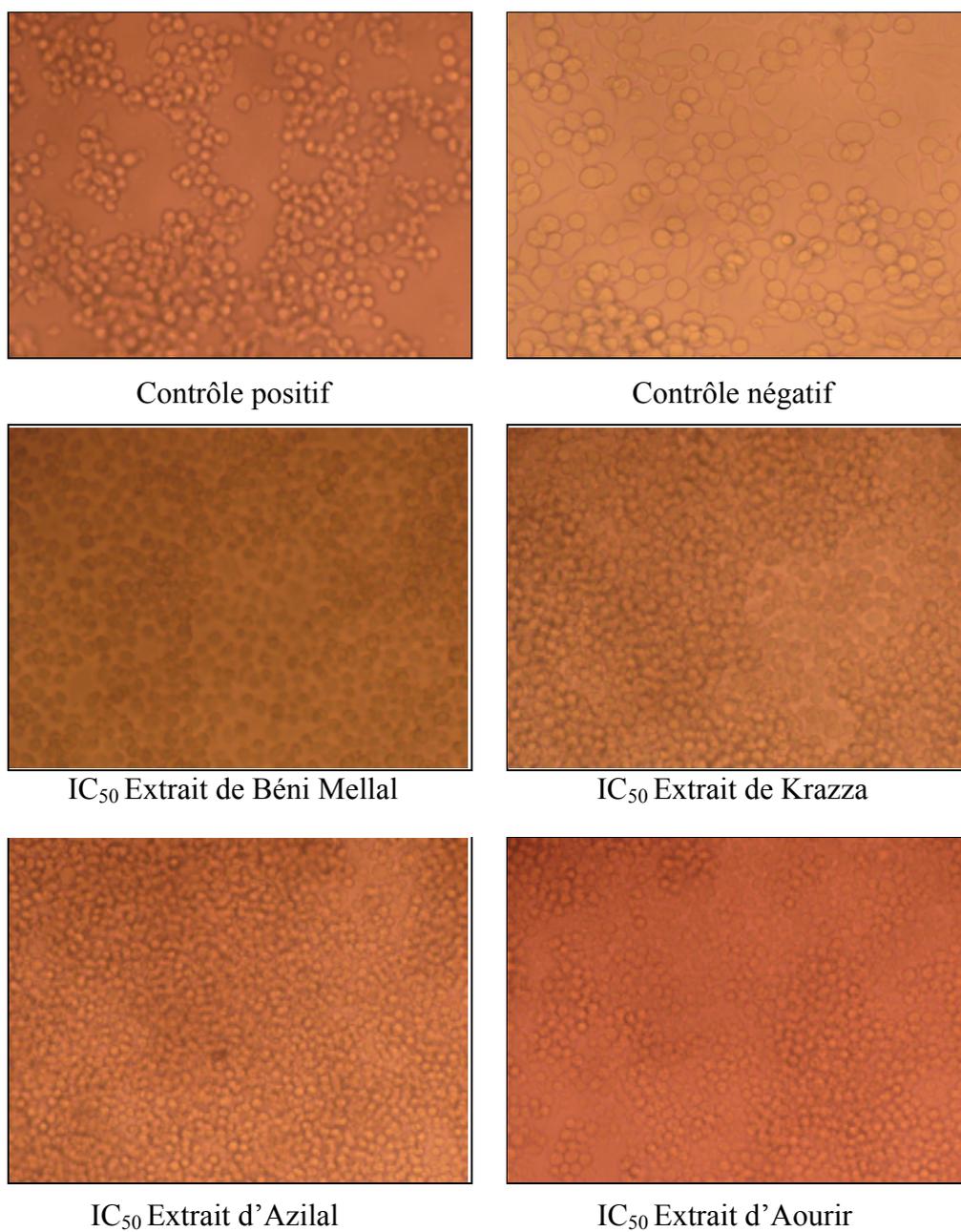


Figure 40: Photographie (Gx400) des changements morphologiques des cellules P815 après 24 h de traitement avec des concentrations correspondantes à l'IC₅₀ de chaque extrait phénolique des **grignons**.

Régions de plaine : Béni Mellal et Krazza

Régions de montagne : Azilal et Aourir

Contrôle positif : cellules cultivées dans un milieu sans sérum.

Contrôle négatif : Cellules non traitées.

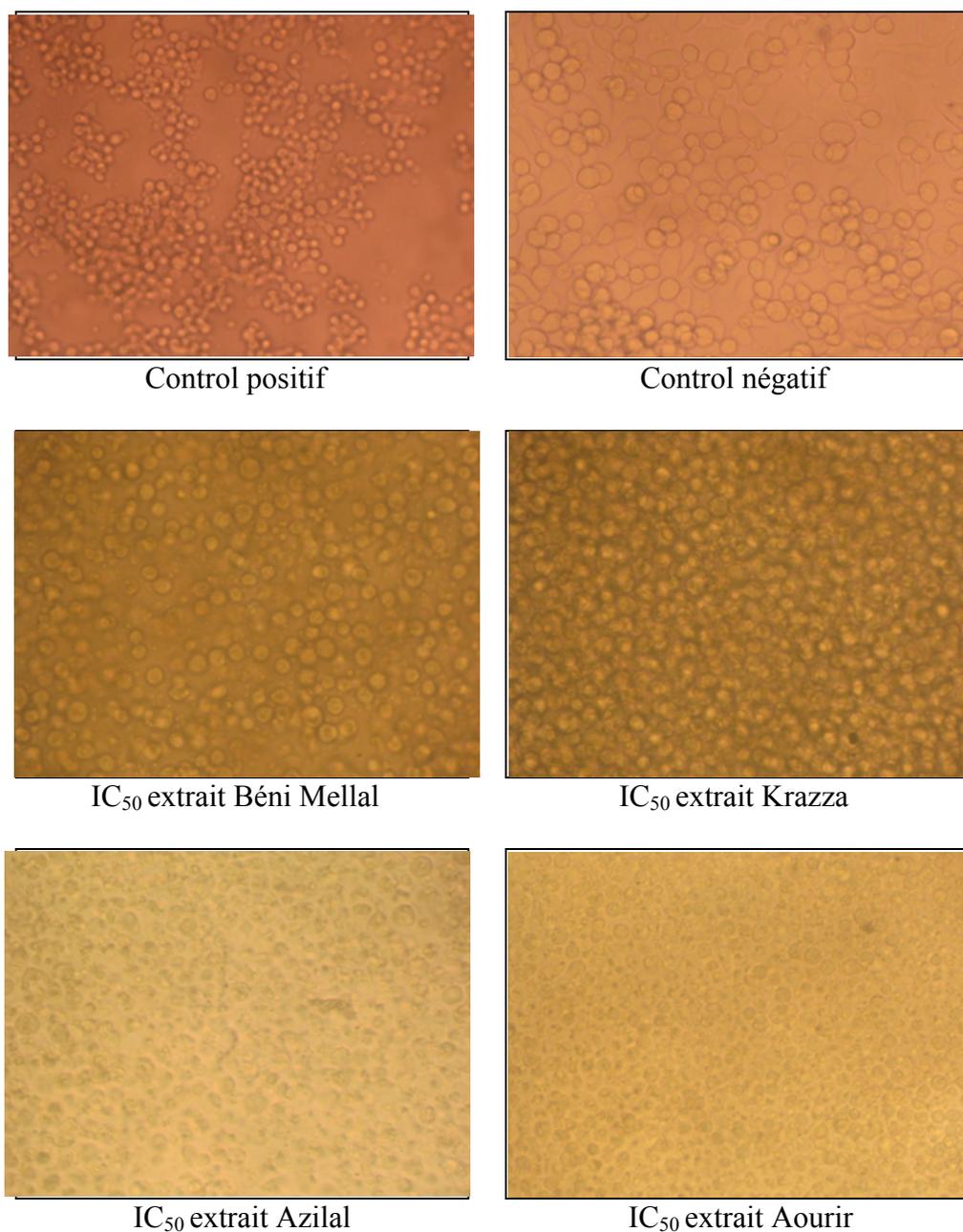


Figure 41: Photographie (Gx400) des changements morphologiques des cellules P815 après 24 h de traitement avec des concentrations correspondantes à l'IC₅₀ de chaque extrait phénolique **des margines**.

Régions de plaine : Béni Mellal et Krazza

Régions de montagne : Azilal et Aourir

Contrôle positif : cellules cultivées dans un milieu sans sérum.

Contrôle négatif : Cellules non traitées.

Ces figures présentent une vue sur la morphologie des cellules cancéreuses après 24 heures de contact avec des concentrations correspondantes à l'IC₅₀ des extraits phénoliques des grignons et des margines.

D'après les mêmes figures, en comparaison aux cellules témoins (non traitées), montrant une morphologie bien définie avec distribution équivalente au sein de la plaque de culture et présentant une forme polygonale avec des limites distinctes, des changements significatifs ont été observés dans la morphologie et la densité des cellules P815 traitées. En effet, nous avons révélé des changements au niveau de la membrane plasmique des cellules qui commençaient à perdre leur forme normale et se modifient en une forme plus arrondie caractérisée par un rétrécissement et un détachement cellulaire ainsi qu'une réduction du volume cellulaire. Nous pouvons dire alors que les extraits phénoliques testés sont cytotoxiques même à faibles doses, notamment pour les régions montagneuses (5,5 ; 7,6 µg/ml pour les margines, et 3,2 ; 7,7 µg/ml pour les grignons).

Ces résultats peuvent être en accord avec les travaux de Ramos et al. (2013) qui ont montré que les extraits phénoliques des grignons d'olive sont des agents antiprolifératifs testés. Ceci peut être attribué à la nature des composés phénoliques présents dans ces extraits.

I.2. Etude comparative de l'effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines contre deux lignées tumorales P815 et MCF7

Afin d'étudier si l'effet cytotoxique des extraits phénoliques est spécifique des cellules tumorales étudiées, nous avons évalué l'effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons contre les deux lignées tumorales P815 et MCF7 à différentes concentrations (Figure 42 et 43). Les extraits testés sont les mêmes étudiés dans la première partie (Azilal et Aourir pour la zone de montagne ; Béni Mellal et Krazza pour la zone de plaine).

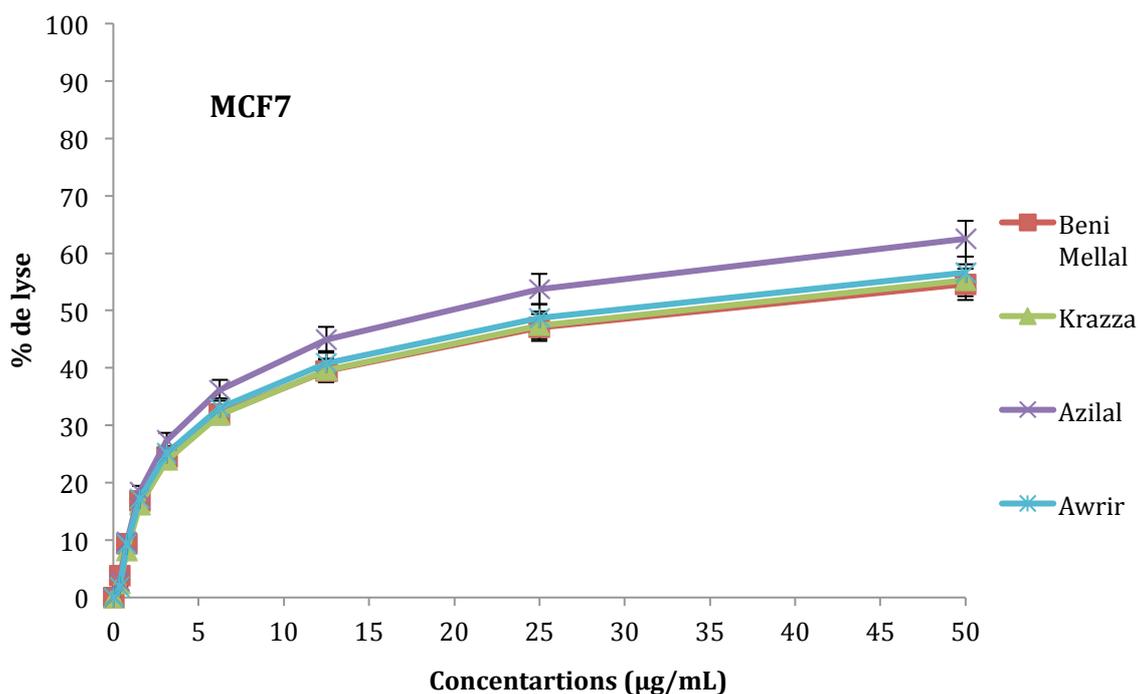


Figure 42 : Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons contre la lignée MCF7 après 24 h d'exposition à des concentrations de 0,4 à 50 µg/l d'extrait.

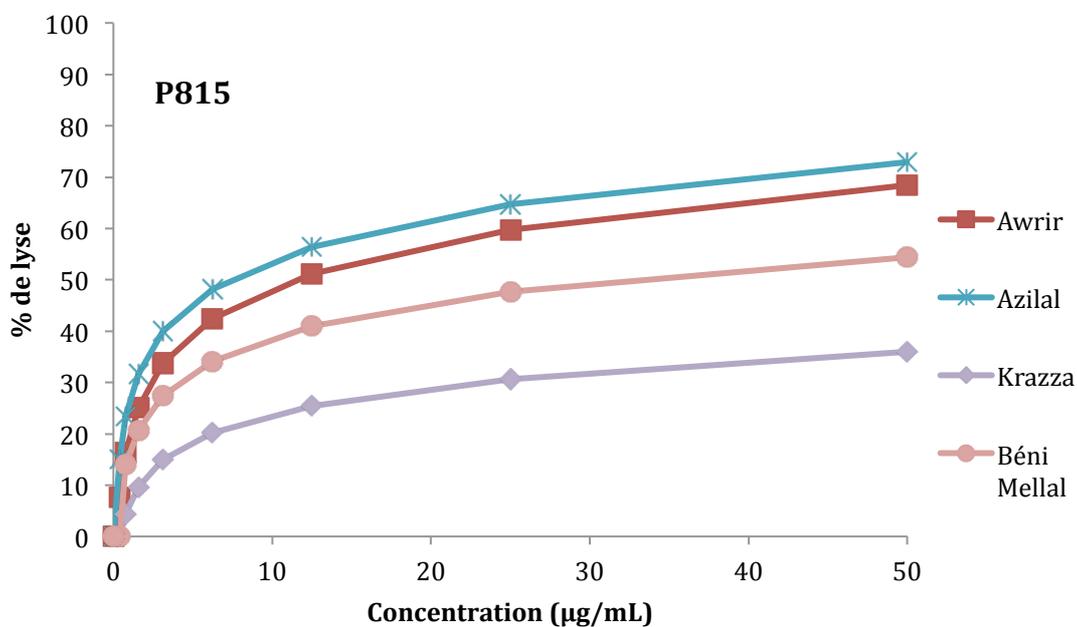


Figure 43 : Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons contre la lignée P815 après 24 h d'exposition à des concentrations de 0,4 à 50 µg/l d'extrait.

Les figures 42 et 43 montrent que l'effet cytotoxique des extraits phénoliques est dose-dépendant. En effet, l'activité cytotoxique augmente en augmentant la concentration. Le maximum de 62% de lyse était atteint pour la concentration de 50 µg/ml contre la lignée MCF7, et 73% de lyse contre la lignée P815. On remarque également que les deux lignées étudiées présentent des degrés différents de sensibilité vis-à-vis des extraits phénoliques par rapport à la région d'où ils sont originaires.

La figure 42 montre que les extraits testés ne présentent aucune différence significative dans leur activité cytotoxique contre la lignée MCF7. Néanmoins, l'activité la plus élevée a été attribuée à l'extrait d'Azilal avec une $IC_{50} = 20$ µg/ml suivi par l'extrait d'Aourir avec une $IC_{50} = 28.5$ µg/ml. Les zones de plaine ont montrés une activité cytotoxique moins importante avec une $IC_{50} = 34$ µg/ml. En ce qui concerne la lignée P815, son comportement vis-à-vis des extraits phénoliques était complètement différent (Figure 43). On observe que l'activité cytotoxique des extraits de la zone de montagne est plus importante que celle des extraits de la zone de plaine. Les valeurs de l' IC_{50} sont de l'ordre de 7,4 µg/ml pour Azilal et 11,6 µg/ml pour Aourir, tandis que l'activité cytotoxique des extraits de la zone de plaine était faible, L' IC_{50} de l'extrait de Béni Mellal est de 34,2 µg/ml alors que le pouvoir inhibiteur de l'extrait de Krazza n'a pas pu atteindre 50% de lyse à la concentration la plus élevée (50µg/ml).

Ces résultats suggèrent le degré de sensibilité de la lignée tumorale à chacun des extraits. Les deux lignées sont sensibles aux extraits phénoliques. La lignée P815 semble être plus sensible que la lignée MCF7. Le nombre d'études traitant les propriétés cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines en fonction des lignées tumorales fut encore limité. Néanmoins, de nombreuses études ont montré des résultats variables sur ces propriétés en testant les lignées tumorales par différents extraits végétales (Kouamé et al. 2009).

I.3. Effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)

Dans les traitements par chimiothérapie anticancéreuse, les nombreux effets secondaires induits par la toxicité des cellules normales constituent un souci permanent. L'inconvénient majeur de ces traitements est leur manque de sélectivité pour les cellules malignes. Les effets secondaires observés sur les tissus sains actifs sont dus à l'absorption des drogues par les cellules saines. Ces effets qui résultent de la toxicité excessive des traitements empêchent l'utilisation de doses suffisamment élevées pour éliminer définitivement les tumeurs, c'est la toxicité systémique.

L'objectif ici est d'évaluer si les extraits phénoliques des grignons et des margines ont un effet cytotoxique sur les cellules normales de notre organisme. Pour cela, la cytotoxicité de ces extraits contre les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de l'Homme a été évaluée en utilisant le test MTT. Les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes d'extraits dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les cellules tumorales. La figure 44 représente le pourcentage de viabilité des PBMC traitées par les extraits testés.

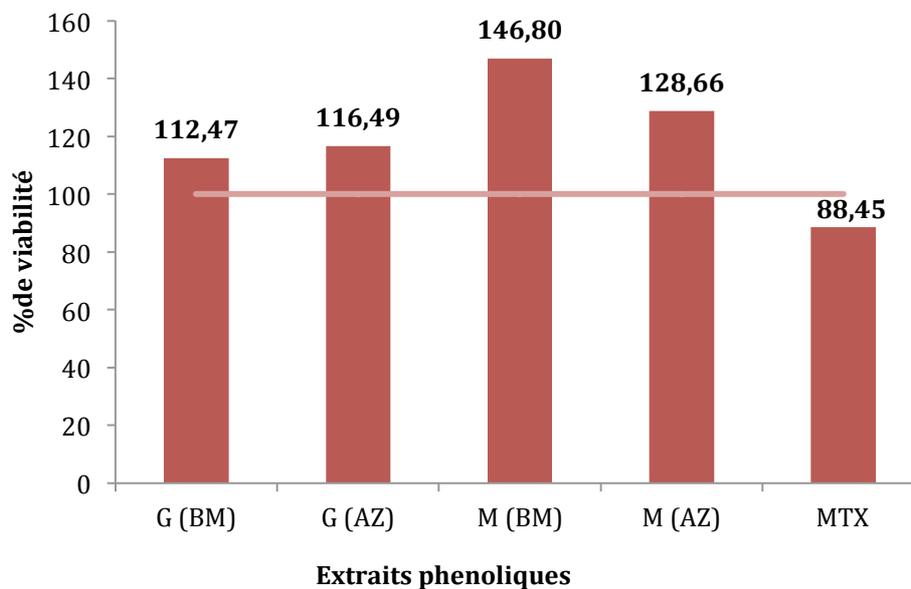


Figure 44: Effet cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines sur les PBMC.

MTX : méthotrexate

BM : Béni Mellal; AZ : Azilal.

G : Grignons; M : Margines

Les résultats montrent que les extraits phénoliques des grignons et des margines n'ont aucun effet cytotoxique sur les PBMC en comparaison au méthotrexate (contrôle positif). D'une manière intéressante, ces extraits montrent un effet prolifératif sur les cellules normales. En effet, la viabilité des cellules a été améliorée de 46% et 28 % sous l'effet des extraits des margines, et de 16% et 12% sous l'effet des extraits des grignons, respectivement. En revanche, le méthotrexate (MTX) a réduit de 12% la viabilité de ces cellules.

Ces résultats peuvent suggérer l'effet immunostimulant des extraits phénoliques des grignons et des margines. Ceci peut avoir un grand intérêt dans la mesure où c'est le non ciblage des cellules tumorales par les produits anticancéreux qui est à l'origine de leur toxicité systématique. Cette dernière constitue en plus de la résistance un des problèmes majeurs de la chimiothérapie anticancéreuse.

I.4. Induction de l'apoptose des cellules P815 par les extraits phénoliques

L'induction de l'apoptose chez les cellules cancéreuses est le mécanisme le plus recherché dans le traitement des cancers. Elle est considérée comme un processus physiologique important qui fonctionne pour éliminer les cellules non désirées au cours du développement et de l'homéostasie des organismes multicellulaires.

Afin de comprendre le mécanisme de la mort des cellules cancéreuses traitées par les extraits phénoliques des grignons et des margines et déterminer si l'activité cytotoxique de ces extraits est associée à l'induction de l'apoptose, nous avons effectué deux types de tests différents: test de fragmentation de l'ADN en fragments de 180-200 pb et le test des caspases utilisant l'annexine V-biotine-streptavidine-FITC.

I.4.1. Fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN a été analysée après avoir exposé les cellules tumorales P815 pendant 24h aux extraits phénoliques à des concentrations correspondantes aux valeurs de l'IC₅₀ de chacun des extraits (Figure 45). Le clivage de l'ADN a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose, nous avons observé des fragments dont la taille est multiple de 180-200 pb, caractéristiques de l'apoptose pour tous les extraits testés et le contrôle positif (cellules cultivées en milieu sans sérum), comparativement aux cellules non traitées (contrôle négatif). Le profil observé de la fragmentation de l'ADN induit par les extraits phénoliques des grignons et des margines était étroitement lié à leurs effets inhibiteurs de la prolifération cellulaire.

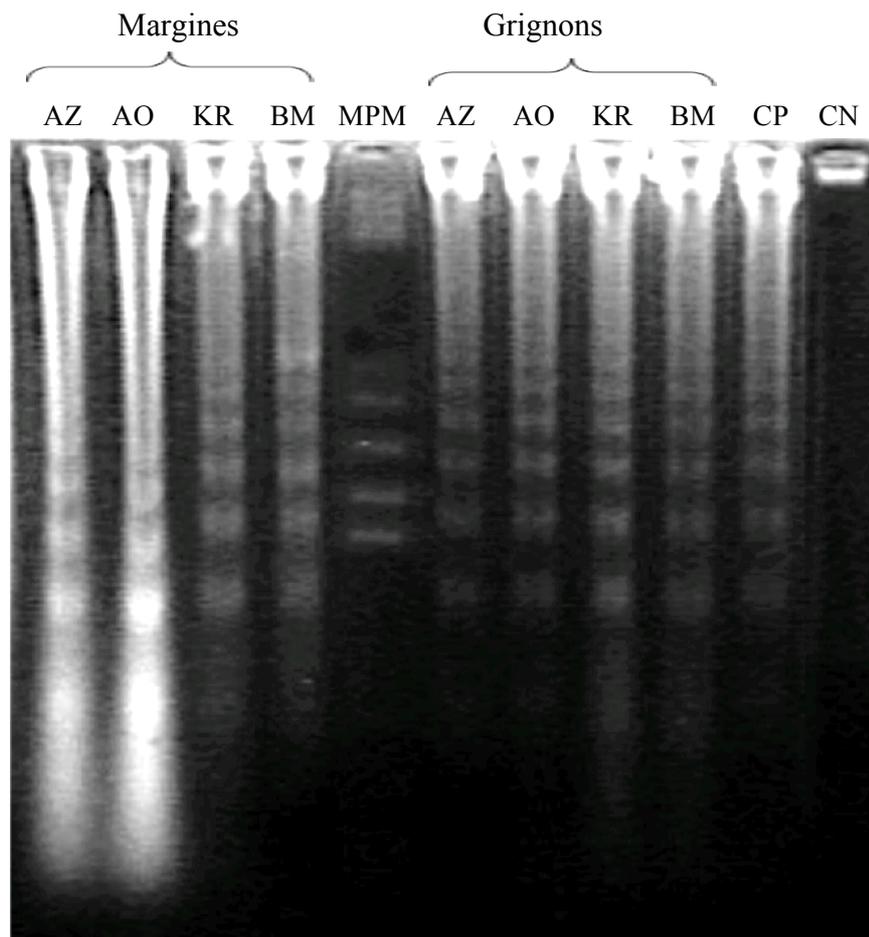


Figure 45: Electrophorèse sur gel d'agarose montrant la fragmentation apoptotique de l'ADN de la lignée P815. Les cellules (10^6 cellule/ml) ont été exposées à des concentrations correspondant à l' IC_{50} de chaque extrait pendant 24h).

MPM: marqueur de poids moléculaire (180-200pb), CP: ADN des cellules cultivées en milieu sans sérum, CN: ADN des cellules non traitées. Margines (BM, KR, AZ, AO) : ADN des cellules P815 traitées par les extraits des margines. Grignons (BM, KR, AZ, AO) : ADN des cellules P815 traité par les extraits des grignons.

BM: Beni Mellal et KR: Krazza ; AZ: Azilal et AO: Aourir.

Ceci pourrait suggérer que le mécanisme de fragmentation de l'ADN pourrait être dû à l'activation des processus d'apoptose. Nos résultats permettent de conclure ainsi que ces extraits inhibent la prolifération des cellules de la lignée P815 par induction de l'apoptose comme cela est indiqué sur les pistes de la figure 45.

I.4.2. Test des caspases par marquage à l'Annexine V-Biotine-Streptavidine FITC

En phase précoce de l'apoptose, il y a translocation de la phosphatidyl-sérine à l'extérieur de la membrane plasmique. Celle-ci est mise en évidence par marquage spécifique à l'Annexine-V-Biotine et analysée par microscopie à fluorescence. Ce test a été réalisé sur la lignée tumorale P815.

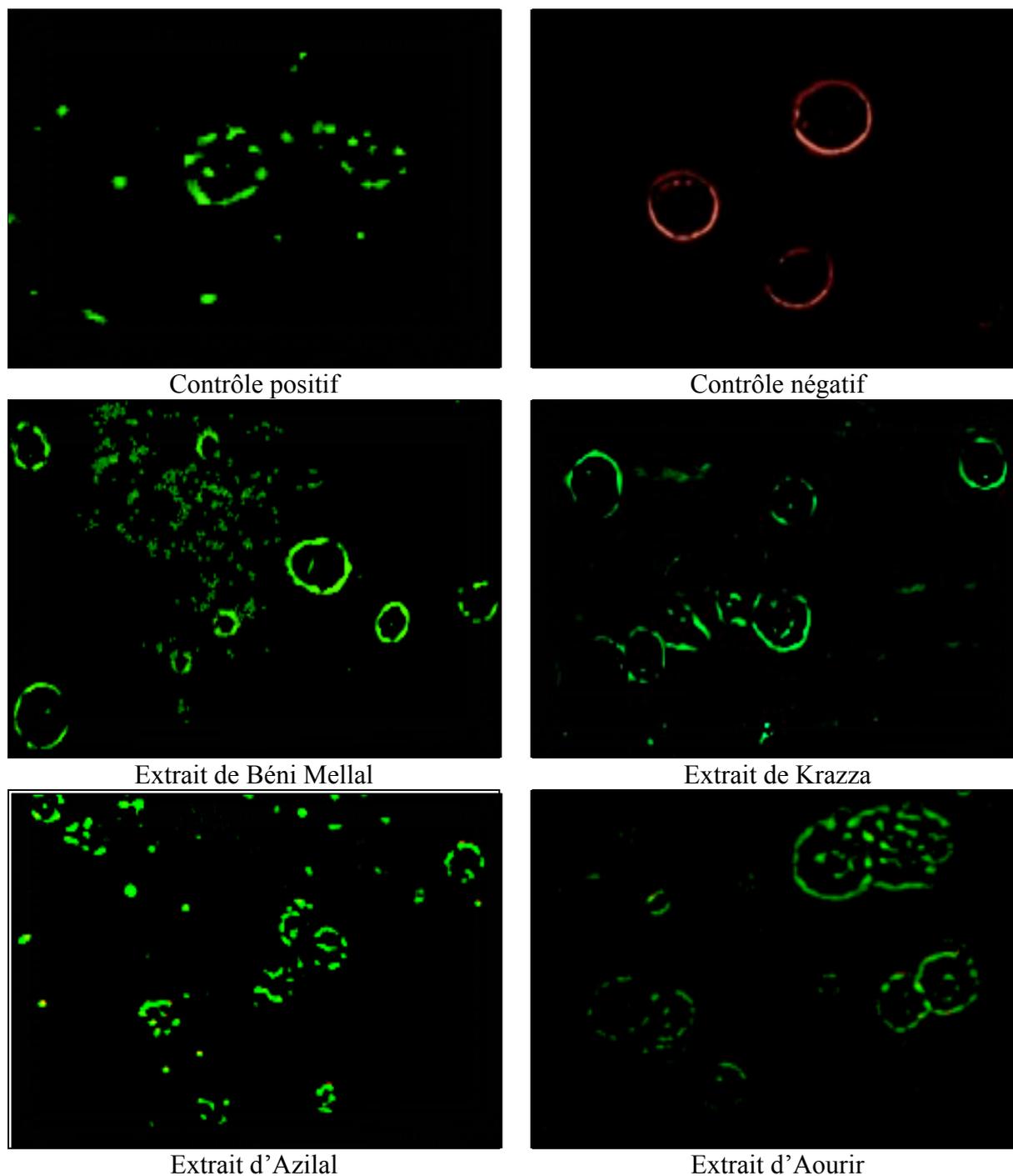


Figure 46: Cellules P815 apoptotiques traitées par les extraits phénoliques des grignons. Les cellules P815 ont été traitées avec 25 $\mu\text{g/ml}$ d'extraits phénoliques des grignons. Le test consiste en la capacité de l'annexine V (fluorescence verte) à s'associer à la phosphatidyl-sérine qui est exposée à la surface des cellules montrant une apoptose.

Contrôle positif : cellules cultivées en milieu sans sérum

Contrôle négatif : cellules non traitées.

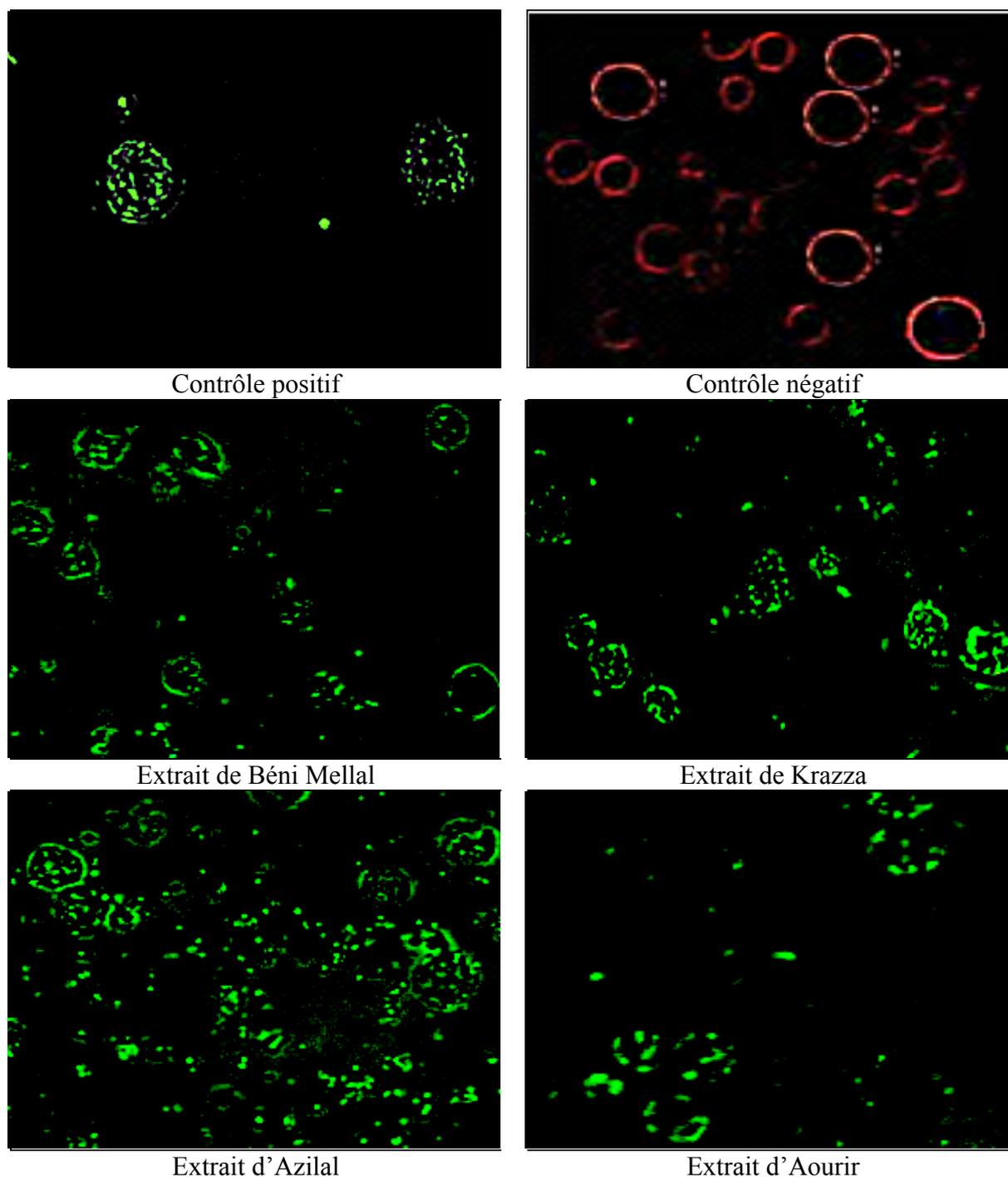


Figure 47: Cellules P815 apoptotiques traitées par les extraits phénoliques des margines. Les cellules P815 ont été traitées avec 25 $\mu\text{g/ml}$ d'extraits phénoliques des margines. Le test consiste en la capacité de l'annexine V (fluorescence verte) à s'associer à la phosphatidylsérine qui est exposée à la surface des cellules montrant une apoptose.

Contrôle positif : cellules cultivées en milieu sans sérum
Contrôle négatif : cellules non traitées.

Les résultats ont montré que tous les extraits induisent l'apoptose sur la lignée P815 (Figures 46 et 47). En effet, l'observation au microscope à fluorescence nous a montré de façon claire un effet apoptotique des extraits des grignons et des margines vis-à-vis de la lignée P815.

Les cellules traitées par les extraits des margines montrent une apoptose en phase avancée par rapport à celles traitées par les extraits des grignons. Comme illustré sur les images de la figure 47, on peut observer le bourgeonnement de la membrane plasmique et la formation de corps apoptotiques qui renferment une partie du cytoplasme de la cellule. Cependant, ceci était légèrement observé sur les images des cellules traitées par les extraits des grignons (figure 46) qui montrent une membrane plasmique qui n'est pas très altérée au cours du processus (apoptose en phase précoce) à l'exception des extraits des grignons d'Aourir, où les cellules P815 ont aussi montré une apoptose en phase avancée.

A notre connaissance, l'activité anticancéreuse associée à l'induction de l'apoptose des extraits phénoliques des grignons et des margines d'olive contre les cellules P815 a été démontrée pour la première fois. Néanmoins, Allouche et al. (2011) avaient rapporté que certains triterpènes, présents dans de l'huile des grignons, ont une activité antiproliférative importante contre les cellules de la lignée tumorale MCF7 du cancer du sein humain.

I.5. Discussion

Ce chapitre est consacré à l'étude *in vitro* de l'activité antitumorale des extraits phénoliques des grignons et des margines ainsi qu'à la détermination du mécanisme de la mort des cellules cancéreuses étudiées, la première étude à ce jour. L'objectif était également de vérifier si ces extraits avaient des effets secondaires sur les cellules saines de notre organisme. Une étude comparative de l'activité cytotoxique de deux lignées tumorales MCF7 et P815 vis-à-vis des extraits testés a été aussi réalisée.

Nous avons montré que les extraits phénoliques des grignons et des margines inhibent significativement la prolifération cellulaire de la lignée tumorale P815 et que cet effet est fortement corrélé à la concentration utilisée dans la mesure où le pourcentage de lyse augmente au fur et à mesure qu'on augmente la concentration de l'extrait phénolique (Figures 37 et 38). L'effet cytotoxique des extraits des régions montagneuses étant plus prononcé que celui des régions de plaine aussi bien pour les extraits des margines que ceux des grignons (Figure 39).

Pour exemple, les extraits des margines de Demnat, d'Azilal et de Taghzirt ont montré un effet antiprolifératif important même à faible dose, les valeurs des IC_{50} sont de 4,8, 5,5 et 5,2 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. De la même façon, les extraits des grignons d'Azilal et d'Aourir ont montré une activité significative avec respectivement des IC_{50} de l'ordre de 3,2 et 7,7 $\mu\text{g/ml}$. Ainsi, en comparant par exemple les extraits d'Azilal et de Béni Mellal, les extraits d'origine montagneuse sont 10 fois plus efficaces pour les grignons et 2,5 fois pour les margines (Fig. 39). Ceci peut aussi être observé dans les changements de la morphologie des cellules tumorales traitées par ces extraits (Fig. 40 et 41). Ainsi, la teneur en polyphénols dans les extraits influence significativement l'activité cytotoxique des extraits phénoliques des plantes naturelles (Ramos et al. 2013 ; Allouche et al. 2011). Elle est relativement plus élevée dans nos extraits de la zone de montagne, riches en polyphénols, que dans ceux de la zone de plaine (chapitre 3). Une parfaite corrélation a été observée entre la teneur en polyphénols et le pouvoir antiprolifératif avec un coefficient de l'ordre de $R^2 = 0,985$.

En outre, la composition chimique des extraits phénoliques, notamment la nature des composés phénoliques, peut aussi avoir un effet déterminant dans l'évaluation de l'activité antiproliférative (Ramos et al. 2013 ; Tilaoui et al. 2011, Ait Mouse et al. 2012, Jaafari et al.

2010). Nos résultats ont montré que les extraits phénoliques testés sont riches en polyphénols en particulier, l'hydroxytyrosol, les dérivés sécoïridoïdes, les acides phénoliques et les flavonoïdes.

Ces données suggèrent que ces polyphénols réduisent efficacement la malignité et suppriment le potentiel de la production des cellules cancéreuses. Ceci peut être en accord avec les résultats Ramos et al. (2013) qui ont montré un effet antiprolifératif des cellules cancéreuses manifesté par les extraits phénoliques des grignons seuls ou en synergie avec d'autres substances cytotoxiques. Il a été démontré ainsi que cette activité est fortement liée à la composition chimique notamment, aux composés phénoliques présents dans les extraits des grignons, en particulier à l'hydroxytyrosol (Ramos et al. 2013). Ainsi, dans un modèle *in vitro* de l'évaluation du potentiel antiprolifératif, les extraits phénoliques des grignons portugais riches en hydroxytyrosol sont très efficaces contre les cellules tumorales du sein humain. Toujours d'après la publication de Ramos et al. (2013), l'effet de synergie des composés présents dans ces extraits peut jouer un rôle déterminant dans l'évaluation du pouvoir cytotoxique. Aussi, Menendez et al. (2008) avaient démontré que l'activité antiproliférative manifestée par les polyphénols d'huile d'olive était due à l'hydroxytyrosol.

Par ailleurs, nous avons montré que les extraits originaires des zones montagneuses sont plus riches en polyphénols que ceux issus des zones de plaine. Ce qui nous mène à suggérer que la composition chimique peut varier d'une façon intéressante en fonction de la localisation géographique. Cette hypothèse a été confirmée par Jaafari, (2010) dans la comparaison de l'effet cytotoxique des extraits de thym originaire de différentes régions marocaines.

En effet, les propriétés antiprolifératives des polyphénols ont été mises en évidence dans différents extraits de plantes naturelles issus de différentes origines géographiques (Yang et al. 2001; Owen et al. 2000; Fiot et al. 2006). Par conséquent, la différence entre la composition chimique des produits testés, quoi qu'elle paraisse petite, pourrait en partie expliquer la différence d'activité cytotoxique observée. En effet, la structure chimique, responsable des propriétés pharmacologiques d'une molécule, joue un rôle fondamental et déterminant dans son activité thérapeutique (Jaafari, 2010).

Dans un autre volet, nous avons montré que les extraits phénoliques des grignons et des margines présentent des effets variables sur les lignées tumorales. En effet, il a été observé

que la lignée tumorale P815 est plus sensible aux extraits phénoliques testés que la lignée MCF7 particulièrement pour les extraits des zones montagneuses. Les IC_{50} étaient de l'ordre de 7,4 et 11,6 $\mu\text{g/ml}$ pour la lignée P815 et de 20 et 28 $\mu\text{g/ml}$ (Figures 42 et 43). La sensibilité de ces cellules aux extraits de la zone de plaine était moins élevée voire faible avec des valeurs de l' IC_{50} de l'ordre de 34 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats sont, en partie, conformes à des travaux antécédents qui ont montré que la lignée cellulaire MDA- MB-231 du cancer du sein métastatique est sensible aux extraits phénoliques des grignons portugais (Ramos et al. 2013), tandis que cette même lignée n'avait présenté aucune sensibilité vis-à-vis de certains triterpènes extraits de l'huile de grignons tunisiens (Allouche et al. 2011).

Toujours d'après les travaux de Allouche et al. (2011), ces composés triterpéniques avaient montré une importante activité cytotoxique contre les cellules de la lignée tumorale MCF7 du cancer du sein humain. Nous pouvons suggérer que les lignées étudiées présentent des degrés différents de sensibilité vis-à-vis de chaque extrait phénolique. Aussi, la mutation du gène suppresseur de tumeur p53, dans les lignées P815 et MCF7, serait probablement impliquée dans leur sensibilité élevée aux produits testés (Lee et al. 1996).

Ces données nous mène à suggérer que la nature spécifique de la cellule tumorale pourrait aussi avoir un effet significatif sur l'activité cytotoxique observée (Allouche et al. 2011, Tilaoui, 2012, Johnson et al. 1994). Toutefois, les mécanismes biochimiques responsables de cette cytotoxicité contre les lignées cancéreuses demeurent encore mal connus, vu le nombre limité des travaux sur le pouvoir antiprolifératif des extraits phénoliques des sous produits d'huile d'olive.

Dans la deuxième partie de ce chapitre et pour bien comprendre le mécanisme de la mort des cellules cancéreuses traitées par les extraits phénoliques, nous avons effectué deux types de tests différents : test de fragmentation de l'ADN en fragments de 180-200 pb et le test des caspases utilisant l'annexine-V-biotine-streptavidine. Nos résultats ont montré que l'ensemble des extraits induit l'apoptose sur la lignée P815 (Fig. 45) mais avec des degrés différents en ce qui concerne les phases de progression de cette mort cellulaire. En effet, les extraits des margines ont montré une apoptose en phase plus avancée que les extraits des grignons (Figures 46, et 47). Ces résultats corroborent en partie ce que d'autres chercheurs ont mis en lumière, bien que ces travaux ne testent pas le même type d'extrait phénolique. Toutefois, Allouche et al. (2011) avaient montré que certains triterpènes présents dans l'huile des

grignons ont une activité antiproliférative par induction à l'apoptose contre les cellules des deux lignées tumorales MDA-MB-231 et MCF7 du cancer du sein humain, cependant, d'autres composés phénoliques du même extrait n'ont aucun effet apoptotique sur la lignée MDA-MB-231 mais sont actifs contre la lignée macrophagique humaine U937. Rodriguez et al. (2013) avaient démontré que certains polyphénols comme le resvératrol, la curcumine, la (-) épigallocatechine-3-gallate (EGCG) et le pterostilbene ont pu empêcher la carcinogenèse par une induction à l'apoptose et ce contre différents types de cancers (le cancer du côlon, du poumon, de la prostate, du sein, mélanome ou une leucémie). D'autres chercheurs ont pu trouvé que la quercétine peut inhiber la propagation des cellules malignes de cancer pancréatique de rat en provoquant l'apoptose (Nutra News, 2002).

Dans d'autres cas, la cytotoxicité est accompagnée par l'induction de mutation cytoplasmique en provoquant des dommages au niveau de la mitochondrie en causant la mort cellulaire par apoptose (Garcia-Lafuente et al. 2009, Thompson, 1995). Cependant, la littérature manque d'études de l'activité anticancéreuse associée à la mort cellulaire par apoptose induite par les extraits phénoliques des grignons et des margines. Toutefois, Xuesong Chen et al. (2014) ont pu identifié un effet antiprolifératif par induction à l'apoptose contre les cellules cancéreuses du sein induit par les composés phénoliques extraits du thé. Les travaux de Yamane, et al. (1991) et Narisawa et Fukaura, (1993) étaient parmi les premiers qui ont suggéré que l'administration orale des polyphénols du thé vert, même à faibles doses, est efficace dans la prévention de la cancérogénèse du colon, induite chimiquement, en inhibant l'angiogenèse et la métastase et en induisant l'apoptose par la réglementation de multiples voies de signalisation. Ainsi, l'administration de ces polyphénols peut également faciliter la régression du cancer colorectal *in vivo*.

Par ailleurs, il a été rapporté que certains agents anticancéreux comme les composés phénoliques peuvent dans certains cas intervenir au niveau du processus du cycle cellulaire à différentes phases G0/G1, S, ou G2/M, et empêcher la carcinogenèse en affectant les événements moléculaires dans le déclenchement et les étapes de progression cellulaire (Schwartz et al. 2005, Yang et al. 2001). En effet, Owen et al. 2000 avait rapporté que les composés phénoliques de l'huile d'olive, par exemple, modulent la sécrétion des protéines kinases intervenant dans la prolifération des cellules tumorales et induisent l'expression des enzymes anti-carcinogéniques. Ces composés se sont révélés être impliqués directement dans l'inhibition de la progression du cycle cellulaire et par conséquent dans l'inhibition de la

réplication de l'ADN des cellules tumorales (Garcia-Lafuente et al. 2009; Houtgraaf et al. 2006). Récemment, Allouche et al. (2011) ont montré que l'acide oléanolique, un composé triterpénique inhibe la prolifération des cellules cancéreuses à la phase G₀/G₁. Dans une autre étude, Jaafari, (2010) avait montré que le carvacrol, un composé phénolique présent dans le thym, inhibe la prolifération cellulaire à la phase S. Dans le même sens, la quercétine peut inhiber la prolifération de la lignée cellulaire (U937) via l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M (Lee et al. 2006). Aussi, la toxicité des polyphénols tels que les flavonoïdes, la quercétine en particulier, la catéchine et les lignanes peut influencer le métabolisme des pro-cancérigènes en modulant l'expression d'enzymes du cytochrome P450 impliquées dans leur activation (Scalbert, 2003).

Ainsi, il est fort probable que les composés phénoliques actifs dans nos essais, notamment les flavonoïdes, la quercétine en particulier, l'hydroxytyrosol et les lignanes exercent un mécanisme similaire dans leur action antiproliférative contre les cellules cancéreuses étudiées.

D'après les travaux de Garcia-Lafuente et al. (2009), plusieurs mécanismes d'action sont identifiés pour l'effet de la chimio-prévention des polyphénols. Il s'agit notamment de l'activité oestrogénique/anti-oestrogénique, antiproliférative et anti-inflammatoire, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'induction de l'apoptose, la prévention de l'oxydation, la régulation du système immunitaire et les changements dans la signalisation cellulaire. De futures études sont nécessaires pour clarifier le mécanisme d'action de ces polyphénols dans le processus d'inhibition de la prolifération des cellules tumorales.

D'autre part, plusieurs études ont montré que les composés anticancéreux exercent une activité antitumorale en impliquant un mécanisme antioxydant (Pan et al. 2008). Ceci pourrait être avancé pour expliquer aussi l'action antiproliférative de nos extraits phénoliques des grignons et des margines. Peu de données ont été réalisées dans ce sens. Néanmoins, il est couramment admis que les polyphénols à pouvoir antioxydant préviennent l'apparition de maladies liées au stress oxydatif (cancer, vieillissement,...) par l'action de l'inhibition des réactions d'oxydation et le piégeage des radicaux libres (Ramos et al. 2013; Yang et al. 2001; Kamaraj et al. 2007). D'après la publication de Kouamé et al. (2009), l'action anticancéreuse de certains composés phénoliques impliquerait leur activité antioxydante qui pourrait intervenir conjointement. Nous avons noté que les extraits phénoliques (notamment ceux dérivés des margines de la région de montagne) riches en hydroxytyrosol, en flavonoïdes, et

en acides phénoliques sont dotés d'un pouvoir antioxydant élevé (chapitre 4). Ces mêmes extraits ont montré une activité antiproliférative importante. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Ramos et al. (2013) qui ont rapporté que l'activité antiproliférative des extraits phénoliques des grignons était due à la richesse de ces extraits en hydroxytyrosol. D'autres familles de composés phénoliques comme les acides phénoliques et les flavonoïdes ont démontré une activité antioxydante efficace et ont également prouvé des activités anticancéreuses (Owen et al. 2000; Yang et al. 2001). La quercétine a également été signalée à posséder des biens anticancéreux grâce à son effet antioxydant attribué au piégeage des radicaux libres (Kamaraj et al. 2007). D'après la publication de Allouche et al. (2011), les composés triterpéniques se sont comportés comme des antioxydants, dans le système cellulaire, en réduisant les niveaux des EOR endogènes et exogènes.

Du point de vue de l'effet cytotoxique sur les PBMC, les résultats ont montré une augmentation du nombre de ces cellules qui reflète un effet stimulateur de la prolifération des lymphocytes par les extraits phénoliques des grignons et des margines (Figure 44). En effet, la viabilité des cellules a été augmentée jusqu'à 46% et de 16 % sous l'effet des extraits des margines et des grignons, respectivement. Nous pourrions alors suggérer que les composés phénoliques contenus dans ces extraits sont des molécules qui pourraient impliquer différents mécanismes immunologiques. Ces données pourraient être en accord avec d'autres études qui se sont intéressées à l'effet immunitaire modulateur des polyphénols. Ainsi, Suarez et al. (2010) avaient trouvé un intérêt particulier aux dérivés sécoïridoïdes, notamment le 3,4-DHPEA-EDA et l'acide élénolique extraits des grignons, pour leur effet protecteur contre les dommages oxydatifs dans les globules rouges humaines après digestion gastrique (Paiva-Martins et al. 2010).

Des travaux plus récents ont rapporté que l'hydroxytyrosol augmente significativement le pourcentage de viabilité des PBMC (Ilavarasi et al. 2011). Ce composé phénolique réduit les dommages d'ADN, des lipides et des protéines et renforce le pouvoir antioxydant intracellulaire des enzymes de ces cellules. Grâce à sa propriété amphiphile, il est facilement absorbé par les cellules (Rietjens et al. 2006). Ce composé possède un pouvoir puissant à protéger les cellules normales contre l'immun-toxicité causée par les éventuels contaminants environnementaux et peut induire ainsi leur croissance (Ilavarasi et al. 2011). Le même intérêt a été porté par Schaffer et al. (2010) qui ont démontré une cyto-protection des cellules du cerveau par un extrait riche en hydroxytyrosol des extraits des margines sous différentes

contraintes ou paradigmes.

Dans le même cadre, la biodisponibilité des composés phénoliques dans les cellules pourra aussi avoir une particularité intéressante. Serra et al. (2012) avaient trouvé que les composés phénoliques extraits des grignons d'olive ont révélé des effets de cyto-protection probablement dus à l'hydroxytyrosol. En effet, après leur digestion, ces composés notamment les acides phénoliques, les flavonoïdes (lutéoline), les dérivés de l'oleuropéine, les phénols simples (hydroxytyrosol), sont absorbés, métabolisés et distribués directement dans les tissus, le plasma, et certains organes en particulier le cerveau, les reins, le cœur et les testicules, confirmant ainsi leur rôle dans la défense oxydative dans les cellules normales (Serra et al. 2012, Schaffer et al. 2010). Seulement les preuves de l'effet de ces composés chez l'Homme restent encore insuffisantes.

Aussi, Johnson et al. (1994) avaient montré que des polyphénols, tels que la quercétine, la catéchine, les lignanes, et les flavanones ont des effets protecteurs contre les phénomènes d'oxydation observés au niveau des cellules de l'estomac, la bouche, le duodénum, le côlon, le foie, les poumons, les glandes mammaires et la peau, bien que leurs mécanismes d'action sont différents.

Ces données suggèrent l'implication des polyphénols présents dans nos extraits dans la sensibilité induite des PBMC, en particulier l'hydroxytyrosol, les dérivés sécoïridoïdes, les acides phénoliques et les flavonoïdes. Il serait donc intéressant de déterminer quels sont les composés polyphénoliques spécifiques impliqués dans le potentiel immunitaire modulateur des cellules normales. Par conséquent, une meilleure connaissance de la biodisponibilité de ces polyphénols est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs des cellules saines. Plusieurs chercheurs affirment de plus en plus que le traitement du cancer passerait par le système immunitaire. On estime aujourd'hui que l'immuno-modulation est l'une des stratégies les plus prometteuses pour traiter cette pathologie.

L'activité anticancéreuse des extraits phénoliques des sous-produits d'huile d'olive a été rarement rapportée dans la littérature scientifique à ce jour. C'est la première fois que l'activité antiproliférative des extraits phénoliques des margines et des grignons contre les cellules tumorales P815 et MCF7 associée au pouvoir immuno-modulateur des cellules saines ont été démontrés.

Ceci rend ces extraits d'un grand intérêt dans le domaine de la chimiothérapie anticancéreuse et offre une approche pharmacologique naturelle dans la prévention du stress oxydatif sans effets secondaires comparativement aux thérapies chimiques.

En résumé, après avoir montré dans le chapitre 4 que les extraits phénoliques des grignons et des margines ont un fort pouvoir antioxydant, nous avons ici observé que ces extraits phénoliques pourraient avoir un pouvoir cytotoxique important contre les cellules cancéreuses. Nos résultats suggèrent que les extraits phénoliques testés peuvent avoir le potentiel à fournir une défense naturelle significative contre le cancer. Cet effet est fortement corrélé à la teneur en polyphénols et à la composition chimique des extraits, il dépend aussi de la sensibilité de la lignée tumorale à l'effet toxique des composés phénoliques. Cette conclusion est fondée sur les constatations suivantes: effets antiprolifératifs et cytotoxiques, mort cellulaire induite par apoptose, et aucun effet cytotoxique sur les cellules normales avec un pouvoir sélectif et immunostimulant. Nos résultats plaident donc en la faveur du rôle des polyphénols des extraits naturels des margines et des grignons d'olive dans les défenses cellulaires contre les proliférations cancéreuses.

Conclusions générales

Les propriétés biologiques manifestées par les biophénols de l'huile d'olive et ses sous-produits ont poussé un grand nombre de chercheurs à doubler d'efforts pour trouver des méthodes adéquates pour l'extraction, la purification et l'identification de ces polyphénols. Ceci était la conséquence de deux arguments majeurs, d'une part, l'impact manifeste des rejets des sous-produits des huileries sur l'environnement (7 à 30 millions m³ par an), et d'autre part, les prestations de santé apparentes attribuées au succès de la diète méditerranéenne basée sur la consommation de l'huile d'olive vierge et généralement associée à une incidence plus faible de certains cancers et maladies cardio-vasculaires et neuro-dégénératives (Owen et al. 2000). La compréhension des mécanismes d'actions de ces polyphénols est un enjeu majeur car elle pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies naturelles de lutte contre les maladies pathogènes humaines.

L'objectif de ce travail était donc d'apporter de nouvelles informations concernant le rôle potentiel des polyphénols extraits des margines et des grignons d'olive dans le domaine des thérapies naturelles. Notamment, nous souhaitons : (i) identifier les polyphénols majoritaires dans les extraits des grignons et des margines des différents échantillons étudiés et comparer leur teneurs en polyphénols totaux en fonction de leur zones bioclimatiques afin de (ii) tester leur activité antioxydante et antimicrobienne *in vitro*, (iii) évaluer l'effet antiprolifératif *in vitro* de ces extraits phénoliques contre les cellules tumorales et comprendre ainsi l'effet de ces extraits sur l'induction de la mort cellulaire programmée (apoptose), (iv) vérifier si ces activités sont corrélées positivement à la composition chimique, à la concentration en extrait et/ou à la teneur totale en polyphénols, (v) et enfin tester l'effet cytotoxique sur les cellules normales de l'organisme et vérifier si ces extraits n'ont pas d'effets secondaires sur les cellules saines en comparaison à la chimiothérapie conventionnelle.

Pour cela nous avons choisi de travailler avec le matériel végétal collecté dans les périmètres de la région de Tadla Azilal (Maroc). En effet, l'industrie d'huile d'olive est très développée dans cette région avec un patrimoine oléicole important.

La mise en œuvre de méthodes de couplage, la HPLC-MS et la spectroscopie infrarouge, nous a permis de montrer une richesse et une variabilité dans la composition chimique, notamment la composition phénolique des extraits des grignons et des margines étudiés.

Une variabilité qui est due à un certain nombre de facteurs bioclimatiques. Nous avons donc

pu identifier cinq principales familles de polyphénols: les phénols simples (Tyrosol et hydroxytyrosol), les acides phénoliques (l'acide vanillique, p-coumarique, caféique, sinapique, et syringique,...), les flavonoïdes (lutéoline, apigénine et leur dérivées, la quercétine, la rutine et la vanilline), les dérivés sécoïridoïdes (oleuropein, ligstroside, verbascoside, l'hydroxytyrosol glucoside, l'oleuropéine aglycon, ...), et les lignanes (pinorésinol et 1-acetoxypinorésinol). Le dosage des polyphénols totaux a montré que les extraits des margines sont plus riches en polyphénols que ceux des grignons et que les extraits des zones montagneuses possèdent les teneurs les plus élevées que les extraits des zones de plaine. Cette variation de la teneur en polyphénols dépend éventuellement des conditions climatiques et géographiques des différents sites de collecte de la région Tadla-Azilal, en particulier la variation de l'effet du stress environnemental particulier à chaque zone (plaine/montagne). Ainsi, il se peut que la plante tente de lutter par les armes qu'elle suppose adaptées comme métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques.

Puis nous avons évalué l'effet antioxydant et anti-radicalaire des extraits phénoliques des grignons et des margines en utilisant le test de piégeage des radicaux libre du réactif DPPH et le test de blanchissement au β -carotène (BCBT).

Avec la méthode au DPPH, tous les extraits testés se sont avérés actifs pour le piégeage des radicaux libres. Cette activité a été fortement liée à la concentration de l'extrait phénolique des grignons et des margines dans la mesure où le pouvoir anti-radicalaire augmente en augmentant la concentration en extrait. Nous avons montré de manière innovante que les extraits des margines sont des antioxydants plus puissants que les extraits des grignons et que les extraits des margines de la zone montagne se sont révélés encore plus actifs que ceux de la zone de plaine. Il a été intéressant de noter que la valeur de l' IC_{50} des extraits des grignons est 14 fois supérieure que celle des extraits des margines. Ceci pourra être attribué à la teneur élevée en composés phénoliques dans les extraits des margines par rapport à celle dans les grignons. En effet, nous avons démontré l'existence d'une bonne corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire au DPPH et la teneur en polyphénols totaux. Les extraits des grignons et des margines ont montré un coefficient de corrélation linéaire de $R^2 = 0,954$ et $R^2 = 0,977$ respectivement, indiquant que 95 % et 97% de la capacité antioxydante d'extraits est due à la contribution des composés phénoliques.

Dans le test BCBT, l'efficacité de nos extraits des margines de la zone montagne a été confirmée en comparaison aux extraits des grignons. La corrélation entre le pouvoir antioxydant et la concentration en extrait a été confirmée aussi dans ce test. Cependant, et en comparaison au test au DPPH, l'activité antioxydante du test BCBT produite par les extraits des grignons de la zone montagne s'est avérée moins importante que celle des extraits de la zone de plaine. Ceci était probablement dû à la haute spécificité de l'essai du blanchissement au β -carotène pour les composés lipophiles.

A l'issue de ces résultats, nous pouvons dire que l'activité antiradicalaire et antioxydante des extraits des grignons et des margines pourrait être liée à la nature de la composition phénolique dans la mesure où certains composés possèdent un pouvoir plus puissant que d'autres. L'activité antioxydante la plus élevée a été produite par les extraits qui contiennent essentiellement les phénols simples (l'hydroxytyrosol), les dérivés sécoïridoïdes (l'oleuropéine, ligstroside, le verbascoside, l'hydroxytyrosol glucoside, l'oleuropéine aglycon, ...) et les flavonoïdes (la lutéoline, la lutéoline -7- glucoside, la quercetin) dans leur profil phénolique. En effet, les extraits des margines, en particulier ceux issus des zones montagneuses ont montré une composition riche en ces composés.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne n'a pas permis de mettre en évidence des résultats clairs. Néanmoins, il semblerait que les extraits phénoliques sont actifs uniquement contre les *Staphylococcus aureus* (Gram+). L'hypersensibilité de cette souche peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements produits dans leur environnement qui est due à l'absence de la membrane externe de leur paroi cellulaire. En plus, la composition chimique des extraits étudiés pourra avoir aussi un rôle déterminant dans l'évaluation de la sensibilité des microorganismes. Ainsi, les composés phénoliques tel que l'hydroxytyrosol, la lutéoline, les acides phénoliques et l'oleuropéine ont prouvé un pouvoir antimicrobien important contre des souches bactériennes à gram positif et négatif (Bisignano et al. 1999). Cependant, nos extraits n'ont montré aucune activité contre le *Streptococcus faecalis* (Gram+) et l'*Escherichia coli* (Gram-) bien qu'ils sont riches en ces composés. Ces résultats restent généralement compatibles avec d'autres travaux similaires qui suggèrent les différences des procédures suivies et la pureté relative des substances utilisées dans les tests ainsi que la difficulté de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes naturelles (Obied et al. 2007). Ces résultats peuvent nous amener à poser les questions suivantes: Est ce que la dose utilisée des extraits phénoliques était-elle suffisante pour induire une inhibition de ces souches bactériennes ? Les composés phénoliques actifs contre ce type

de bactérie et qui ont été identifiés dans nos extraits, ont-ils subi une dégradation pendant la période de conservation ? Certains composés phénoliques ont pu inhiber l'action d'autres composés ? Il serait donc opportun de purifier les composés phénoliques avant de procéder à ce genre de tests.

En ce qui concerne l'activité antiproliférative, nous avons noté que les extraits phénoliques des grignons et des margines inhibent significativement la prolifération cellulaire de la lignée mastocytome murin (P815) en se basant sur des essais *in vitro*, et que cet effet est fortement corrélé à la concentration utilisée dans la mesure où le pourcentage de lyse augmente au fur et à mesure qu'on augmente la concentration de l'extrait phénolique. Les extraits des régions montagneuses ont présenté une activité cytotoxique importante en comparaison avec ceux des régions de plaine aussi bien pour les extraits des margines que ceux des grignons. Ceci pourra être lié à la teneur en polyphénols dans nos extraits qui est relativement plus élevée dans les extraits des zones de montagne que dans ceux de la zone de plaine. Une parfaite corrélation a été observée entre la teneur en polyphénols et le pouvoir antiprolifératif. Aussi, la composition chimique et la nature des composés phénoliques en relation avec leurs propriétés biologiques pourront avoir un effet déterminant dans l'évaluation de l'activité antitumorale *in vitro*. Nos résultats ont montrés que les extraits phénoliques, en particulier ceux originaires des régions montagneuses, sont riches en phénols simples, en dérivés sécoïridoïdes, en acides phénoliques et en flavonoïdes. Les propriétés antiprolifératives de ces polyphénols ont été mises en évidence dans différents extraits de plantes naturelles.

Par ailleurs, nous avons montré que les extraits phénoliques des grignons et des margines présentent des effets variables sur les lignées tumorales. Il a été observé que la lignée tumorale P815 est plus sensible aux extraits phénoliques testés que la lignée MCF7. Ce résultat suggère que les lignées étudiées montrent des degrés différents de sensibilité vis-à-vis de chaque extrait phénolique. A l'étude de ces résultats, on pourrait avancer que l'activité anticancéreuse pourrait être liée à la composition chimique des extraits phénoliques. Il est fort probable que les polyphénols présents dans nos extraits, notamment les flavonoïdes, la quercétine et la lutéoline en particulier, les acides phénoliques, l'hydroxytyrosol et les lignanes, dotés de pouvoir antiprolifératif prouvé, exerceraient une action antiproliférative contre les cellules cancéreuses étudiées. L'hypothèse de l'effet synergique entre ces composés n'est pas négligeable, ce qui suggère d'isoler et purifier ces polyphénols et d'étudier d'éventuels effets synergiques additifs ou antagonistes contre les cellules cancéreuses. Le

pouvoir antioxydant de ces composés pourrait aussi être avancé pour expliquer cette action antiproliférative.

A l'égard de ces résultats, nous avons cherché à déterminer si l'activité cytotoxique des extraits phénoliques des grignons et des margines contre les lignées tumorales est associée à l'induction de l'apoptose. Les résultats du test de fragmentation de l'ADN et le test de marquage des caspases à l'annexine V-Biotine ont montré que tous les extraits induisent l'apoptose pour la lignée P815. Les extraits des margines ont montré une apoptose en phase avancée par rapport aux extraits des grignons (apoptose en phase précoce). D'autres expériences devraient être réalisées pour étudier le mécanisme détaillé de l'apoptose induite par l'effet des extraits phénoliques.

En vue de déterminer le risque des effets secondaires de ces extraits phénoliques sur les cellules saines de l'organisme comparativement à la chimiothérapie conventionnelle, les résultats de l'effet cytotoxique sur les PBMC ont montré une augmentation significative du nombre de ces cellules normales, ce qui reflète un effet stimulateur de la prolifération des lymphocytes par les extraits phénoliques des grignons et des margines.

Au bilan, notre étude a apporté plusieurs informations nouvelles :

- Les extraits phénoliques des margines et des grignons d'olive marocaine sont riches en composés phénoliques naturels en particulier ceux originaires des zones montagneuses. Les extraits des margines présentent une teneur totale en polyphénols plus importante que ceux des grignons.
- Les extraits des margines en particulier ceux originaires des zones montagneuses sont dotés d'un pouvoir antioxydant marquant et peuvent réagir avec les radicaux libres pour les convertir vers des produits plus stables et mettre fin aux réactions radicalaires en chaîne.
- Ces extraits soulignent un potentiel anticancéreux prometteur sans effets secondaires qui pourrait avoir un grand intérêt pharmacologique dans le domaine de la chimiothérapie anticancéreuse. Ces résultats préliminaires pourraient constituer une base scientifique pour la recherche de nouveaux composés anti-tumoraux naturels dotés d'un pouvoir sélectif, ciblé et sans effets secondaires.

Deux arguments plaident donc en la faveur de l'intérêt porté à la valorisation des grignons et des margines d'huile d'olive :

- D'une part, la participation au développement de nouvelles thérapies naturelles dans le domaine de l'oncologie ;
- et d'autre part, la résolution d'un problème écologique majeur dans le bassin méditerranéen dans les pays producteurs d'huile d'olive comme le Maroc.

De nombreuses questions restent en suspension et différents prolongements peuvent ainsi être envisagés.

L'étude antitumorale *in vitro* des polyphénols des extraits des grignons et des margines pourrait être complétée par des essais *in vivo* en évaluant leur effet antiprolifératif sur un modèle de souris porteuses de tumeur et d'élargir le spectre d'action de ces extraits sur d'autres lignées tumorales. Des études préliminaires de mécanisme d'action, de génotoxicité et d'immuno-modulation, pourraient aussi être effectuées, ce qui donnerait plus d'informations sur le potentiel et le mécanisme d'actions de nos extraits. Il serait intéressant aussi de purifier ces composés phénoliques et de chercher les molécules responsables de l'activité anticancéreuse de ces extraits. Aussi, des essais de biodisponibilité de ces polyphénols seraient aussi d'un grand intérêt dans la mesure où la détermination des métabolites phénoliques pourrait apporter de nouvelles données sur leurs activités biologiques.

Ainsi, il serait intéressant de poursuivre l'étude de principes actifs par l'évaluation des mécanismes génomiques impliqués dans l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses, et ceci par:

- l'étude de l'effet de ces principes actifs sur l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (bcl-2, bax, c-myc, p53,...)
- l'étude de l'effet de ces molécules sur l'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Gadd, Jun, Fos,...) et établissement de la corrélation entre le niveau de cet expression et la transformation cellulaire au niveau de différents tissus et organes tel que l'appareil digestif, le sein et le sang.

Références bibliographiques

- Afify, A.S., Mahmoud, M.A., Emara, H.A., Abdelkreem, Khade, I., 2009. Phenolic Compounds and COD Removal from Olive Mill Wastewater by Chemical and Biological Procedures. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2): 1087-1095.
- Ait Mouse, H., Tilaoui, M., Jaafari, A., Ait M'barek, L., Aboufatima, R., Chait, A., Zyad, A., 2012. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* anticancer properties of Moroccan propolis extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(3): 558-567.
- Akar, T., Tosun, I., Kaynak, Z., Ozkara, E., Yeni, O., Sahin, E.N., Akar, S.T., 2009. An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace. *J Hazard Mater*, 166:1217–25.
- Alba-Mendoza, J., Ruiz-Gomez, A., Hidalgo-Casado, F., 1990. Technological evolution of the different processes for olive oil extraction. In: Erickson DR, editor. *Edible fats and oils processing: basic principles and modern practices*. Champaign, Illinois, USA: Am Oil Chem. Soc, p. 341–7.
- Albuquerque, J.A., Gonzalez, J., Garcia, D., Cegarra J., 2004. Agrochemical characterization of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technol*, 91:195–200.
- Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S., 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem*, 52: 267–273.
- Allouche, Y., Warleta, F., Campos, M., Sanchez-Quesada, C., Uceda, M., Beltran, G., Gaforio, A.J., 2011. Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. *J. Agric. Food Chem.*, 59 : 121-130.
- Alliotta, G., Fiorentino, A., Oliva, A., Tesmussi, F., 2002. Olive oil mill wastewater: isolation of polyphenols and their phytotoxicity *in vitro*. *Allelopathy J.*, 9: 9-17.
- Allu'datt, M.H., Alli, I., Ereifej, K., Alhamad, M., Al-Tawaha, A., Rababah, T., 2010. Optimization, characterization and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chem.*, 123: 117-122.
- Al Malah, K., Azzam, M., Abu-Lail, N.I., 2000. Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. *Sep Purif Technol*, 20: 225–34.
- Alonso, J. B. D., Anton, J. T., Rodriguez, J. G., Vargas, J. R. D., 2000. Ozone treatment of olive mill wastewater. *Grasas Aceites*, 51: 301-306.
- Ames, B.N., Shiginaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Nad. Acad. Sci. USA*, 90 : 7915-7922.
- Amro, B., Aburjai, T., Al-Khalil, S., 2002. Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia*, 73: 456-461.

- Andrieu, J.M., Colonna, P., Lévy, R. 1997. *Cancers: guide pratique d'évaluation, de traitement et de surveillance*. Editions ESTEM, p.1170.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002. Methods of testing antioxidant activity. *Analyst*, 127 :183-198.
- Arda, Y., Nazli, B.P., Semra, Y.T., 2010. Performance evaluation on the treatment of olive mill wastewater in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Desalination*, 262: 209–214.
- Aranda, E., Garcia-Romera, I., Ocampo, J.A., Carbone, V., Mari, A., Malorni, A., Sannino, F., De Martino, A., Capasso, R., 2007. Chemical characterization and effects on *Lepidium sativum* of the native and biomediated components of dry olive mill residue. *Chemosphere*, 69: 229-239.
- Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Ates, M., 2009. *In vitro* activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem.*, 116: 289-294.
- Assas, N., Ayed, L., Marouani, L., Hamdi, M., 2002. Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*, 38: 361–365.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S., 2010. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Cumain *Cuminum L.* *Lebanese Science Journal*, 11 (1): 69-81.
- Azbar, N., Tutuk, F., Keskin, T., 2009. Biodegradation performance of an anaerobic hybrid reactor treating olive mill effluent under various organic loading rates. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63 : 690–698.
- Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A.A., Abo-Zaid, M.A., 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, 93 : 43–54.
- Baeta-Hall, L., Sáágua, M.C., Bartolomeu, M.L., Anselmo, A.M., Rosa, M.F., 2005. Biodegradation of olive oil husks in composting aerated piles. *Bioresource Technol.*, 96(1): 69–78.
- Baillet, F., 2003. *Radiothérapie : principes, indications, effets secondaires*. Elsevier Masson. 2^{ème} Edition.
- Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W. 2006. The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73: 413-421.
- Bazoti, F.N., Gikas, E., Skaltsounis, A.L., Tsarbopoulos, A., 2006. Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Analytica Chimica Acta* 573–574, 258–266.
- Beale, P.J., Rogers, P., Boxall, F., Sharp, S.Y., Kelland, L.R., 2000. BCL-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, 82: 436-40.

- Benhayoun G., Lazzeri Y., 2007. L'olivier en Méditerranée: du symbole à l'économie: édition L'harmattan, p. 137.
- Benitez, J., Beltran-Heredia, J., Torregrosa, J., Acero, J.L., Cercas, V., 1997. Aerobic degradation of olive mill wastewaters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 47:185–8.
- Ben Sassi, A., Boularbah, A., Jaouad, A., Walker G., Boussaid, A., 2006. A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*, 41 : 74–78
- Bertin, L., Ferri, F., Scoma, A., Marchetti, L., Fava, F., 2011. Recovery of high added value natural polyphenols from actual olive mil wastewater through solid phase extraction. *Chemical Engineering Journal*, 171: 1287-1293.
- Bianchi, G., 1999. Extraction systems and olive oil. *Oléagineux corps gras lipides: volume 6, numéro 1, Janvier/Février 1999*.
- Bianco, A. Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowaka, R., & Margherita, P., 2003. Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I. *J. Sep. Sci.*, 26 : 409-416.
- Bing, U., Cini, E., Cioni, A., et Laurendi, V., 1994. Smaltimento-recupero delle sanse de oliva proveniente da un due fasi mediante distribuzione in campo. *Informatore Agrario.*, 47: 75-78.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A., 1999. On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51: 971–974.
- Bitler, C.M., Viale, T.M., Bassam Damaj, B., Crea, R., 2005. Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti inflammatory activity. *J. Nutr*, 135: 1475–9.
- Blika, P.S., Stamatelatu K., Kornaros, M., Lyberato, G., 2009. Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global Nest Journal*, 11 (3) : 364-372.
- Bloor, S.J. 2001. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Methods Enzymol.*, 335: 3-14.
- Bodin, L., 2011. *Plantes et cancer*. Edition Terres des rêves. ISBN 978-2-9522195-9-49782952219594.
- Borsani, R., Ferrando, B., 1996. Ultrafiltration plant for olive vegetation waters by polymeric membrane batteries. *Desalination*, 108: p.281.
- Boscaiu, M., Sanchez, M., Bautista, I., Donat, P., Lidon, A., Llinares, J., Mayoral, O., Vicente, O., 2010. Phenolic compounds as stress markers in plants from Gypsum Habitats. *Bulletin UASVM Horticulture*, 67 (1): 44-49.
- 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. *C. R. Biologies*, 331: 48–55.

- Bouvenot, G. 1994. Pathologie médicale: Pneumologie, néphrologie, oncologie, nutrition. Elsevier Masson. p. 548.
- Bouzi, O., Navarro, D., Rochec, M., Asthera, M., Haona, M., Delattrea, M., Lorquin, J., Labatb, M., Asthera, M., Lesage-Meessen, L., 2005. Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. *Process Biochemistry*, 40: 1855–1862.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nut Rev.*, 56: 317–33.
- Brouillard, R., 1986. Organisation des anthocyanes dans leur sites naturels. *Bull. Liaison Polyphenols*, 13 : 76-94.
- Busch, H., 1984. Onc genes and other new targets for cancer chemotherapy. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 107:1–14.
- Burnet, M., 1957. Cancer- a biological approach. *British Medical Journal*. 1: p. 779.
- Canizares, P., Lobato, J., Paz, R., Rodrigo, M.A., Saez, C., 2007. Advanced oxidation processes for the treatment of olive-oil mills wastewater. *Chemosphere*, 67 : 832–838.
- Cao, G., Russell, R.M., Lischner, N., 1998. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr*, 128 : 2383-2390.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, F., 1992. Isolation, Spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable wastewaters. *microphytochemistry*, 31 : 4125-4128.
- Capasso, R., Evidente, A., & Visca, C., 1994. Production of hydroxy- tyrosol from olive oil vegetation waters. *Agrochimica*, 38 : 165–171.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M.A., Cristinzio, G., 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J Appl Bacteriol*, 79: 393–8.
- Caputo, A.C., Scacchia, F., Pelagagge, P.M., 2003. Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Appl Therm Eng*, 23: 197–214.
- Cardoso, S.M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J.A., Renard, C., Coimbra, M.A., 2005. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and pomace by electrospray mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric*, 85: 21–32.
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., GiovannozziSermanni, G., Cascio, B.L., 2003. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50: 959–966.

- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, V., Tecce, M. F., Landriscina, C., 2002. Antioxidant effect of hydroxytyrosol (DPE) and Mn²⁺ in liver of cadmium-intoxicated rats. *Comp. Biochem. Phys. C*, 133, 625-632.
- Cayuela, M.L., 2004. Produccion Industrial de compost ecologico a partir de residuos de almazara. Ph.D. thesis. University of Murcia, Spain.
- Cegarra, J., Amor, J.B., Gonzalez, J., Bernal, M.P., Roig, A., 2000. Characteristics of a new solid olive-mill-by-product (“alperujo”) and its suitability for composting. In: Warman PR, Taylor BR, editors. *Proceedings of the international composting symposium ICS*, CBA Press Inc, 99(1): 124–140.
- Chedeville, O., Debacq, M., Porte, C., 2009. Removal of phenolic compounds present in olive mill wastewaters by ozonation. *Desalination*, 249 : 865–869.
- Chimi, H., 2006. Technologies d’extraction de l’huile d’olive et gestion de sa qualité. *Bulletin mensuel d’information et de liaison du PNTTA N° 141 juin 2006*.
- Cioffi, G., Pesca, M.S., De Capraris, P., Braca, A., Severino, L., De Tommasi, N., 2010. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121:105–111
- Clifford, M. N. 2000b. Chlorogenic acids and other cinnamates : nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. Wiley, 348.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microb. Rev.* 12 : 564-582.
- Crea, R., 2002. Method of Obtaining a Hydroxytyrosol-Rich Composition from Vegetation Water. U.S. Patent, 6, 416, 808.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, 26 : 1001-1043.
- Dangles, O., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, p. 29-50.
- Dangles, O., Dufour, C., 2008. Recent advances in Polyphenol Research. Chapter, 3 : 67- 87.
- D’Annibale, A., Ricci, M., Quarantino, D., Federici, F., Fenice, M., 2004. Panustigrinus efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology*, 155: 596–603.
- D’Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 43 : 348-361.
- Deiana, M.; Aruoma, O.I., Bianchi, M.D.P., Spencer, J.P.E., Kaur, H., Halliwell, B., Aeschbach, R., Banni, S., Dessi, M.A., Corongiu, F.P., 1999. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radical Biol. Med.*, 26: 762-769.

- Della Greca, M., Previtiera, L., Temussi, F., Zarrelli, 2004. A. Low- molecular-weight components of olive oil mill wastewaters. *Phytochem. Anal.* 15 : 184-188.
- De La Puerta, R., Gutierrez, V.R., & Hoult, J.R.S., (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical Pharmacology*, 57 : 445–449.
- De La Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Catellote, A. I., Lamuela-Raventos, R. M., & Lopez-Sabater, M. C. (2005). Characterization and quantification of phenolic compounds in Olive Oils by Solid-phase Extraction, HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11) : 4331-4340.
- De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., Sacchi, R., 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry* 104: 858–867.
- De Monpezat, G., Denis, J.F., 1999. Fertilisation des sols méditerranéens avec des issues oléicoles. *Oléagineux corps gras lipides*: vol. 6, num ; 1, Janvier/Février 1999.
- Dermeche, S., Nadoura, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., 2013. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48:1532–1552
- DeVita, V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg S.A., Weinberg, R.A., DePinho., R.A., DeVita, Hellman, and Rosenberg's. 2008. *cancer: principles & practice of oncology*. Lippincott Williams & Wilkins. p.1680.
- Dias, A., Bezerra, R., Pereira, A., 2004. Activity and elution profile laccase during biological decolorization and dephenolisation of olive mill waste water. *Bioresource Technology*, 92 :7-13.
- Didry, N., Seidel, V., Dubreuil, L., Tillequin, F., Bailleul, F., 1999. Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. *Journal of Ethnopharmacology*, 67 : 197–202.
- Di Gioia, D., Fava, F., Bertin, L., Marchetti, L., 2001. Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biot.* 55 : 619–626.
- Di Giovacchino, L., Prezioso, S., 2006. Utilization of olive mill by-products. In: *Proceedings of Olive biotech. Recent advances in olive industry*, p. 379–89.
- Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97: 654-660.
- Drużyńska, B., Agnieszka, S., Rafał, W., 2007. The effluence of time and type of solvent of efficiency of the extraction of polyphenols from green tee and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 6(1) : 27-36.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.*, 35: 495-516.

- Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G.F., Morozzi, G., 2002. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur. J. Cancer PreVention*, 11 : 351-358.
- Fazeli, M.R., Amin, G., Ahmadian-Attari, M.M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N., 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishane shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*, 18: 646-649.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127: 2893-917
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11.
- Fernandez-Bolanos, J., Rodriguez, G., Rodriguez, R., Heredia, A., Guillen, R., Jimenez, A., 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two- phase olive oil processing or “Alperujo”. *J. Agric. Food Chem.*, 50 :6804-6811.
- Fezzni, B., Ben, Cheikharticle, R., 2009. Extention of the biodegradation odel N0.1 (ADM1) to include phenolic compounds biodegradation process for the simulation of anaerobic co-digestion of olive mill wastes at thermophilic temperature. *Journal of Hazardous Materials*, 162 :1563-1570.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A., & Borja-Padilla R., 1996. Biomethanization. *Int Biodeterior Biodegrad*, p. 145–53.
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parrella, A., et al. 2003. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity comparison of low-molecular weight phenol components. *J. Agric Food Chem.*, 51: 1005–1009.
- Fiot, J., Sanon, S., Azas, N., Mahiou, V., Jansen, O., Angenot, L., Balansard, G., Ollivier, E., 2006. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera Senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 106:173-178.
- Fki, I., Bouaziz, M., Sahnoun, Z., Sayadi, S., 2005. Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. *Bioorgan Med Chem.*, 13:5362–70.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S., 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 : 1925–1941.
- Galanakis, C.M., Tornberg, E., Gekas, V., 2010. A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT - Food Science and Technology*, 43 :1009-1017.
- Galiatsatou, P., Metaxas, M., Arapoglou, D., Kasselouri-Rigopoulou, V., 2002. Treatment of olive mill waste water with activated carbons from agricultural by-products. *Waste Management*, 22 : 803-812.

- Garcia-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res.* 58:537–552.
- Garcia-Castello, E., Cassano, A., Criscuoli, A., Conidi, C., Drioli, E., 2010. Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *water reserch*, 44 : 3883-3892.
- Gibault, T., 2000 - Source APRIFEL (Flash 2000 - Santé News).
- Giovannini, C., Straface, E., Modesti, D., Coni, E., Cantafora, A., De Vincenzi, M., Malorni, W., Masella, R., 1999. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 Cells. *J. Nutr.*, 129 : 1269-1277.
- Gonzalez, M.D., Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J., Ramos- Cormenzana, A., 1990. Studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (alpechin): Inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere*, 20 : 423-432.
- Gonçalves, C., Lopes, M., Ferreira, J.P., Belo, I., 2009. Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology*, 100 : 3759–3763.
- Graille, J., 2003. Lipides et corps gras alimentaires. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, p. 86.
- Guesmi, A., & Boudabous, A., 2006. Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des Régions Arides*, numéro spécial, p. 224-230.
- Hadacek, F., Greger, H., 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis* 11: 137–147.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Methods Enzymol*, 186 : 1-86.
- Hamdi, M., 1991. Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Bioresource Technol*, 36:173–8.
- Hamdi, M., & Ellouz, R., 1993. Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. *Environ Technol*, 14: 183–8.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., 1994. The correlation between oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical. Biol. Med.*, 16 : 845-850.
- Harman, D., 1954. Théorie de l'activité anti-radicalaire. WIKÉPEDIA.
- Haslam, E., 1996. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J. Nat. Prod.*, 59: 205-215.
- Hayouni, E.A, Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M., 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.*, (in press).

- Hider, R.C, Liu, Z.D and Khodr, H.M (2001). Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology*, 335 : 190-203.
- Hollman, P.C. & Katan, M.B.. 1999. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radical Res.* 3A : S75-S80.
- Houtgraaf, J.H., Versmissen, J., van der Giessen, W., 2006. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc. Revasc. Med.*, 7: 165-172.
- Ibarra, J.V., 1989. Fourier transform infrared studies of coal humic acids, *Sci. Total Environ.* 81–82 : 121–128.
- Ilavarasi, K., Kiruthiga, P.V., Pandian, S.K., Devi, K.P., 2011. Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere* 84 : 888–893.
- Italiano, A., 2011. Cancérogénèse et biologie du cancer, *Epidémiologie des cancers*. Institut Bergonié, Bordeaux.
- Italiano. A., et al. 2012. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway. *Lancet Oncol.*, 13(11):1133-40.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F. et al. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes *Science*, 275: 218-220.
- Johnson, I.T, Williamson, G., Musk, S.R.R.,1994. Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients. *Nutr Res Rev.*, 7:175–204.
- Juarez, M.J.B., Zafra-Gomez, A. Luzon-Toro, B., Ballesteros-Garcia, O.A., Navalon, A., Gonzalez, J., Vilchez, J.L., 2008. Gas chromatographic–mass spectrometric study of the degradation of phenolic compounds in wastewater olive oil by *Azotobacter Chroococcum*. *Bioress. Tech.* 99: 2392–2398.
- Juili, I., Taji, M.A., Amraoui, F., Tahiri, M., 2013. Climate variability and water resources in waters hed Oum Errbia. *Science Lib Vol 5 N ° 130407 ISSN 2111-4706*.
- Jaafari, A., 2010. Thèse doctorale. Contribution à l'étude de l'activité antitumorale des extraits du thym marocain: analyse cellulaire et moléculaire. Université Sultan Mouly Slimane, FST Béni Mellal.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G., 1994. *J. Am. Chem. Soc.*, 116 : 4846-4851.
- Kamaraj, S., Vinodhkumar, R., Anandakumar, P., Jagan, S., Ramakrishnan, G., Devaki, T., 2007. The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a)pyrene. *Biol Pharm Bull*, 30 : 2268–2273.
- Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Avramaki,Ch., Angelakis, A.N., 2006. Olive mill waste water management in river basins: A case study in Greece. *Agricultural Water Management*, 82:354–70.

- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem.*, 100: 584-589.
- Kaufmann, S.H., et M.O. Hengartner. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 11:526-534.
- Kavvadias, V., Doula, M.K., Komnitsas, K., Liakopoulou, N., 2010. Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *Journal of Hazardous Materials*, 182 : 144–155.
- Khoufi, S., Aloui, F., Sayadi, S., 2006. Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Research*, 40 : 2007-2016.
- Khoufi, S., Aloui, F., Sayadi, S., 2008. Extraction of antioxidants from olive mill wastewater and electrocoagulation of exhausted fraction to reduce its toxicity on anaerobic digestion. *Journal of hazardous materials*, 151 : 531-539.
- Khoufi, S., Feki, F., Sayadi, S., 2007. Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 142 : 58- 67.
- Khoufi, S., Hamza, M., Sayadi, S., 2011. Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment. *Bioresource Technol*, 102:9050–8.
- Kim, K.S., Lee, L., Lee, Y.S., Jung, S.H., Park, Y., Shin, K.H., Kim, B.K., 2003. Antioxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 85 : 69–72
- Kolokassidou, K., Szymczak, W., Wolf, M., Obermeier, C., Buckau, G., Pashalidis, I., 2009. Hydrophilic olive cake extracts: Characterization by physicochemical properties and Cu (II) complexation. *Journal of Hazardous Materials*, 164 : 442–447
- Kouamé, J., Gnoula, C., Pale, E., Bassole, H., Guissou, P., Simporé, J., Nikiméa, J-B. 2009. Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). *Science et technique, Sciences de la santé*, Vol. 32, n°s 1 et 2 , Janvier-décembre.
- Kubo, I., Hanke, F.J., 1985. Chemically based resistance in plants. In *Chemically Mediated Interactions between Plants and Other Organisms*. Plenum, New York.
- Kufe, D.W., J.F. Holland, Frei,E., 2003. *Cancer medicine six*. BC Decker, pp: 2739.
- Kyprianou, N., King, E.D., Bradburg, D., Rhee, J.G., 1997. Bcl-2 overexpression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells. *Int J Cancer*, 70 : 341-8.
- Lacave, R., Larsen, C.J., & Robert, J., 2005. *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext. p. 460.
- Lacomelli, A., 2000. Olive mill waste water & SAP adopted by BACRON contracting parties.

- Work Shop on Agro- industry development in the coastal areas, with special focus on the olive oil industry. Beirut –Lebanon, 4- 6 December.
- Lafka, T.A., Lazou A.E, Sinanoglou V.J, Lazos E.S. 2011. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chem*, 125:92–8.
- Laguette, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.*, 46 : 244–282.
- Lopez-Giraldo, L.J, Laguette, M., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.C., Pina, M., Villeneuve, P., 2007. Lipophilisation de composés phénoliques par voie enzymatique et propriétés antioxydantes des molécules lipophilisées. *Fondamental, OCL*, 14 : 51-59.
- Lansdorp, P.M., 2000. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech. Ageing Dev.* 118:23-34.
- Lee, C.T., I.F. Ciernik, S. Wu, D.C. Tang, H.L. Chen, J.M. Truelson, et D.P. Carbone. 1996. Increased immunogenicity of tumors bearing mutant p53 and P1A epitopes after transduction of B7-1 via recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther.* 3:238–244.
- Lee, T.J., Kim, O.H., Kim, Y.H., Lim, J.H., Kim, S., Park, J.W., Kwon, T.K., 2006. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Letters*; 240: 234-242.
- Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P. L., Chang, Y. T., Huang, P. L., 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307 : 1029-1037.
- Léger, C.L., 1999. Co-produits de l’huilerie d’olive: les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques. *Oléagineux corps gras lipides: volume 6, numéro 1, Janvier/Février 1999.*
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J. L., Asther, M., Labat, M. 2001. Simple phenolics content in olive oil residues as a function of extraction systems. *J. Agric. Food Chem.*, 75 : 501-507.
- Leulmi, N., 2011. La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l’ovin. Université Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Dépa. de Biochimie et de Microbiologie.
- Li, Y., Shan, F., Wu, J.M., Wu, G.S., Ding, J., Xiao, D., Yang, W.Y., Atassi, G., Léonce, S., Caignard, D.H., et others. 2001. Novel antitumor artemisinin derivatives targeting G1 phase of the cell cycle. *Bioorganic & medicinal chemistry letters.* 11:5–8.
- Liu, M. J.; Li, J.X., Guo, H.Z., Lee, K.M., Qin, L., Chan, K., M., 2003. The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. *Life Sci.*, 73:883-892.
- Link, K.P., Angell, H. & Walker, J., 1929. The isolation of protocatechic acid from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. *Journal of Biological Chemistry*, 81(2) : 369.

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., et Darnell, J., 2005. Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck Supérieur, p.1088.
- Longley, D.B., et Johnston, P.G., 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.*, 205:275-292.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Sarni-Manchado, P., 2006. Les Polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, p.28.
- Madejon, E., Galli, E., Tomati, U., 1998. Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica*, 42:135–46
- Mahmoud, S., Khali, M., et Mahmoud, N., 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, n° 09 p : 35-40.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, Ch., Remesy, Ch., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 5 : 727-747.
- Mantzavinos, D., & Kalogerakis, N., 2005. Treatment of olive mill effluent: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes. *Environment International*, 31 : 289-295.
- Marshall, C.J., 1991. Tumor suppressor genes. *Cell*. 64:313–326.
- Martinez-Garcia, G., Johnson, A.C., Bachmann, R.T., Williams, C.J, Burgoyne, A., Edyvean, R.G.J., 2009. Anaerobic treatment of olive mill wastewater and pig- gery effluents fermented with *Candida tropicalis*. *J Hazard Mater*, 164: 1398–405.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robards, K., 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry.*, 73(1): 73–84.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A., De Castro, A., 2007. Main Antimicrobial Compounds in Table Olives. *J. Agric. Food Chem.* 55 : 9817-9823.
- Menendez, J.A., Vazquez-Martin, A., Garcia-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraro, C., Fernandez-Gutierrez, A., Segura-Carretero, A., 2008. Anti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *BMC Cancer* 8, 377.
- Meyer, A.S., Heinonen, M., Frankel, E.N., 1998. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.*, 61 : 71-75.
- Mila, I., Scalbert, A., Expert, D., 1996. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*, 42 : 1551-1555.
- Milder, I.E., Arts, I.C., van de Putte, B., et al. 2009. Lignan contents of Dutch plant foods : a database including lariciresinol, pinoresinol, secoiyiciresinol and matairesinol, *Br. J. Nutr.*, 93 : 393-402

- Mohsen, S.M., & Ammar, A.S.M. 2009. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem.*, 112: 595-598.
- Molina-Alcaide, E., Yáñez Ruiz D.R., 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: a review. *Anim Feed Sci Technol*, 147:247–64.
- Molyneux, P., 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2) : 211-219.
- Mordant, Y.L., P. Cancerologie. 2008. Elsevier Masson. p.573.
- Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Cormenzana, A., 1989. Antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills. In *Encyclopedia of Environmental Control Technology*, vol. 4.; Cheremi- soff, P. N., Ed.; Gulf Publishing: Houston, TX, pp. 731–757.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Meth.*; 65: 55-63.
- Mulinacci, N.; Romani, A.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Giaccherini, C.; Vincieri, F.F.,2001. Polyphenolic content in olive oil wastewaters and related olive samples. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3509- 3514.
- Narisawa T., Fukaura Y., 1993. A very low dose of green tea polyphenols in drinking water prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Jpn J Cancer Res*, 84: 1007-1009.
- Natarajan, D., John Britto, S., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., Perumal, G., 2005. Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J. Ethnopharmacol.*, 102: 123-126.
- Niaounakis, M., Halvadakis, C.P., 2004. *Olive-Mill Waste Management*, first ed. Typothito-George Dardanos, Athens.
- Niaounakis, M., Halvadakis C.P., 2006. Olive processing waste management literature review and patent survey. *Waste management series*, vol. 5, 2nd ed. Elsevier, p. 23–64.
- Nefzaoui, A., 1991. Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. *Options méditerranéens*, p.153-173.
- Nkhili, E., Thèse doctorale 2009. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech.
- Nostro, A., Germano, M.P., D'angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M.A., 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiol- ogy*, 30 : 379–384.
- Noubih, A., Abderrabba, M., Provost, E., 2007. Temperature and addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *J.Chem.Thermodynamics*, 39 : 297- 303.

- Nutra News, Polyphénols et risque de cancer, 2002. *International Journal of Cancer*, 98 : 761-769).
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., & Stockmann, R., 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.*, 53 : 823–837.
- Obied, H.K., Bedgood, DR, Prenzler, P.D, Robards, K., 2007. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1238–1248
- Obied, H.K., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., 2008. Effect of processing conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 56: 3925–3932.
- Ordonez, R., González, P., Giráldez, J.V., García-Ortiz, A., 1999. Efecto de la enmienda conal perujo sobre los principales nutrientes de un suelo agrícola. In: Munoz-Carpena R, Ritter A, Tascón C, editors. *Estudios de la Zona no Saturada*. ISBN: 84: 699-1258-5.
- Oszmiański, J., & Czemeryz, R., 2007. Antioxidant Activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105 (3) : 940-949.
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer*, 36:1235–47.
- Paiva-Martins, F., Gordon, M.H., 2001. Isolation and characterization of the antioxidant component, 3,4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl- 3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*) leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 49 : 4214-4219.
- Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Santos, V., Silva, L., Borges, F., Rocha, S., Belo, L., Santos-Silva, A., 2010. Powerful protective role of 3,4- dihydroxyphenyl ethanol-elenolic acid dialdehyde against erythrocyte oxidative-induced hemolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 58 : 135-140.
- Pan, M.H., & Ho, C.H., 2008. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer Development. *Chemical Society Reviews*, DOI: 10.1039/b801558a.
- Paradkar, M. M., & Irudayaraj, J. 2002. A rapid FTIR spectroscopic method for estimation of caffeine in soft drinks and total methylxanthines in tea and coffee. *Journal of Food Science*, 67(7) : 2507–2511.
- Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sanchez-Monedero, M.A., Bernal, M.P., 1999. Characterization of olive-mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technol*, 67:111–5.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 94: 153-6
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin*, 55 : 74-108

- Passos, J.F., G. Saretzki, et T. von Zglinicki. 2007. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acides Res.* 35:7505- 7513.
- Perez, J., Delarubia, T., Moreno, J., Martinez, J., 1992. Phenolic content and antibacterial activity of olive oil wastewaters. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11 : 489-495.
- Pharm, Minh, D., Gallezot, P., Besson, M., 2006. Degradation of olive oil mill effluents by catalytic wet air oxidation. 1. Reactivity of p-coumaric acid over Pt and Ru supported catalysts. *Applied Catalysis Environmental*, 63 : 68–75.
- Pietta, P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 : 1035–1042.
- Piperidou, C.I, Chaidou, C.I, Stalikas, C.D, Soulti, K., Pilidis, G.A., Balis, C., 2000. Bioremediation of olive oil mill wastewater: Chemical alterations induced by *Azotobacter Vinelandii*. *J Agric Food Chem*, 48: 1941-1948.
- Pitot, H.C., Loeb. D.D., 2002. *Fundamentals of oncology*. Marcel Dekker. p.1012.
- Piotrowska, A., Iamarino, G., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2006. Short-term effects of olive mill waste water (OMW) on chemical. *Soil Biology & Biochemistry*, 38 : 600–610.
- Polzoneti, V., Egidi, D., Vita, A., Vincenzetti, S., Natalini, P., 2004. Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food Chem.*, 88 : 11-15.
- Ponce, A.G., Fritz, R., del Valle, C., et Roura, S.I. 2003., Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LW u. Technol*, 36 : 679-684.
- Popovici, C., Saykova, C., Tylkowski, C., 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4 : 25-39
- Porter, W.L., 1993. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol Ind Health*, 9 : 93-122.
- Projet SMAP III –Tunisie. 2006-2008. Stratégie de gestion intégrée de la zone côtière Sud du Grand Sfax. Aménagement paysager des bassins de margine.
- Qian, Y. P.; Cai, Y. J.; Fan, G. J.; Wei, Q. Y.; Yang, J.; Zheng, L. F.; Li, X. Z.; Fang, J. G.; Zhou, B., 2009. Antioxidant-based lead discovery for cancer chemoprevention: the case of resveratrol. *J. Med. Chem.*, 52 : 1963-1974.
- Quiles, J.L., Farquharson, A.J., Simpson, D.K., Grant, I., Wahle, K.W.J., 2002. Olive oil phenolics: Effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br. J. Nutr*, 88 : 225-234.
- Ramos, R., Santos, S.A.O., Guerra, A.R., Guerreiro, O., Felício, L., Jerónimo, E., Silvestre, A.J.D., PascoalNeto, C., Duarte, M., 2013. Valorization of olive mill residues: Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Industrial Crops and Products*, 46: 359–368.
- Ramos-Cormenzana, A., Juarez-Jimenez, B., Garcia-Pareja, M.P., 1996. Antimicrobial

- activity of olive mill wastewaters (Alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 38 : 283-290.
- Ranalli, A., Lucera, L., Contento, S., 2003. Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *J. Agric. Food Chem.*, 51 : 7636-7641.
- Ranalli, A., 1992. Microbiological treatment of oil mill wastewaters. *Grasas y Aceites*, 43:16-9.
- Rana, G., Rinaldi, M., Introna, M., 2003. Volatilisation of substances after spreading olive oil waste water on the soil in a Mediterranean environment. *Agr Ecosys Environ.*, 96: 49–58.
- Rietjens, S.J., Bast, A., Vente, J.D., Haenen, G.R.M.M., 2006. The olive oil antioxidant Hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the no response of isolated rat aorta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 292: 1931–1936.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22 : 375-383.
- Robards, K., 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A.*, 1000 : 657-691.
- Robinson, R., 2001. Green tea extract may have neuroprotective effects in Parkinson's disease. *The Lancet*, 4 : p. 358.
- Rodis, P.S., Karathanos, V.T., Mantzavinou, A., 2002. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 596–601.
- Robert, J., 2002. Nouveaux concepts dans l'étude de la résistance aux médicaments anticancéreux. *Bulletin du Cancer*. 9(1): 17-22.
- Romero, C., Brenes, Garcia, P., & Garriodo, A., 2002. Hydroxytyrosol 4- β -D glucoside, an important phenolics compound in olive fruits and derived products. *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 3835-3839.
- Rodriguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolanos, J., 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Biore-source Technol*, 13 : 5261-5229.
- Rodriguez, M.L., Estrela, J.M., Ortega, A.L., 2013. Natural Polyphenols and Apoptosis Induction in Cancer Therapy. *Carcinogenesis & Mutagenesis*, S6: 004. doi:10.4172/2157-2518.S6-004
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26 : 960-969.
- Ryan, D., Robards, K., 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123 : 31R-44R.

- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K., 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (3) : 571-581.
- Sampedro, I., Romero, C., Ocampo, J.A., Brenes, M., Garcia-Romera, I., 2004. Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. *J. Agric. Food Chem.*, 52 : 4487-4492.
- Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J.A., Stazi, S.R., Garcia-Romera, I., 2005. Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere*, 60 : 1393- 1400.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri Jose, A., Saura-Calixto, F., 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2) : 270-276.
- Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. p. 2-10.
- Sasco, A.J., 2008. Cancer and globalization. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62 : 110-121.
- Sasco, A.J., 2007. Cancer, environnement et populations à l'heure de la mondialisation. *Oncologie*, 9 : 380-91
- Sasco, A.J., 2003. Cancer Prevention: how much do we really know? In: Proceedings. All-Party Parliamentary Group on Cancer. Britain Against Cancer. Cancer Plan 2: Towards 2010. The future of cancer care in the UK. Church House, Westminster, London
- Sasco, A.J., 1989. Migration et cancer. *Rev Med Intern.*,10: 341-8.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Biasci, A., Riffaldi, R., 2001. Suitability of moist olive pomace as soil amendment. *Water Air Soil Pollution*, 128:13-22.
- Scalbert, A., Jhonson, I.M., Saltmans, M., 2005. Polyphénols : antioxidants and beyond 1,2,3. *Am. J. Clin. Nut.*, 81 (1) : 2155-2175.
- Scalbert, A., 2003. Les polyphénols des fruits et légumes: un atout pour vieillir en bonne santé. Dossier de presse, 20 Novembre 2003.
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130 : 2073S-2085S.
- Scalbert, A., Monties, B., & Janin, G., 1989. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.*, 37 : 1324-1329.
- Schaffer, S., Müller W.E., Eckert, G.P., 2010. Cytoprotective effects of olive mill waste water extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol Res*, 62:322-7.
- Schwartz, G. K., Shah, M.A., 2005. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Oncol.*, 23 : 9408-9421.

- Ségal-Bendirdjian, E., Dudognon, C., Mathieu, J., Hillion, J., Besançon, F., 2005. Les multiples voies de signalisation de la mort cellulaire : avancées récentes et exploitation thérapeutique. *Bulletin du cancer.*, 92 (1) : 23-25.
- Serra, A., Rubio, L., Borrás, X., Macià, A., Romero, M.P., Motilva, M.J., 2012. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 486–496
- Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R. Miniati, E., Macchioni, A., Montedoro, G., 1999. High performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomade and 1D- and 2D- nuclear magnetic resonance characterization. *J Am Oil Chem Soc*, 76: 873-882.
- Sesli, M., Yeg enog lu, E.D., 2009. RAPD-PCR analysis of cultured type olives in Turkey. *African J Biotechnol*, 8:3418–23.
- Shahidi, F., & Naczki, M., 2003. *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Shahidi, F., & Naczki, M. 2004. *Phenolic in food and nutraceutical*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H., 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Interna. J. Food Microbiology*, 117:112- 119.
- Sharma, B.C., 2013. *In vitro* antibacterial activity of certain folk medicinal plants from Darjeeling Himalayas used to treat microbial infections. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (4): 1-4.
- Sheabar, F.Z.; Neeman, I., 1988. Separation and concentration of natural antioxidants from rape of olives. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65 : 990-993.
- Sierra, J., Martí, E., Garau, A.M., Cruañas, R., 2007. Effects of the agronomic use of olive oil mill wastewater: Field experiment. *Science of the Total Environment*, 378 : 90–94.
- Silva, S., Gomes, L. Leitao, F., Coelho, A.V., Vilas Boas, L., 2006. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruit and Leaves. *Food Sci Tech Int.*, 12(5): 385-396.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. of Enol. Viti*, 16 : 144-15
- Soengas, M.S., Alarcon, R.M., Yoshida, H., Giaccia, A.J., Hakem, R., Mak, T.W., et al. 1999. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*, 284 : 156-9.
- Solary, E. Droin, N., Battaieb, A., Corcos, L., Dimanche-Boitrel, M.T., Garrido, C., 2000. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia*, 14 : 1833-49.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H.J., 2000. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food. Agric.*, 80 :1013-1023.

- Soussi, T., Dehouche, K., Bérout, C., Soussi, T., Sévenet, N., Delattre, O., et Friguet, B., 2000. L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers humains: le lien entre l'épidémiologie et la carcinogenèse. *médecine/sciences*, 16:1387–96.
- Spandre, R., Dellomonaco, G., 1996. Polyphenols pollution by olive mill wastewaters, Tuscany-Italy. *J. Environ Hydrol.*, 4:1–13.
- Stasinakis, A.S., Elia, I., Petalas, A.V., Halvadakis, C.P., 2008. Removal of total phenols from olive mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace. *J Hazard Mater*, 160:408–13.
- Suarez, M., Romero, M.P., Motilva, M.J., 2010. Development of o phenol enriched olive oil with phenolic compounds from olive cake. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 10396-10403.
- Suarez, M., Romero, M.P., Romo, T., Macia, A., Motilva, M.J., 2009. Methods for preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 1463-1472.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.*, (in press).
- Thatte, U., et Dahanukar., S., 1997. Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs.*, 54:511-532.
- Thompson, C.B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267 : 1456-1462.
- Tilaoui, M., Ait Mouse, H., Jaafari, A., Aboufatima, R., Chait, A., Zyad, A., 2011. Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of a medicinal herb *Artemisia herba-alba*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(4): 781-785.
- Tilaoui, 2012. Thèse doctorale. Contribution à l'étude du potentiel antitumoral de L'artemisenine, des extraits d'*Artemisia herba alba* et de *Tymus broussonettii* : Analyse chimique cellulaire et moléculaire. Université Sultan Moulay Slimane, FST Beni Mellal.
- Tubiana-Mathieu, N., 2002. *Cancers : prévention et dépistage*. Elsevier Masson. p. 228.
- Tura, D., Robards, K., 2002. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *J. Chromat. A.*, 975 : 71-93.
- Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G., 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12: 484-496.
- Tyouri, M., Elbouardi, A., Manal, A., Homari, A., Ezbakhe, H., Ajzoul, T. 2007. Propriétés thermophysiques du sable émulsion Margineux utilise dans la réalisation des Pistes agricoles. 13^{èmes} Journées Internationales de Thermique. Albi, France du 28 au 30 Août.
- Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, et B. Zhivotovsky., 2008. Death through a tragedy: mitotic

- catastrophe. *Cell Death Differ.*, 15:1153-1162.
- Velentzis, L.S., Cantwell, M.M., Cardwell, C. et al. 2009. Lignans and breast cancer risk in pre- and post-menopausal women : meta-analyses of observational studies, *Br. J. Cancer*, 100 :1492-1498.
- Vierhuis, E., Servili, M., Baldioli, M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Montedoro, G., 2001. Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *J Agric Food Chem*, 49:1218–23.
- Visioli, F., Poli, A., Galli, C., 2002. Antioxidant and other biological activities of pheols from olives and olive oil. *Med Res Rev.*, 22 (1): 65-75.
- Visioli, F., Caruso, D., Plasmati, E., Patelli, R., Mulinacci, N., Romani, A., Galli, G., Galli, C., 2001. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill wastewater, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res.*, 34: 301-5.
- Visioli, F., Romaini, A., Muminacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F., Galli, C., 1999. Antioxidant and other biological activities of olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, 47 : 3397-3401.
- Vlyssides, A.G., Bouranis, D.L., Loizidou, M., Karvouni, G., 1996. Study of a demonstration plant for the co-composting of olive-oil processing wastewater and solid residue. *Bioresource Technol*, 56:187–93.
- Vlyssides, A.G, Loizidou, M., Gimouhopoulos, K., Zorpas., A., 1998. Olive oil processing wastes production and their characteristics in relation to olive oil extraction methods. *Fresen Environ Bull*, 7(5–6) : 308–13.
- Vlyssides, A.G., Loizides, M., Karlis, P.K., 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *J Clean Prod*, 12(6):603–11.
- Wack, S., 2005. Étude de modalités multithérapeutiques et diagnostiques appliquées au cancer du pancréas.
- Waris, G., Ahsan, H., 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.*, 5, 14.
- Waterman, P.G., Mole, S., 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, 1st ed.; Blackwell Scientific Publications: Oxford, U.K.,
- Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W., Chen, F., 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.*, 97: 705-711.
- Xuesong, C., Yu, L., Quishi, L., Yan, W., Hong, S., Jian, W., Guocan, C., Li, C. Xiaoqun, D., 2014. Tea polyphenols induced apoptosis of breast cancer cells by suppressing the expression of Survivin. *Scientific Reports* 4, Article number: 4416 doi:10.1038/srep04416
- Yaacoub, R., 2009. Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines

- oléagineux; intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés; thèse de doctorat; N° 2009AGPT 0048; Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech).
- Yamane, T., Hagiwara, N., Tateishi, M., Akachi, S., Kim, M., et al., 1991, Inhibition of azoxymethane induced colon carcinogenesis in rat by green tea polyphenol fraction. *Jpn J Cancer Res*, 82: 1336-1339.
- Yang, C.S., 2001. Landau, J.M., Huang, M.T, Newmark, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Ann Rev Nutr*, 21:381–406.
- Yangui, T., Dhouib, A., Rhouma, A., Sayadi, S., 2009. Potential of hydroxytyrosol rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chem.*, 117:1–8.
- Yangui, T., Sayadi, S., Gargoubi, A., Dhouib, A., 2010. Fungicidal effect of hydroxytyrosol-rich preparations from olive mill wastewater against *Verticillium dahliae*. *Crop Protection*, 29:1208–13.
- Yusuf, Y., 2006. Catechins in foods. *Trends Food Sci. Tech.*, 17 : 64-71.
- Zenjari, A., Nejmeddine, A., 2001. Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics: laboratory experiments. *Agronomie*, 21:749–755.