

N° d'ordre :

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



UNIVERSITE DJILLALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
SIDI BEL ABBES

**THESE
DE DOCTORAT EN SCIENCES**

Présenté par:

M^{elle} AISSAOUI Yamina

Spécialité : Sciences biologiques

Option : Biochimie et santé

Intitulé

Détermination des principes nutritionnels et fonctionnels de l'huile d'olive de la région ouest d'Algérie. Effets immunomodulateur et anti-inflammatoire chez le rat Wistar.

Soutenu le : / /2016

Devant le jury composé de :

<i>Président :</i>	Pr ABBOUNI Bouziane	UDL-SBA
<i>Examineurs :</i>	Pr RIAZI Ali	Université de Mostaganem
	Pr BELABID Lakhdar	Université de Mascara
	Pr ZAHZEH Touria	UDL-SBA
	Dr BACHIR RAHO Ghalem	Université de Mascara
<i>Rapporteur:</i>	Pr BENALI Mohammed	UDL-SBA

DEDICACES



Je dédie ce travail

*À ma chère mère qui m'a toujours soutenu durant toute ma vie moralement et
matériellement grand **Mercie maman.***

À mon cher père qui m'a soutenu et encourage.

À toutes mes sœurs : Rachida, Latifa, Hiba, et Amel.

À tous mes frères : Amir Abdelkader ;youcef , et Boumediene .

À toutes mes chères amies que j'aime.

À tous mes cousins et cousines, spécialement a ma cousine Habiba en

Reconnaissance de ces encouragements.

Aux l'âmes de mes grands pères et mes grands mères.

*À tous les personnes qui portent le nom **AISSAOUI** à travers le monde*

*Enfin à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce
travail*

Aissaoui yamina

Remerciements

Avant tout je remercie le grand DIEU le plus miséricordieux sans lequel je n'aurai jamais pu achever ce travail.

*Mes premiers remerciements iront tout d'abord à mon enseignant et mon directeur de thèse le **Pr. BENALI Mohammed** qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et qui a manifesté beaucoup d'effort à l'égard de mon travail, pour son guide précieux, ses judicieux conseils pratiques, pour son encadrement efficace et rigoureux, je le remercie d'avoir consacré beaucoup de son temps de repos à la réalisation de cette thèse. Je lui exprime ma vive reconnaissance et ma profonde et respectueuse considération. Veuillez trouver ici mon enseignant, le témoignage de ma sincère gratitude et mon profond respect pour tous ce que vous avez fait pour moi*

*J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur **ABBOUNI Bouziane** Professeur à l'université de Sidi Bel Abbés, qui a bien voulu accepter de présider ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude et mon profond respect.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **RIAZI Ali** de l'université de Mostaganem qui me fait l'honneur d'examiner ce travail et de siéger dans ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me fait madame **ZAHZEH Touria**, Professeur à l'université de Sidi Bel Abbés, en acceptant de juger ce travail.*

*J'exprime aussi mes remerciements à Monsieur le Professeur **BELABID Lakhdar** de l'université de Mascara qui a bien voulu examiner ce travail.*

*J'exprime aussi mes remerciements à Monsieur le Docteur **BACHIR RAHO Ghalem** de l'université de Mascara qui a bien voulu examiner ce travail.*

*Un spécial remerciement pour le responsable d'huilerie de groupe **CHIALI** de la zone industrielle de Sidi Bel Abbes Mr Medadha Mostafa pour sa collaboration, et le soutien durant la réalisation de ce travail.*

Un grand remerciement à M^{me} Khatibe Djamilia chef de service au laboratoire d'analyses de L'OROLAIT de la willaya de Mascara pour son aide matérielle et morale.

Je remercie vivement tous les membres du laboratoire de biotoxicologie de l'université Djillali Liabes sans oublier les travailleurs du laboratoire du CACQE de la wilaya d'Oran pour leur soutien et leur appui matériel.

J'adresse mes chaleureux remerciements à tout le personnel du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital de la wilaya de Mascara pour son soutien et son appui matériel durant la réalisation de ce travail.

Enfin je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Je dédie ce travail

À mon cher père qui.....

À ma chère mère qui m'a soutenu.....

À tous mes frères :

À toutes mes sœurs :

À toutes mes chères amies :.....

À tous mes collègues :.....

*Enfin à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce
modeste travail.*

RESUME

L'huile d'olive vierge extra locale est caractérisée sur le plan physicochimique et organoleptique. Les résultats des analyses sensorielles montrent qu'elle présente une couleur verte pâle ne révélant ni goût ni odeur d'altération avec un aspect limpide à 20°C pendant 24h. Elle présente une amertume et un caractère piquant décelés par un jury de dégustation qui lui a conféré la note de 03/10 pour chacun. Elle présente aussi une intensité fruitée notée 4,8/10. Les paramètres physicochimiques, en l'occurrence l'acidité (0,1% d'acide oléique), la densité (0,916), l'indice de peroxyde (04), l'indice de réfraction (01,4685) et l'indice de saponification (184) sont conformes aux normes. L'analyse du spectre des acides gras obtenu par chromatographie en phase gazeuse montre une richesse équivalente à 80% en acide oléique, en plus des acides gras indispensables, et en polyphénols totaux avec une valeur de 280 mg/kg exprimée en acide gallique. L'étude *in vivo* de l'activité immunomodulatrice de cette huile est effectuée chez les rats Wistar mâles et femelles âgés de 8 semaines. Une injection sous-cutanée de l'huile d'olive vierge extra en présence d'ovalbumine comme immunogène avec et sans adjuvant de Freund est effectuée dans le cadre d'un protocole d'immunisation de 35 jours. Une dose de 300 microlitres d'huile d'olive vierge extra est injectée aux groupes expérimentaux mâles et femelles simultanément avec une injection de 300 microlitres de solution antigénique d'ovalbumine en présence d'adjuvant de Freund. Le diamètre de précipité (5,56 mm \pm 0,74) chez les femelles témoins est supérieur à celui des mâles témoins (3,9 mm \pm 0,45) témoignant ainsi d'une différence de stimulation plus intense chez les femelles témoins ($p < 0,001$). Chez les groupes expérimentaux, on relève aussi une différence très hautement significative ($p < 0,001$). L'injection d'huile d'olive vierge extra exerce un effet immunomodulateur chez les rats Wistar plus particulièrement chez les femelles se traduisant par une réduction du taux des immunoglobulines G sériques. Le traitement des rats avec différentes doses d'HOVE (150 μ L, 250 μ L, 300 μ L) suite à une inflammation provoquée par la carragénine à 1% a montré que ce produit naturel exerce un effet anti-inflammatoire comparé à celui du Diclofenac qui est estimé par l'évaluation des paramètres de l'inflammation aigüe en l'occurrence les globules blancs, la CRP et le fibrinogène.

Mots clés: Huile d'olive vierge extra, Analyses sensorielles, Analyses physicochimiques, Rats Wistar, Ovalbumine, Effet immunomodulateur, Carragénine, effet anti-inflammatoire.

ABSTRACT

Physicochemical and organoleptic characterization of locally extra virgin olive oil was performed. The results of sensory evaluation showed that it has a pale green color revealing neither taste nor smell alteration with a clear appearance at 20 °C for 24 h. It has a bitter and pungent character identified by a panel of tasting which gave it a score of 03/10 for each. It also has a fruity intensity rated 4.8/10. Physicochemical parameters, in this case the acidity (0.1% oleic acid), the density (0.916), the peroxide value (04), the refractive index (01.4685) and saponification (184) were in conformity with standards. Analysis of the fatty acid spectrum obtained by gas chromatography shows a wealth equivalent to 80% of oleic acid, in addition to essential fatty acids, and total polyphenols with a value of 280 mg/kg expressed as gallic acid. The *in vivo* study of the immunomodulatory activity of this oil was performed in Wistar male rats and female aged 8 weeks. A subcutaneous injection of extra virgin olive oil in the presence of ovalbumin as an immunogen with and without Freund's adjuvant was made in the course of a 35 day immunization protocol. A dose of 300 microliters of extra virgin olive oil was injected to male and female experimental groups simultaneously with an injection of 300 microliters of antigen ovalbumin solution in the presence of Freund's adjuvant. The precipitate diameter ($5.56 \text{ mm} \pm 0.74$) in the control females was higher than that of control males ($3.9 \pm 0.45 \text{ mm}$) and showing a more intense stimulation difference in control females ($p < 0.001$). In experimental groups, there were also a very highly significant difference ($p < 0.001$). The injection of extra virgin olive oil has an immunomodulatory effect in Wistar rats especially in females resulting in a reduction of serum immunoglobulin G levels. Treatment of rats with different doses of HOVE (150 μ L, 250 μ L, 300 μ L) subsequently to the inflammation caused by carrageenan at 1% was shown that this natural product exerts an anti-inflammatory effect compared to that of Diclofenac and is estimated by evaluating parameters of the acute inflammation in this case white blood cells, CRP and fibrinogen.

Keywords: Extra virgin olive oil, Sensory analysis, Physicochemical analysis, Wistar rats, Ovalbumin, Immunomodulatory effect, Carrageenan, anti-inflammatory effect

ملخص

خضع زيت الزيتون البكر الممتاز المحلي لدراسة حسية وفيزيوكيميائية. نتائج التحاليل الحسية أظهرت أنه ذو لون أخضر باهت بدون ذوق ولا رائحة تدل على تلفه أو فساده، مع مظهر شفاف عند درجة حرارة 20 مئوية خلال 24 ساعة. يتميز بذوق مر لاذع مثبت من طرف لجنة التذوق، التي أعطت علامة 3/10 لكل خاصية من الخواص السابقة وعلامة 4.8/10 لخاصية ذوق الفاكهة. نتائج التحاليل الفيزيوكيميائية المتمثلة في الحموضة (0.1%) المتمثلة في حمض الأوليك، الكثافة (0.916)، عامل البيروكسيد (4)، عامل إنكسار الضوء، (1.4685) وعامل التصين (184). هذه النتائج مطابقة للمعايير الدولية المعمول بها بالنسبة لزيت الزيتون البكر الممتاز. التحليل الطيفي للأحماض الدهنية بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا الغازية، أظهرت أن زيت الزيتون البكر الممتاز محل الدراسة غني بـحمض الأوليك بنسبة تقدر بـ80%. بالإضافة إلى الأحماض الضرورية. الدراسة الحية للتأثير المناعي لعينة زيت الزيتون قيد الدراسة على فئران الوستار ذكور وإناث البالغة 8 أسابيع. الحقن تحت الجلدي لزيت الزيتون في نفس الوقت مع حقن بروتين زلال البيض كمولد الضد مع وجود أو بدون مضاف فروند، وذلك باتباع بروتوكول التحفيز المناعي لمدة 35 يوم. جرعة 300 ميكرو لتر من زيت الزيتون البكر الممتاز حققت لفئران التجارب الوستار ذكورا وإناثا في نفس الوقت مع حقن 300 ميكرو لتر من بروتين زلال البيض بوجود مضاف فروند. كذلك حقن جرعة 150 ميكرو لتر من زيت الزيتون البكر الممتاز لفئران الوستار إناث مع 150 ميكرو لتر من محلول مولد الضد بروتين زلال البيض بدون مضاف فروند. قطر الترسب المناعي (0.74 ± 5.56 ميليمتر) عند الإناث الشاهدة أكبر من نظيره عند الذكور الشاهدة (0.45 ± 3.9 ميليمتر) مثبتة بذلك الإستجابة المناعية القوية عند الإناث ($p < 0,001$). نفس النتائج للتحليل المناعي ظهرت عند المجموعة التجريبية ($p < 0,0001$). نتائج حقن زيت الزيتون للإناث مع حقن محلول مولد الضد بدون مضاف فروند بواسطة تقنية الانتشار المناعي القطري العكسي لم تظهر أي اختلاف معتبر مقارنة مع مجموعة الإناث الشاهد ($p < 0,001$). حقن زيت الزيتون البكر الممتاز له تأثير على الاستجابة المناعية عند فئران الوستار خاصة عند الإناث مبينة بهبوط نسبة الغلوبينات G المناعية في المصل.

دراسة مفعول زيت الزيتون البكر الممتاز كمضاد للإلتهاب و ذلك بجرعات مختلفة (150-250-300 ميكرو لتر) بينت أن هذا الأخير له مفعول مماثل لمفعول الديكلوفيناك (Diclofenac) باختلاف ملحوظ ($p < 0,01$)

الكلمات المفتاحية: زيت الزيتون البكر الممتاز ، التحاليل الحسية، التحاليل الفيزيائية، بروتين زلال البيض، فئران وبستار ، التأثير المناعي، التأثير ضد الإلتهاب ، كراجنين.

Liste des figures

Figure 01 : Olivier sur l'île grecque d'Ithaque, réputé pour être âgé de plus de 1500 ans.....	6
Figure 02 : Fleurs d'olivier en période de floraison.	7
Figure 03 : Diagramme de traitement des olives	10
Figure 04 : Processus de malaxage des olives	11
Figure 05 : Extraction par centrifugation.	12
Figure 06 : L'huile à la sortie du séparateur centrifuge.	13
Figure 07 : Image au Microscope électronique à balayage de gouttelettes de l'huile d'olive.	13
Figure 08 : schéma général de production de l'huile d'olive.	14
Figure 09 : production mondiale de l'huile d'olive 2009/2010.....	17
Figure 10 : L'évolution de production d'olive en milliers de tonnes	18
Figure 11 : Immunodiffusion radiale simple de Mancini.	31
Figure 12 : Effet des polyphénols sur les molécules d'adhésion endothéliales	33
Figure 13 : mécanisme d'action des AINS	36
Figure 14 : Rats wistar.....	41
Figure 15 : Tourteaux agglomérés de l'aliment destinés aux rats	42
Figure 16 : répartition des animaux et protocole experimental	42
Figure 17 : Répartition des rats mâles et femelles et protocole expérimental.....	44
Figure 18 : injection intra-péritonéale de l'huile d'olive vierge extra.....	45
Figure 19 Prélèvement sanguin de l'aorte abdominale:	46
Figure 20 : Analyse des acides gras de l'huile d'olive vierge extra par CPG.....	51
Figure 21 : Diamètres (mm) des précipités immuns chez les lots de rats mâles et femelles immunisés respectivement par l'OVA et l'OVA + HOVE (P<0,01 ; n=6 ; Ecart types x10)	54
Figure 22 : Nombre de globules blancs chez les rats mâles Les valeurs représentent les moyennes ± écart-types.....	57
Figure 23 : Nombre de globules blancs chez les rats femelles : Les valeurs représentent les moyennes ± écart-types (P<0,01).....	58
Figure 24 : Variations de la CRP chez les rats femelles : Les valeurs représentent les moyennes ± écart-types.....	59
Figure 25 : Variations de la CRPr chez les rats mâles :Les valeurs représentent les moyennes ± écart-types.....	60
Figure 26 : Variations de fibrinogène chez les rats femelles :Les valeurs représentent les moyennes ± écart-types.....	63
Figure 27 : Variations de fibrinogène chez les rats mâles : Les valeurs représentent les moyennes ± écart-types.....	64

Liste des tableaux

Tableau 01 Composition de l'huile d'olive (Organisme officiel de l'oléiculture française, 2015):.....	15
Tableau 02 : résultats des analyses organoleptiques de l'huile d'olive.....	50
Tableau 03 : Composition en acides gras de l'huile d'olive.....	50
Tableau 04 : résultats des analyses physico-chimiques de l'échantillon d'huile d'olive	52
Tableau 05 : Optimisation de la méthode d'immunodiffusion radiale inversée.....	53

Liste des abréviations

Ac :	Anticorps
ACF :	Adjuvant complet de Freund
ADA :	Association des Diabétiques Américains.
AF :	Adjuvant de Freund
Ag :	Antigène
Ag-Ac :	Antigène-Anticorps
AGIS :	Acide gras insaturé
AGMI :	Acide gras monoinsaturés
AGPI :	Acide gras polyinsaturés
AGS :	Acide gras saturé
AIF :	Adjuvant incomplet de Freund
AINS:	Anti inflammatoire non stéroïdien
Anti-OVA :	Anticorps anti-Ovalbumine
ASND:	Antisérum non dilué.
CAQUE :	Centre Algérien de contrôle de qualité et d'emballage
CCA :	Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA)
CE :	Commission Européenne
CNUCED :	Conférence des Nations Unies sur le Commerce Et le Développement.
COI :	Conseil Oléicole International
COX :	Cyclooxygénase
CRP :	C-reactive –protéine humaine
CRPr:	C-reactive –protéine rat
ETA :	Acide eicosatriénoïque
HDL :	Height Density Lipoproteins
HER-2:	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HOVE :	Huile d'olive vierge extra.
ICAM-1:	Molécules d'adhérence intercellulaire 1
IgG :	Immunoglobulines G.
INAO :	Institut national de l'origine et de la qualité
IPA :	Institut Pasteur d'Algérie.
IR :	Indice de réfraction
ISO:	Organisation internationale de normalisation
LDL :	Low-density lipoproteins
LEF:	lot experimental femelle
LEM:	lot experimental male
LTB4 :	Leukotriene B4
LTF:	lot témoin femelle
LTM:	lot témoin male
mmHg :	Millimètre de mercure
FNS:	Formule numéraire sanguine
NK :	Natural killer
OMS :	Organisation mondiale de santé
OVA :	Ovalbumine
PBS :	Phosphate buffer saline
PGE2, PGI2:	Prostaglandines
PRL:	Prolactine
TNF- α :	Facteur de nécrose tumorale
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor-alpha
VCAM-1 :	molécules d'adhésion cellulaires vasculaire-1

**Publication internationale*

Publication dans le journal : South Asian Journal

Vol. 5, Issue 5, Page 179-186 South Asian J Exp Biol; 5 (5): 179-186; 2015



Physicochemical and organoleptic characterization and evaluating immunomodulatory effect in Wistar rats of extra virgin olive oil from northeastern of Algeria

Communication rationale et internationale

Communication orale :

*le premier congre international de la société Algérienne de la nutrition SAN (05-06 décembre 2012) Oran (hôtel Sheraton).

Caractérisation physicochimique et organoleptique de l'huile d'olive vierge extra de la région de Sidi Bel Abbés. Effet immunomodulateur chez les rats Wistar .

Communications affichées :

*2nd African congress on biology and health (November 2012 Setif Algeria)

Physicochemical and organoleptic characterization and evaluating immunomodulatory effect in Wistar rats of extra virgin olive oil from northeastern of Algeria

*Le premier séminaire national Biologie et Santé SNBS... "LMMPS", le 14 décembre 2015.

Caractérisation physicochimique et organoleptique de l'huile d'olive vierge extra de la région de Sidi Bel Abbès. Effet immunomodulateur chez les rats Wistar.

Sommaire

Remerciements

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

Partie bibliographique

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I : L'olivier

I-1-Historique	5
I-2-Classification botanique de l'olivier	5
I-3-Caractéristiques de l'olivier	5

Chapitre II : L'huile d'olive

II-1-Historique.....	8
II-2-Production de l'huile d'olive	8
II-2-1-Processus fondamentaux de la production de l'huile d'olive	8
II-2-2 -Phases du process de fabrication.....	9
II-2-3-Opérations préliminaires.....	9
II-2-3-1-Tri	10
II-2-3-2-Lavage	10
II-2-3-3-Broyage	11
II-2-3-4-Malaxage	11
II-2-3-5-1-Extraction par centrifugation	12
II-2-3-6-Séparation de l'huile et de l'eau	12
II-2-3-7-Traitements ultérieurs.....	13
II-3- Composition de l'huile d'olive.....	14
II-3-1- Fraction saponifiable	14
II-3-2-Fraction insaponifiable	15
II-4-La production mondiale de l'huile d'olive compagne 2014/2015	16
II-5-La production Algérienne de l'huile d'olive.....	18

Chapitre III : l' Huile d'olive et santé

III-1 Huile d'olive et maladies cardio-vasculaires.....	19
III-2 l'huile d'olive la tension artérielle	20
III.3 Huile d'olive et diabète sucré.....	20
III.4 Huile d'olive et appareil digestif.....	21
III.4.1 Huile d'olive dans l'estomac.....	22
III.4.2 Huile d'olive et pancréas.....	22
III.4.3 Huile d'olive et foie.....	22
III.4.4 Huile d'olive et intestin.....	22
III.5 L'huile d'olive et la grossesse.....	22

III.6 L'huile d'olive et l'allaitement.....	22
III.7 L'huile d'olive et la croissance des enfants	23
III.8 Les bienfaits de l'huile d'olive sur le système nerveux	23
III.9 L'huile d'olive et la dépression	23
III.10 Effet de l'huile d'olive sur le vieillissement	23
III.11 Les bienfaits de l'huile d'olive sur la peau, l'inflammation des muscles et des tendons.....	24
III.12 Prévention du cancer par la consommation de l'huile d'olive	24
III.13 L'huile d'olive et le cancer du sein	24
III.14 L'huile d'olive et SIDA.....	25
Chapitre IV : L'huile d'olive et le système immunitaire.....	26
IV.1 Le système immunitaire et l'inflammation	26
IV.1.1 Inflammation aiguë	26
IV.1.2 Processus inflammatoire	26
IV.3 L'immunomodulation	27
IV.3.1 L'effet de l'huile d'olive sur le système immunitaire.....	27
IV.3.2 Effet immunomodulateur de l'huile d'olive extra vierge.....	28
IV.4 L'huile d'olive et la polyarthrite rhumatoïde.....	28
Chapitre V : Immunisation et obtention d'anticorps polyclonaux.....	29
V.1 Obtention d'anticorps polyclonaux	29
V.1.1 Choix de l'animal	29
V.1.2 Immunisation.....	29
V.1.3 Utilisation des adjuvants immunologiques.....	29
V.1.3.1 Adjuvants de Freund	30
V.2 Dosage par Immunodiffusion radiale simple en gel: technique de Mancini.....	30
VI : Les polyphénols de l'huile d'olive	32
VI.1 Nature des composés polyphénoliques de l'huile d'olive.....	32
VI.2 Effet anti-inflammatoire des polyphénols de l'huile d'olive vierge extra	33
VI.3 Marqueurs biologiques de l'inflammation	34
VI.3.1. La protéine-C-réactive(CRP)	34
VI.3.2. La numération-formule sanguine (NFS)	34
VI.3.3 Le fibrinogène	35
VI.3.4 Inflammation par la carragénine	35
VII. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	35
VII.1Mecanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	36
Partie expérimentale	
II. Matériels et méthodes	
II.1 Matériel d'étude et caractérisation physicochimique et organoleptique.....	37
II.1.2 Analyses organoleptiques.....	37
II.1.3 Analyses physicochimiques.....	37
II.1.3.1 Indice de réfraction (IR).....	38
II.1.3.2 L'acidité libre.....	38
II.1.3.3 L'indice de peroxyde	38
II.1.3.5 Dosage des polyphénols de l'huile d'olive vierge extra.....	38
II.1.4 Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras.....	39
II.1.4.1 Caractéristiques de l'appareil CPG.....	39
II.1.4.2 Principe de la CPG.....	40
II.1.4.3 Préparation d'esters méthyliques.....	40

II.1.4.4 Méthode de calcul.....	40
II.2 Evaluation de l'effet immunomodulateur de l'HOVE.....	41
II.2.1 Animaux et conditions d'élevage.....	41
II.2.2 Répartition des animaux.....	42
II.2.3 Immunisation des animaux.....	42
II.2.4 Prélèvement et obtention de l'immunosérum.....	43
II.2.5 Recherche des anticorps anti-ovalbumine.....	43
II.2.6 Principe de la technique.....	43
II.2.7 Optimisation de la méthode d'immunodiffusion radiale inversée.....	43
II.3 Analyse statistique.....	44
II.4 L'étude de l'effet anti inflammatoire de l'huile d'olive vierge extra.....	44
II.4.1 Répartition des animaux.....	44
II.4.2 Antigène inflammatoire.....	45
II.4.3 Voie d'injection.....	45
II.4.4 Prélèvement sanguin.....	46
II.4.5 Dosage des paramètres de l'inflammation.....	46
II.4.5.1 Hémogramme (dénombrement leucocytaire).....	46
II.4.5.3 Dosage de la Protéine C-réactive (CRP).....	47
II.4.5.4 Méthode de dosage de la CRP.....	47
II.4.5.5 Dosage de fibrinogène.....	48
II.4.6 Analyse statistique.....	49
III. Résultats et Discussion.....	50
III.1 Analyse organoleptique.....	50
III.2 Composition en acides gras par CPG.....	50
III.3 Analyses des paramètres physico-chimiques.....	51
III.4 Immunomodulation par l'HOVE chez les rats Wistar.....	53
III.4.1 Observation générale sur les rats de l'expérimentation.....	53
III.4.2 Optimisation et évaluation du taux des immunoglobulines IgG anti OVA par la technique d'immunodiffusion radiale inversée.....	53
III.5 Effet anti inflammatoire d'huile d'olive vierge extra.....	56
III.5.1 Dénombrement des globules blancs.....	56
III. 5. 2 la protéine C réactive.....	58
II.5.3 le fibrinogène.....	62

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Introduction

En Afrique du nord, la culture de l'olivier existait déjà avant l'arrivée des Romains. S'il est toujours l'apanage des pays méditerranéens, l'olivier est également cultivé de nos jours en sud Algérie, Australie, Japon, dans certaines régions de la Chine ([Ryan et Robards, 1998](#)) et en Argentine ([COI, 2010](#)).

L'Algérie comme de nombreux pays du sud et de l'est de la Méditerranée ont eu peu d'initiatives pratiques en matière de produits de qualité, si l'on exclut les quelques tentatives de valorisation de quelques produits d'appellation d'origine (vins). Les nouvelles conditions économiques (réformes structurelles, plans de développement de l'agriculture et du monde rural...) et les nouvelles perspectives d'ouverture des marchés ont cependant amené les pouvoirs publics et quelques opérateurs privés à reconsidérer la place de quelques produits de terroir algérien et à essayer de les valoriser en vue de les faire mieux connaître (tels les vins d'appellations d'origine de sept régions du centre et de l'ouest algériens, l'huile d'olive de la région montagneuse de Kabylie, les dattes de qualité des oasis et quelques autres fruits ayant déjà une réputation locale, nationale, voire même internationale comme les abricots, les pommes, les oranges, les olives de table...) ([Sahli, 2009](#)).

L'olivier occupe aujourd'hui une superficie de 200 000 ha en Algérie, soit à peine 2,3% de la superficie agricole utile totale, avec près de 43% de l'assiette arboricole nationale. Les oliviers sont plantés soit en masse, soit en isolés (13 955 070 oliviers en masse et 3 571 110 oliviers isolés). Le centre-nord du pays est une région potentielle : 90% du verger est détenu par les wilayate de Béjaïa, Tizi-Ouzou, Bouira (zones de production de Béjaïa, Bouira, Tizi-ouzou et Boumerdes (55 %) ([Sahli, 2009](#)).

Au 12 janvier 2015, la production totale atteignait 1,416 million de quintaux d'olives qui se répartissent de la façon suivante : 1,129 million de quintaux d'olives de table et 289 786 quintaux d'olives à huile qui devraient donner une production d'huile d'olive de 14406 tonnes (156586 hectolitres).

L'Algérie avait produit 4,7 millions de quintaux d'olives et 59 037 tonnes d'huile d'olive, hissant le pays à la 5^{ème} place mondiale, derrière respectivement l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie ([Ministère de l'agriculture et de développement, 2015](#))

La maturation de l'olive est un lent et long processus qui dure plusieurs mois et varie selon la latitude, la variété, la disponibilité en eau, la température et les pratiques culturales. Par conséquent, le degré de maturité est un facteur de qualité important. D'un point de vue

scientifique, il est difficile de mesurer et d'exprimer en terme mathématique la contribution de chaque facteur à la qualité globale de l'huile extraite. Selon [Montedoro et al, 1986](#), le stade de maturité contribue à 30 % à la qualité de l'huile. D'autres facteurs contribuent aux pourcentages suivants : système d'extraction (30 %) ; transport et conditions de stockage (15 %) ; récolte (5 %) ; divers (20 %).

L'huile d'olive est obtenue par trituration des péricarpes des fruits et pas de leurs graines, dans un moulin à huile spécifique. La teneur en huile varie en fonction du terroir, de la variété (cultivar), du stade de maturité à la récolte et des pratiques agronomiques locales. Durant ces dernières années, ce processus général de trituration des olives a connu des développements technologiques qui tendent vers la mécanisation complète du processus, l'augmentation de la capacité de travail et la spécialisation du processus d'extraction dans le souci de réduire les coûts, mais aussi d'améliorer la qualité de l'huile ([Ben Sassi et al, 2006](#)).

L'huile d'olive extra vierge est l'huile obtenue du fruit de l'olivier uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions, thermiques notamment, qui n'entraînent pas d'altération de l'huile, et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration. L'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 1 gramme pour 100 grammes. L'huile d'olive vierge est l'huile obtenue du fruit de l'olivier uniquement par des procédés et traitements identiques à l'huile d'olive extra vierge, mais dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 2 grammes pour 100 grammes. L'huile d'olive raffinée est l'huile d'olive obtenue des huiles d'olive vierges par des techniques de raffinage qui n'entraînent pas de modifications de la structure glycéridique initiale ([Huang et al, 2008](#)).

L'huile d'Olive Vierge Extra est une huile d'olive de grande qualité et sans doute la plus saine des matières grasses. Un processus de pression ou centrifugation, à basse température, extrait le jus d'olives d'excellente qualité immédiatement après la récolte. La teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique doit être de 0,8% ou inférieure afin d'obtenir la classification de «Vierge Extra». C'est pourquoi ses qualités odorantes et sapides en font une Huile d'Olive Gourmet, très agréable pour la cuisine, un ingrédient excellent et inégalable pour une alimentation saine ou un plan de perte de poids, car elle inhibe l'accumulation de matière adipeuse dans la zone abdominale ([Benlemlih et Ghanam, 2012](#)).

Une alimentation riche en acides gras monoinsaturés semble réduire le risque de maladies cardiaques et peut également aider à réguler les taux de sucre et d'insuline dans le

sang. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent également qu'une alimentation riche en acides gras monoinsaturés est liée à la réduction du risque de maladie coronarienne. Ce qui est particulièrement significatif, étant donné que l'huile d'olive vierge extra est extrêmement riche en acides gras monoinsaturés, en particulier en acide oléique ([Bermudez et al, 2011](#)).

Il existe des données cliniques en grand nombre qui démontrent l'effet causal/bénéfique de l'huile d'olive vierge extra sur la santé cardiaque, tels que les effets favorables sur le contrôle du cholestérol et l'oxydation des Lipoprotéines de Faible Densité (LDL, connu comme le «mauvais cholestérol») et les effets anti-inflammatoires, antithrombotiques, antihypertenseurs, et vasodilatateurs, tant chez l'homme que chez l'animal. En outre, l'huile d'olive vierge extra prévient les maladies cardiaques en augmentant les niveaux des Lipoprotéines de Haute Densité (HDL), le «bon cholestérol» ([Covas et al, 2006](#)).

Un autre bénéfice de l'huile d'olive vierge extra semble reposer sur sa capacité à déplacer les acides gras oméga-6, sans aucun effet sur les acides gras oméga-3. Ainsi, l'huile d'olive vierge extra contribue à provoquer un équilibre plus sain entre les acides gras oméga-6 et les acides gras oméga-3. À l'inverse des graisses saturées, l'huile d'olive vierge extra réduit les valeurs totales du cholestérol et les lipoprotéines de faible densité dans le sang. Elle est reconnue également pour faire baisser le taux de sucre dans le sang et la pression artérielle. Elle contient des antioxydants tels la vitamine E et des caroténoïdes, et l'oleuropéine, un produit chimique qui peut aider à prévenir l'oxydation des particules des lipoprotéines de basse densité ([Benlemlih et Ghanam, 2012](#)).

L'Huile d'Olive Vierge Extra contient une variété d'antioxydants qu'on ne retrouve pas dans d'autres huiles, principalement les phénols naturels ayant des propriétés antioxydantes puissantes. Ces composés, esters de tyrosol et hydroxytyrosol, y compris l'oléocanthal et l'oleuropéine, donnent à l'Huile d'Olive Vierge Extra, sans aucun traitement chimique, son goût amer et piquant. L'Huile d'Olive Vierge Extra est la source de pas moins de 30 composés phénoliques. Il existe de nombreux bénéfices médicaux attribués à sa composition phénolique. L'hydroxytyrosol est un composé phénolique de l'Huile d'Olive Vierge Extra, le principal composé antioxydant des olives et qui joue un rôle significatif dans les nombreux bénéfices attribués à l'huile d'olive extra. Une fraction d'huile d'olive vierge extra contenant de l'hydroxytyrosol peut empêcher l'agrégation plaquettaire et la formation d'eicosanoïdes (thromboxane B2) in vitro ([Petroni et al, 1995](#)).

Les composés phénoliques semblent contribuer à la prévention des maladies causées par les radicaux libres, y compris le cancer, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les maladies cardiaques (Papadopoulos et Boskou, 1991 ; Hamdi et Castellon, 2005).

Les scientifiques ont découvert que l'Huile d'Olive Vierge Extra qui vient d'être pressée contient une forte concentration d'oléocanthal. Ce dernier composé produit un puissant effet anti-inflammatoire avec des effets similaires à ceux de l'ibuprophène, un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien commun. D'autres encore suggèrent que la consommation à long terme de petites quantités de ce composé de l'huile d'olive vierge extra, peut-être en partie, un facteur de diminution de l'incidence des maladies cardiaques associées à la Diète Méditerranéenne (Lucas *et al*, 2011).

Actuellement, les réglementations et les institutions se mettent peu à peu en place et une dynamique nouvelle est en train de s'opérer en faveur de la promotion des produits de qualité spécifique comme l'huile d'olive vierge extra, notamment en prévision de l'ouverture des marchés. Cependant il est nécessaire pour promouvoir les ressources et les produits de notre pays que les acteurs locaux notamment les opérateurs des filières de produits de terroir soient non seulement soutenus, mais appuyés pour organiser et coordonner leurs actions.

En vue de valoriser les produits locaux le présent travail, consiste à caractériser une huile d'olive produite dans la région de Sidi Bel-Abbés par l'huilerie CHIALI sur le plan physicochimique et sensoriel. Une analyse chromatographique en phase gazeuse est effectuée pour mettre la lumière sur le profil en acides gras de ce produit.

L'effet immunomodulateur de cette huile est mis en évidence chez des rats Wistar selon un protocole d'immunisation et une technique d'immunodiffusion radiale inversée.

L'effet anti-inflammatoire est aussi mis en évidence chez ces animaux selon un protocole utilisant la carragénine et déterminant quelques paramètres de l'inflammation aigue.

Chapitre I : L'olivier

I.1 Historique

L'olivier appartient aux espèces "*Olea Europaea*", est originaire de la région de la Syrie moderne et de l'Iran. Cependant, les Grecs furent les premiers à cultiver les olives à grande échelle. C'est entre le septième et troisième siècle av J-C, que des philosophes, physiciens et historiens ont entrepris sa classification botanique et ont dévoilé propriétés curatives de l'huile d'olive (Dioscorides, Diocles) et son histoire (Anaxagoras, Empedocles), pendant qu'Aristote positionna la culture de l'olive comme une science (Pelikan, 2005).

L'olive était même protégée par la législation. La première loi de protection juridique fut introduite par Solon (639-559 av J-C). Il était interdit de couper plus de deux oliviers par an, dans chaque oliveraie. Dans la Grèce antique, l'olivier était symbole de force, paix, victoire et fertilité ; l'olivier et son huile étaient alors les rois des jeux olympiques (les vainqueurs se voyaient offrir non seulement une couronne en rameau d'olivier mais aussi des jarres remplies d'huile d'olive) et leur prestige ne cessera de grandir au fur et à mesure de leur expansion L'amour et l'estime des producteurs pour l'olivier se passent de génération en génération et de famille en famille (Pagnol et Rey-Billeton, 2002).

I.2 Classification botanique de l'olivier

L'encyclopédie mondiale des arbres (Russel et Culter, 2008) classe la famille des *Oléacées* dans les *ligustrales*, ordre appartenant au *Phyllum des terebinthales* (classification phylogénétique).

Parmi les 25 genres de cette famille nous trouvons à côté de l'olivier (*Olea*), des plantes ornementales comme les lilas (*Syringa*), Forsythia et troènes (*Ligustrum*) mais aussi les frênes (*Fraxinus*) et le *Phillyrea*. Le genre *Olea*, serait lui-même composé de 30 espèces différentes réparties sur les cinq continents : Afrique, Asie, Amérique, Europe, Océanie (D'Aygalliers, 2010).

L'olivier adore la mer, le soleil et donc les zones côtières où il est assuré des conditions climatiques d'un écosystème approprié à sa croissance. Il a besoin d'un climat méditerranéen doux, le long des côtes de préférence, sur des îles ou sur le continent (Rozier, 2010).

I.3 Caractéristiques de l'olivier

On dit que l'olivier est immortel. Il peut vivre jusqu'à 1000 ans et, si à cet âge canonique on le coupe, il produira immédiatement un rejet qui vivra lui aussi des centaines d'années (figure 01). De 1 à 7 ans, ce sera un juvénile qui ne produira pas d'olive. De 7 à 35

ans, il commencera à produire tout en poursuivant sa croissance. De 35 à 150 ans, il est en pleine maturité et sa production sera très abondante. Au delà de 150 ans, son tronc commencera à se creuser, il perdra une partie de son écorce et sa production déclinera (COI, 2015).



Figure 01 : Olivier sur l'île grecque d'Ithaque, réputé pour être âgé de plus de 1500 ans (COI, 2011).

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen, c'est à dire qu'il supporte parfaitement des sécheresses prolongées mais craint les froids trop vifs et l'humidité stagnante. Il a besoin d'un ensoleillement prolongé et les fortes chaleurs de l'été ne lui font pas peur. Néanmoins, un hiver marqué lui est nécessaire pour induire la production de fleurs et donc d'olives (Lambert ,1993).

On dit que l'olivier se plait dans des terrains pauvres où aucune autre production ne serait rentable. C'est en partie vrai mais il produira d'autant plus que le sol sera riche et recevra un minimum de 220 mm d'eau par an. Toutefois, un sol non filtrant et gorgé d'eau en permanence lui sera fatal. Il est très accommodant quant au type de sol. Acide ou alcalin, tous lui conviennent avec toutefois une préférence pour un sol légèrement calcaire.

C'est un arbre au feuillage persistant donc toujours vert. Persistant ne veut pas dire que ses feuilles sont immortelles. Elles vivent en moyenne trois ans puis jaunissent et tombent, principalement en été. Elles sont disposées de façon symétrique sur le rameau. Elles sont d'un vert foncé et luisant sur la face supérieure et d'un vert argenté sur la face interne.

Ses fleurs comprennent : une corolle, deux étamines, un calice à quatre pétales, un ovaire de forme arrondie qui porte un style assez épais et terminé par un stigmate. Il contient deux ovules. Les fleurs sont regroupées sur une petite grappe qui en compte de 10 à 20 et qui pousse au début du printemps à l'aisselle des feuilles sur les rameaux âgés de deux ans. La plupart des oliviers sont auto-fertiles, c'est à dire que son propre pollen peut féconder ses propres ovaires. C'est particulièrement le cas du *Cailletier* où la fécondation se fait principalement par le vent et ne dure qu'une petite semaine par an. C'est pourquoi, les années où il pleut trop abondamment durant cette période ou le temps est brumeux, ne comptez pas trop sur une récolte abondante (Bruneton, 1999)

Les bonnes années, à peine 5 à 10% des fleurs (figure 02) produiront des fruits mais, étant donné leur nombre, c'est largement suffisant pour une bonne production (Polese, 2005).



Figure 02 : Fleurs d'olivier en période de floraison (Polese, 2010).

Toutes ces fleurs fécondées donnent en principe une olive. Ce fruit est une drupe, c'est à dire un fruit à noyau. Il y a, parmi les amateurs d'olives qui n'ont jamais vu un olivier, une croyance très commune que nous allons essayer de corriger une bonne fois pour toute:

Il n'existe pas de race d'olive verte. Toutes les olives deviennent noires en mûrissant (Polese, 2010).

Chapitre II : L'huile d'olive

II.1 Historique

L'huile d'olive est le produit méditerranéen par excellence. On la retrouve à travers l'histoire, depuis la civilisation grecque jusqu'à nos jours. Elle est la principale source de matières grasses du régime crétois ou du régime méditerranéen qui sont bien connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (COI, 2015).

Si la production de l'huile d'olive est actuellement en plein essor, celle-ci n'est pas un produit du XXI^e siècle. En effet des fossiles de fragments d'olivier datant du XII^e millénaire avant Jésus Christ ont été retrouvés autour de la Méditerranée (COI, 2015). L'olivier et l'huile d'olive font partie intégrante de l'histoire du bassin méditerranéen et on les retrouve au fil des siècles à travers différents mythes et croyances. C'est notamment le cas dans la mythologie grecque où Athéna devint protectrice d'Athènes au dépens de Poséidon après avoir offert à la ville d'Athènes un présent bien plus utile que le cheval de Poséidon : un olivier. Le bois d'olivier servira ensuite pour les gravures de divinités grecques et sera le bois utilisé pour la fabrication de la massue d'Hercule. Les premiers vainqueurs des jeux olympiques se voyaient remettre des rameaux d'olivier et des jarres d'huile d'olive en récompense de leurs performances.

II.2 Production de l'huile d'olive

Selon le COI, 2015 l'huile d'olive est une huile obtenue à partir du fruit de l'olivier, à l'exclusion des huiles obtenues par extraction avec des solvants, par des procédures de réestérification, ou par n'importe quel mélange avec d'autres types d'huiles. A la différence des autres huiles végétales ou d'autres produits tels que le vin, l'huile d'olive ne requiert aucune étape de raffinage ni aucune transformation chimique. Grâce à cette simplicité procédurale, l'huile d'olive a pu être fabriquée depuis l'antiquité. La technique a subi de nombreuses évolutions au cours du temps qui peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les évolutions relatives au broyage des olives et les évolutions relatives à la séparation des différentes phases (COI, 2015).

II.2.1 Processus fondamentaux de la production de l'huile d'olive

Les installations modernes à cycle continu sont basées sur l'automatisation des phases avec un système de contrôle centralisé des paramètres. Les installations de ce type nécessitent au maximum deux opérateurs

L'huile d'olive proprement dite est contenue dans les lipovacuoles des cellules du mésocarpe (pulpe). Le processus prévoit donc l'extraction de la phase liquide des cellules, la

séparation des fractions solides et la séparation de la fraction lipidique de la fraction aqueuse. L'huile d'olive « vierge » se distingue nettement des autres types d'huiles par deux caractéristiques : la matière première, constituée par la pulpe des olives, la méthode d'extraction, faite de processus de nature exclusivement mécanique. L'extraction de l'huile vierge fait appel exclusivement au choc, à la pression, à la centrifugation, à la décantation, à la filtration, à la tension superficielle et au traitement mécanique des émulsions. Le recours au chauffage est admis, à des températures modérément élevées, afin d'augmenter le rendement en huile (Beauchemin, 2011).

II.2.2 Phases du process de fabrication

Les lignes de production par extraction mécanique diffèrent par les méthodes employées dans les différentes phases, il existe donc autant de types d'installations différentes. Outre leurs caractéristiques techniques, les installations se différencient de manière marquée par la capacité de production, le niveau de mécanisation, l'organisation du travail, le rendement qualitatif et quantitatif, les coûts de production. En général, toutes les installations comportent la succession de quatre phases fondamentales :

- a) opérations préliminaires : elles ont pour objet de préparer les olives à la suite du travail ;
- b) broyage: il a pour objet de briser les parois des cellules et d'en faire sortir les sucs. Le produit de cette phase est généralement appelé pâte ;
- c) extraction du moût d'huile : elle a pour objet de séparer la phase liquide, l'émulsion eau-huile, de la phase solide, les grignons. Ceux-ci sont composés des résidus solides des peaux, de la pulpe, des graines et des fragments des noyaux (grignons). L'émulsion eau-huile est généralement appelée moût d'huile ou parfois jus d'olives. En réalité, le moût contient aussi un résidu solide, le « dépôt », qui reste en suspension dans l'émulsion ;
- d) séparation de l'huile et de l'eau : elle a pour objet de séparer les deux composants du moût d'huile. Au cours de ce processus on sépare les deux phases liquides non miscibles et une grande partie des dépôts. On dénomme la phase aqueuse résiduelle les margines (pas d'utilisation au singulier) (COI, 2010).

II.2.3 Opérations préliminaires

Avant l'extraction proprement dite, les olives doivent être préparées, c'est l'objet des opérations préliminaires. Il s'agit d'opérations prenant place entre la récolte et le broyage réalisé initialement par le moulin à huile (figure 03).



A

B

C

Figure 03 : Diagramme de traitement des olives (A : Tri au crible statique ; B Lavage en laveuse ; C : Olives prêtes pour le pressurage) (COI 2010).

II.2.3.1 Tri

Il consiste en un nettoyage des olives pour les séparer de la terre, des petits rameaux et des feuilles. Cette opération peut se faire directement lors de récolte, sur le champ, ou bien, pour de petites quantités récoltées à la main, sur le sol dans un local de l'exploitation, avant la livraison; ou encore au moment de la livraison aux moulins coopératifs. Le tri de quantités plus importantes s'effectue à l'aide de cribles statiques ou vibrants. Autrefois, certains laissaient une petite quantité de feuilles dans le but de donner à l'huile un arôme plus fruité.

II.2.3.2 Lavage

Il se fait par immersion des olives dans un bac d'eau ou, dans les installations modernes, dans des laveuses ad-hoc qui maintiennent l'eau en mouvement forcé pour améliorer le résultat de l'opération. Pour obtenir une huile de qualité, il est important dans cette phase que l'eau utilisée soit propre en la renouvelant fréquemment. Au terme de l'opération, les olives subissent un égouttage.

La qualité du produit final dépend des opérations finales, de l'état de conservation des olives et des délais. La conservation en tas importants, avec une aération insuffisante de la masse des olives et des délais de l'ordre de plusieurs jours, provoquent l'apparition de phénomènes de fermentation des olives qui modifient très rapidement les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'huile, et entraînent une élévation de température. Le phénomène s'accroît dans le cas d'olives ayant subi des chocs lors de la récolte ou des attaques par la mouche de l'olivier. Les orientations actuelles sont les suivantes:

- Entreposage des olives en milieu frais et suffisamment ventilé, en couches peu épaisses;
- Réduction des délais à trois heures au maximum à partir de la livraison.

II.2.3.3 Broyage

Le broyage constitue la première phase de l'extraction proprement dite. Les olives sont soumises à des actions mécaniques qui provoquent la rupture des parois cellulaires et des membranes entraînant la libération des sucs cellulaires et de l'huile. Cette action résulte du frottement des fragments de noyaux sur la pulpe, ou des chocs des dispositifs mécaniques en rotation à grande vitesse dans la masse de la pulpe. Le produit obtenu à l'issue de cette phase, dans la plupart des installations, est une pâte, la pâte d'huile, masse semi-fluide composée d'une fraction solide (fragments de noyaux, peaux et pulpe) et d'une fraction liquide (émulsion d'eau et d'huile) (Caputo *et al*, 2003).

II.2.3.4 Malaxage

C'est une opération qui suit le broyage ou le pressurage et a pour but de rompre l'émulsion entre l'eau et l'huile et faire agglomérer les particules d'huile en gouttes plus grosses, se séparant spontanément de l'eau de végétation (figure 04).



Figure 04 : Processus de malaxage des olives. A : Installation de bacs de malaxage en parallèle ; B : Pâte d'huile en mélange à l'intérieur d'un malaxeur (COI, 2015).

Elle s'effectue dans un malaxeur, un bac en acier dans lequel des pales hélicoïdales en rotation maintiennent un lent mouvement de mélange de la pâte. L'action de malaxage rompt l'émulsion en améliorant ensuite le rendement en moût d'huile en vue de la phase suivante de l'extraction. Cette phase a une grande importance pour déterminer le compromis convenable entre rendement quantitatif en huile et qualité: le réchauffage augmente l'efficacité du malaxage en permettant l'augmentation du rendement en huile, il influence toutefois défavorablement la qualité de l'huile au-delà d'une certaine température:

- Dégradation du goût (goût de réchauffé);
- Perte de substances volatiles et en conséquence du fruité;
- Intensification de l'oxydation;
- Moindre qualité diététique à cause des pertes en polyphénols, tocophérols et vitamine A.

L'efficacité du malaxage dépend en outre de la méthode utilisée pour le broyage. L'utilisation de meules crée un faible degré d'émulsion et par conséquent le malaxage à froid est suffisant pour obtenir un bon rendement en huile. Le broyage, sous l'effet de la grande vitesse de rotation des marteaux, crée en revanche une émulsion plus stable qui nécessite un réchauffage modéré de la pâte jusqu'à 28-29 °C pour obtenir un rendement acceptable.

II.2.3.5 Extraction de l'huile par centrifugation

Elle consiste en la séparation du moût d'huile et des grignons, fraction solide constituée par les fragments de noyau, des peaux et morceaux de pulpe. L'extraction est réalisée par divers systèmes qui font appel à des principes mécaniques de conception différente (Benlemlih et Ghanan, 2012).

La pâte d'huile est soumise à une centrifugation dans un tambour conique tournant sur un axe horizontal (décanteur). La centrifugation se fait à une vitesse de rotation d'environ 3400 tours par minute. Sous l'effet des différences de poids spécifique, la centrifugation sépare deux ou trois phases (figure 05).

- les grignons ;
- le moût d'huile, contenant une petite quantité d'eau ;
- les margines, contenant une petite quantité d'huile.

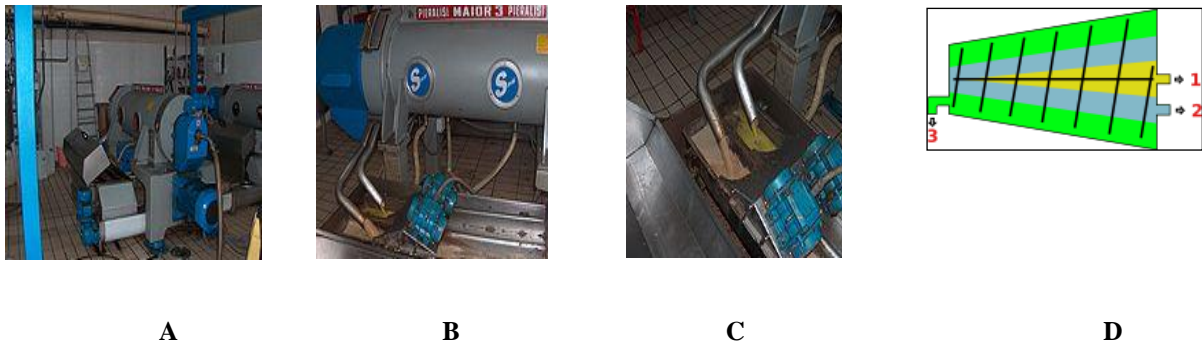


Figure 05 : Extraction par centrifugation. A : Centrifugeuse horizontale à décanteur ; B : Décanteur en fonctionnement ; C : Phases liquides séparées par le décanteur ; D : Schéma d'une centrifugeuse horizontale (1 = huile, 2 = margines, 3 = grignons) (COI, 2010).

II.2.3.6 Séparation de l'huile et de l'eau

Le moût d'huile obtenu par l'extraction contient toujours une quantité résiduelle d'eau qui est ensuite éliminée par l'effet de la différence de densité entre les deux liquides par la décantation ou la centrifugation (figure 06).



Figure 06 : L'huile à la sortie du séparateur centrifuge (COI, 2015).

II.2.3.7 Traitements ultérieurs

À la sortie du séparateur centrifuge, l'huile est un produit prêt à la consommation. Telle quelle, cette huile contient encore des résidus solides en suspension (mucilages et graisses) et présente un aspect trouble.

À l'état de repos, le résidu solide se dépose sur le fond du récipient et l'huile se clarifie spontanément. Par conséquent, dès sa sortie du séparateur, l'huile est conservée dans des cuves en inox, sous une atmosphère d'azote pour prévenir l'oxydation et pour favoriser la sédimentation spontanée de l'huile.

L'huile destinée à une commercialisation immédiate est en revanche soumise à une filtration à l'aide de filtres en cellulose de type barese ou filtres-presses avant la mise en bouteilles (Organisme officiel de l'oléiculture française, 2015).

L'examen de l'huile d'olive à l'aide de microscope électronique à balayage illustre la disposition des gouttelettes de l'huile d'olive (figure 07).

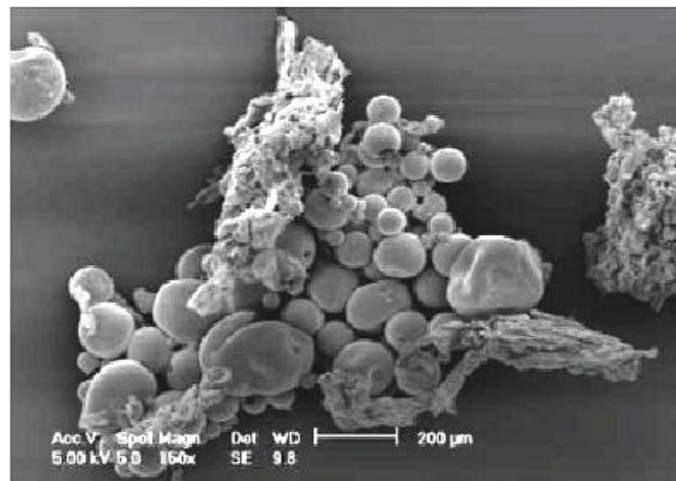


figure 07 :Image au MEB de gouttelettes de l'huile d'olive (CNUCED, 2009).

Le processus de production de l'huile d'olive avec ses différents étapes sont résumés dans la (figure 08).

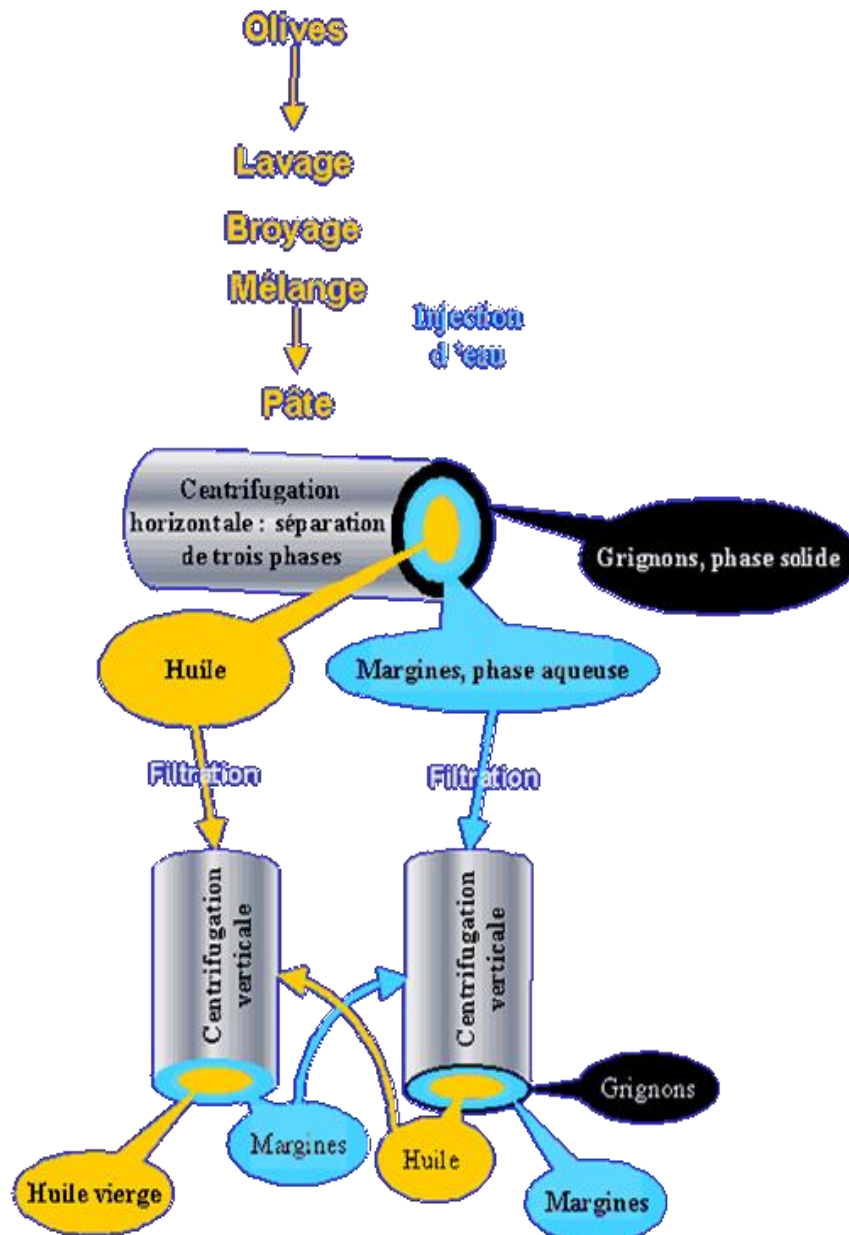


Figure 08 : Schéma général de production de l'huile d'olive (CNUCED, 2009).

II.3 Composition de l'huile d'olive

II.3.1 Fraction saponifiable

L'huile d'olive est constituée de 98-99% par un mélange de triglycérides ce sont principalement des acides gras mono-insaturés et en moindre proportion saturés, estérifiés avec un alcool (tableau 01). Les polyglcérides et les monoglycérides représentent respectivement 2-3 % et 0,1-0,25 % (COI, 2015).

En effet, le principal acide gras mono-insaturé de l'huile d'olive est l'acide oléique. Celle-ci contient de 55 à 83% en distingue des autres huiles. La concentration de cet acide varie selon les races d'olivier. Par exemple, il est le plus faible chez les salonenques (moyenne 66,3%) et plus élevé chez les tanches (moyenne 78,6%). L'huile d'olive contient en outre 3,5 à 21% d'acides gras polyinsaturés dont principalement l'acide linoléique, sans négliger les acides gras saturés dont l'acide stéarique et l'acide palmitique avec une teneur moyenne de 10 à 16 %. Donc, la présence de double liaisons donne à cette huile une certaine fluidité on baisse son point de fusion : toutefois, elle la rend plus sensible à l'oxydation.

Tableau 01 : Composition de l'huile d'olive (Organisme officiel de l'oléiculture française, 2015).

Lipides	99% (900 calories pour 100 g)
Vitamine E	150 mg/kg
Provitamine A (Carotène)	de 3 à 30 mg
Acides gras saturés	8 à 24%
Acides gras insaturés	75.5 à 90.5 %
Acide oléique	56 à 83 %
Acide linoléique	3.5 à 20 %

Il faut environ 5 à 6 kg d'olives pour obtenir 1 litre d'huile. Selon les variétés d'olivier et les conditions climatiques.

II.3.2 Fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable admise dans les huiles d'olives diffère en fonction de la dénomination de celles-ci. Cette fraction comporte :

➤ **Les hydrocarbures** : responsables de la couleur bleue spécifique aux huiles d'olives notamment le squalène ($C_{30}H_{50}$) qui peut représenter entre 32 à 50% de la totalité de l'insaponifiable (COI, 2015).

➤ **Les alcools aliphatiques** : (alcools se trouvant en petite quantité dans les huiles vierges) (COI, 2015).

➤ **Les tocophérols** : qui sont des dérivés du Chromane. Le plus actif biologiquement d'entre eux c'est l' α -tocopherol assimilé à la vitamine E mais du point de vue activité anti-oxydante, le β - tocopherol est le plus actif et protège même les huiles des vieillissements (Charles et Guy, 2008).

➤ **Les polyphénols** : l'huile d'olive est riche en polyphénols totaux (50 à 500 ppm) exprimés en acide caféique. La majorité de ces polyphénols sont solubles dans l'eau et

passent dans les margines. La fraction restante notamment dans l'huile d'olive vierge préserve leur bonne qualité et les rend stable à l'oxydation. (Manchado et Cheynier, 2006).

➤ **Les vitamines :** de 50 à 150 mg par kilo d'huile. Les principales sont les vitamines E, K, D et A.

➤ **Les alcools :** l'huile d'olive contient de nombreux alcools (Stérols, méthylstérols, alcools triterpéniques, alcools aliphatiques, etc.) mais en très petites quantités.

➤ **Des pigments :** qui lui donnent sa belle couleur jaune ou verte. Ce sont principalement la chlorophylle pour la couleur verte et le carotène pour la couleur jaune. Leur proportion dépend beaucoup de la maturité des olives (Charles et Guy, 2008).

➤ **Les arômes :** Ces composés sont responsables de la saveur de l'huile, globalement ils représentent 250 à 300 ppm. Le profil des composés aromatiques d'une huile d'olive dépend de sa qualité. Ainsi une huile d'olive fraîche de bonne qualité a un profil de composés issus principalement des voies de biosynthèse normales. Par contre une huile d'olive de moindre qualité aurait un profil plus complexe qui renferme aussi des composés volatiles responsables du goût défectueux. Les principaux défauts de l'huile d'olive sont évalués par les arômes : moisi, humide vineux, rance et métallique. La raison principale de l'apparition du goût défectueux est la formation de composés volatiles produits par une surmaturation du fruit, une oxydation des acides gras insaturés, suite à une attaque bactérienne ou un stockage prolongé des olives avant l'extraction de l'huile. Les composants mineurs de nature glycéridique : La glycérine est présente dans les triglycérides mais aussi dans d'autres structures qui sont les produits soit des réactions d'hydrolyse enzymatiques dans le fruit, ou bien de la réaction de biosynthèse incomplètes. Ce sont les mono et les diglycérides. Ces derniers représentent la fraction la plus importante. (COI, 2010).

II.4 Production mondiale d'huile d'olive campagne 2014/2015

Aujourd'hui plus d'un milliard d'oliviers (*O. europaea L.*) sont cultivés à travers le monde et cela sur presque tous les continents. Plus de 90% des oliviers sont cultivés dans le bassin méditerranéen, notamment en Espagne, en Italie et en Grèce. Il existe plus de cent variétés d'oliviers, cultivées. Les olives peuvent avoir deux grandes utilisations : la première est l'utilisation en tant que fruit entier ou encore appelée "olives de table", la seconde est pour la production d'huile d'olive. La production mondiale d'olives de table est d'environ un million de tonnes soit 10 % de la récolte totale d'olives. La grande majorité des olives est donc utilisée pour la fabrication de l'huile d'olive.

Après une forte augmentation au cours des années 1990, la production mondiale d'olive reste relativement stable depuis le début des années 2000 avec une production

annuelle située entre 2,4 et 3,2 millions de tonnes (COI, 2009). Les variations observées d'une année à une autre sont dues à la fois aux conditions climatiques et au fait que les olives ne grandissent que sur des bois de 2 ans (récolte bisannuelle). La production mondiale est grandement influencée par celles de l'Espagne et de l'Italie qui représentent à eux seuls près des 2/3 de la production mondiale (COI, 2009) (Figure 09).

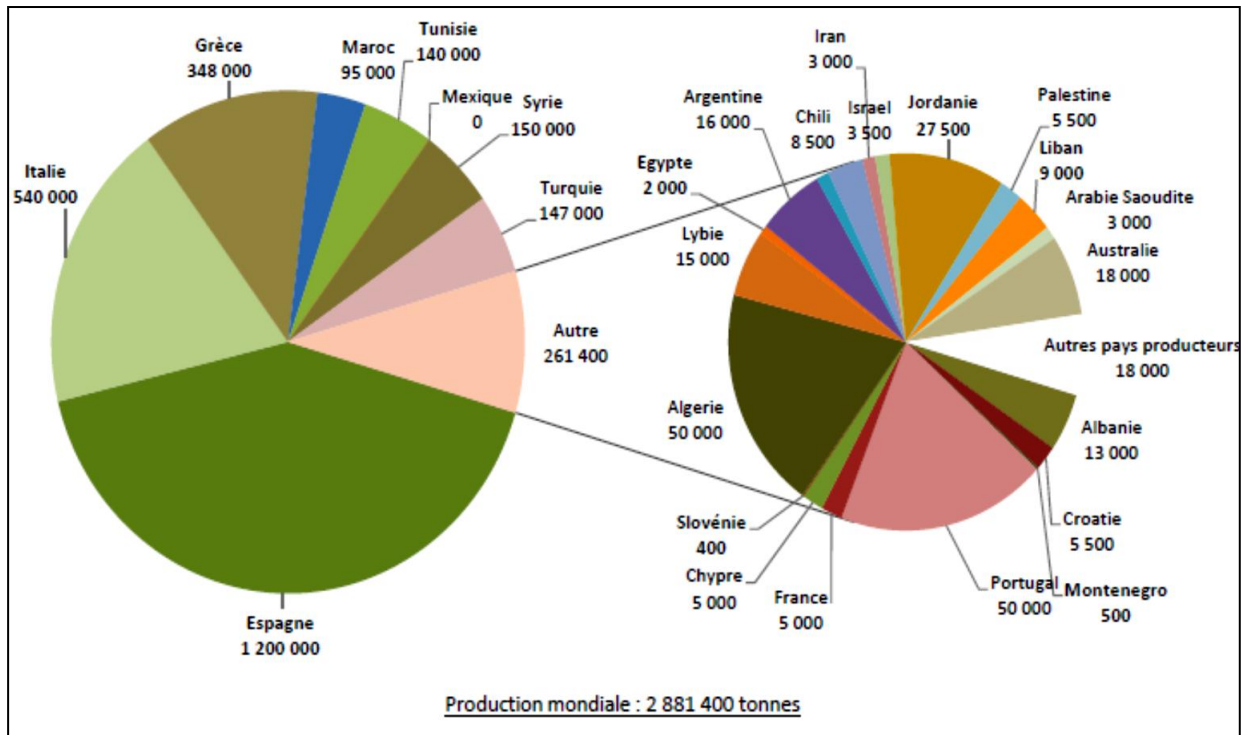


Figure 09 : Production mondiale de l'huile d'olive 2009/2010 (en tonnes) (COI 2010).

L'Espagne la Grèce et l'Italie, apparaissent une nouvelle fois en première ligne de classement, en ce qui concerne la production d'olive (figure10).

Pour la campagne 2013/2014, il est estimé que les exportations mondiales atteindraient 754 500 t. Plus de 72 % de ces exportations mondiales partiront de l'Union européenne, principalement d'Espagne et d'Italie. Les autres pays membres du COI participeront à 23 % des exportations, soit 176 000 tonnes, avec à leur tête la Tunisie (en fort recul), suivie de la Turquie, de la Syrie, de l'Argentine et du Maroc (COI, 2014).

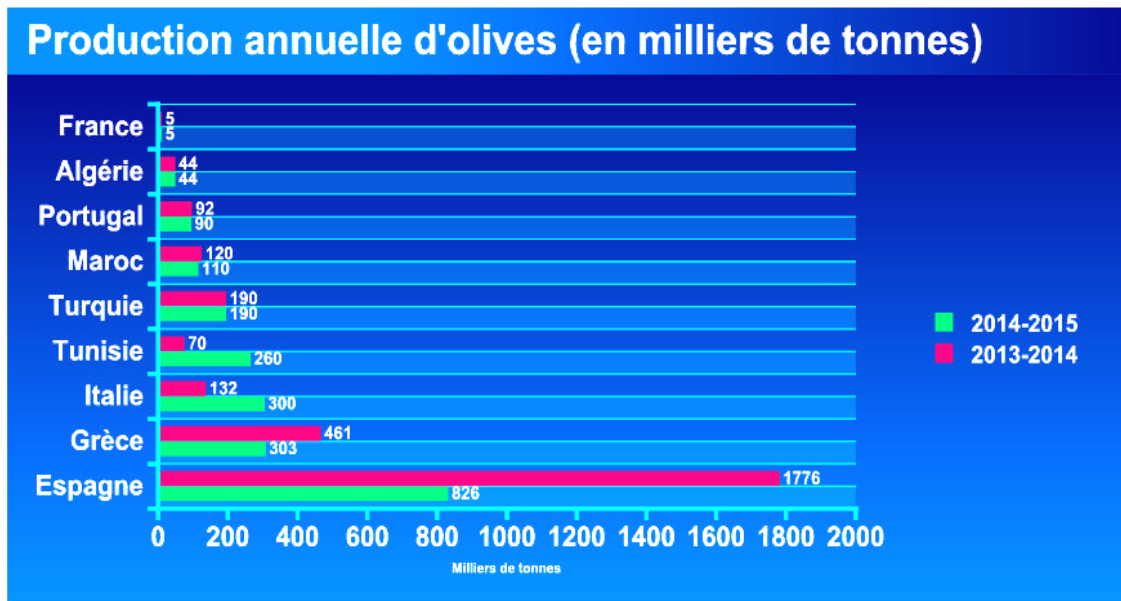


Figure 10 : L'évolution de production d'olive en milliers de tonnes (COI 2015).

II.5 La production Algérienne de l'huile d'olive

La production oléicole de la campagne 2014/2015 chutera dans des proportions très importantes, comparée à la campagne 2008/2009. Au 12 janvier 2015, la production totale de l'actuelle campagne atteignait en effet 1,416 million de quintaux d'olives qui se répartissent de la façon suivante : 1,129 million de quintaux d'olives de table et 289 786 quintaux d'olives à huile qui devraient donner une production d'huile d'olive de 14406 tonnes (156586 hectolitres).

Les responsables du ministère de l'Agriculture et les professionnels du secteur considèrent même qu'il s'agit là d'une bonne récolte pour l'olive de table, et d'une moins bonne récolte pour l'olive à huile.

L'Algérie avait produit 4,7 millions de quintaux d'olives et 59 037 tonnes d'huile d'olive, hissant le pays à la 5^{ème} place mondiale, derrière respectivement l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie.

Ce bon classement découlait d'un bond de la production oléicole par rapport à la campagne 2007/2008 où l'Algérie avait produit 2,51 millions de quintaux d'olives et 24 754 tonnes d'huile d'olive (1,6 million de quintaux d'olives à huile et 910 321 quintaux d'olives de table).

Des chiffres qui ne seront même pas égalés cette année et qui feront régresser l'Algérie à la 7^{ème} place des producteurs d'huile d'olive ([Ministère de l'agriculture et de développement, 2015](#)).

Chapitre III : Huile d'olive et santé

Bien que l'huile d'olive ait été un ingrédient de base dans l'alimentation méditerranéenne pendant des milliers d'années, ce n'est que récemment que les vertus médicinales de l'huile d'olive sont vraiment reconnues ([Weil, 2005](#)).

III.1 Huile d'olive et maladies cardio-vasculaires

La mortalité par infarctus la plus faible s'observe dans les pays qui sont les plus gros consommateurs d'huile d'olive, Grèce, Italie du Sud, Yougoslavie, avec un record en Crète où la consommation de cette huile est 30% plus importante que dans les autres pays méditerranéens. En revanche, l'augmentation des décès cardiaques enregistrée ces dernières années en Grèce, en Espagne et en Yougoslavie, tient à la diminution de la consommation d'huile d'olive au profit de celle de graisses animales saturées et d'huiles de graines (arachide, maïs, tournesol).

Cet effet protecteur de l'huile d'olive est attribué à sa composition particulière en acides gras, avec un taux équilibré entre acides gras saturés et insaturés et une teneur importante en acide oléique mono-insaturé qui possède la propriété d'élever le bon cholestérol HDL et de prévenir la dangereuse oxydation des LDL ([Mensink et al, 2003](#)). D'autre part, à la différence des huiles de graines, l'huile d'olive est un pur jus de fruit, très riche en polyphénols, qui protègent nos cellules de l'oxydation. ([Alonso et al, 2006](#)).

Une kyrielle d'études ont établi de manière certaine que :

- L'huile d'olive est la seule graisse qui agit de manière positive sur les quatre facteurs de risque de la maladie cardio-vasculaire : un cholestérol total élevé, un cholestérol HDL (bon cholestérol) diminué, une oxydation du mauvais cholestérol LDL par les radicaux libres, une agrégation plaquettaire élevée (cause de thrombose) ([Fernandez, 2002](#)).
- Seule l'huile d'olive vierge, non raffinée, possède cet effet antioxydant.
- L'huile d'olive conserve ses propriétés anti-oxydantes lorsqu'elle est cuisinée, jusqu'à 200° pendant 3 heures (elle ne s'oxyde pas à la friture), alors qu'on recommande de ne pas chauffer les huiles de graines (comme le tournesol ou le soja) au-delà de 160°.

Les chercheurs ont constaté que la consommation d'huile d'olive vierge chez 200 personnes recrutées entraîne une augmentation du «bon» cholestérol, le HDL. Cette hausse varie de 0,025 mmol/l pour l'huile à faible teneur en polyphénols, à 0,045 mmol/l pour celle à teneur élevée. De précédentes études avaient indiqué qu'une augmentation de 0,026 mmol/l se

traduisait par une réduction de 2% à 3% du risque de maladies cardiovasculaires. De plus, les chercheurs ont noté une réduction du stress oxydatif, un processus qui permet au «mauvais» cholestérol, le LDL, d'adhérer aux parois des artères. Cela peut conduire à l'athérosclérose qui compromet la circulation du sang (Liorente, 2009).

L'huile d'olive vierge est extraite du fruit selon des méthodes de pression à l'aide de presses ou de centrifugation à l'aide d'un décanteur centrifuge. D'après les chercheurs, elle est plus riche en polyphénols que l'huile d'olive raffinée. Le processus de fabrication industrielle de l'huile, en particulier le raffinage, détruirait presque en totalité les polyphénols présents naturellement dans l'olive (Tripoli *et al*, 2005).

III.2 Huile d'olive et tension artérielle

La communauté scientifique aurait démontré que l'introduction de l'huile d'olive dans le régime alimentaire entraînerait une diminution de la tension artérielle (Haroun, 2009). De nombreuses études ont été effectuées, comparant les effets des AGMI (acide oléique de l'huile d'olive) et des AGPI (omega3 des graisses de poissons) sur la pression artérielle. Les résultats de ces études ont montré des effets similaires sur les pressions systoliques et diastoliques pour les régimes enrichis en oméga-3 et les régimes enrichis en AGMI. Ainsi, le régime enrichi en AGMI entraînerait une diminution de la pression artérielle de 5 à 9% chez des sujets sains comme chez des sujets hypertendus.

Plusieurs études ont montré les effets bénéfiques sur la pression artérielle d'une supplémentation en huile d'olive (naturellement riche en AGMI). Ainsi Ruiz-Gutierrez *et al*, 2000 ont montré qu'un enrichissement du régime alimentaire en huile d'olive chez des sujets hypertendus pouvait diminuer la pression systolique de 7% et la pression diastolique de 10%. Une étude menée par Perona *et al* en 2004 effectuée chez des personnes âgées hypertendues a montré une réduction de la pression artérielle jusqu'au seuil de normalité (<140 mmHg) alors qu'un enrichissement en huile de tournesol a maintenu l'hypertension aux alentours de 150 mmHg (p<0.01) (Perona *et al*, 2004).

III.3 Huile d'olive et diabète sucré

Un régime alimentaire riche en huile d'olive ne constituerait pas seulement une bonne alternative au traitement du diabète sucré mais permettrait également de prévenir ou de retarder l'apparition de la maladie (Dupin *et Cuq*, 1992).

Des études scientifiques auraient démontré qu'un régime alimentaire riche en huile d'olive, pauvre en graisses saturées, modérément riche en hydrates de carbone et en fibres solubles provenant des fruits, des légumes verts, des légumes secs et des céréales, constituerait le choix alimentaire le plus efficace pour les sujets diabétiques. Plusieurs études

ont conclu que, non seulement le taux de sucre sanguin à jeun est moins élevé après un régime à l'huile d'olive qu'après un régime aux huiles de graines, mais aussi que le premier réduit le pic d'insuline après les repas. Chez des diabétiques, la consommation d'huile d'olive diminue le besoin d'injections d'insuline (Covas *et al*, 2009).

Le développement des diabètes insulino-dépendants (type 1) et diabète gras (type 2) ont pour facteurs de risques la prise de poids et l'obésité. Ces deux facteurs sont associés à une consommation trop riche en calories, avec notamment une surconsommation d'acides gras saturés (Qi et van Dam, 2006).

Une étude menée par Riccardi *et al*, 2004 a montré l'efficacité du remplacement des acides gras saturés par des acides gras mono-insaturés. Ainsi, les patients atteints d'un diabète de type 2 ont suivi un régime enrichi en AGMI composé de 50% de lipides dont 33% d'AGMI. Cette expérience a eu pour résultat une diminution de la demande en insuline, une diminution de la concentration plasmatique en glucose ainsi qu'une diminution de la concentration plasmatique en triglycérides. Cette étude a été confirmée par la suite avec d'autres expériences menées chez des sujets sains, diabétiques et/ou obèses. Ces dernières ont montré une amélioration du métabolisme glucidique chez les patients. Ces résultats expliquent pourquoi l'Association des Diabétiques Américains (ADA) recommande pour les personnes atteintes de diabète de type 2 (diabète gras), un apport de 60-70% de calories sous forme d'acides gras mono-insaturés et de glucides complexes. Il est mentionné que si les patients ont un problème de cholestérol ou de triglycérides les doses d'AGMI doivent être augmentées. L'huile d'olive, dont la composition en AGMI est très élevée (60-80%), semblerait adaptée à un régime enrichi en AGMI pour l'amélioration du métabolisme glucidique chez les patients atteints de diabète de type 2. De plus, l'ADA limite la consommation d'acides gras poly- insaturés (AGPI) à 10%, ce qui équivaut à la teneur de l'huile d'olive en ces acides gras (Campbell *et al*, 2003).

III.4 Huile d'olive et appareil digestif

D'abord, et c'est important pour la digestion, dans la bouche, l'huile d'olive améliore la saveur des aliments. Elle est la plus digeste puisqu'elle ne ralentit pas l'évacuation gastrique du repas, comme le font l'huile de tournesol ou le beurre. C'est le meilleur agent de la contraction de la vésicule biliaire, combattant la constipation par sa double action lubrifiante et d'accélération du péristaltisme. L'huile d'olive est bien tolérée par l'intestin et ne provoque de diarrhée ni chez le nouveau-né ni chez l'enfant ni chez l'adulte ni chez le vieillard (Charbonnier, 1996)

III.4.1 Huile d'olive dans l'estomac

Selon des études scientifiques, en consommant de l'huile d'olive, la sensation de satiété serait plus grande et la digestion et l'absorption des nutriments dans l'estomac seraient favorisées. C'est un bon complément nutritif pour les enfants, l'huile d'olive est un bon tonifiant qui lutte contre l'indigestion, la gastrite ou l'ulcère (Stark, 2004).

III.4.2 Huile d'olive et pancréas

En ce qui concerne le pancréas, l'huile d'olive permettrait de ne produire qu'une sécrétion réduite, ce qui le ferait peu « travailler », mais de manière efficace et suffisante pour mener à bien toutes ses fonctions digestives (COI, 2011).

III.4.3 Huile d'olive et foie

L'huile d'olive Favorise une évacuation douce, régulière et complète de la bile vésiculaire vers l'intestin. Elle met le foie au repos pendant la durée de son action sur la vésicule biliaire, et n'augmente pas les risques de calculs biliaires (Parmontier, 2008). L'huile d'olive est un antipoison, il augmente la capacité du foie à se débarrasser de ces substances dangereuses. L'huile d'olive est efficace pour traiter les malades souffrants de stéatose hépatique (foie gras) sans oublier qu'elle augmente le métabolisme hépatique (Andréawill, 1997).

III.4.4 Huile d'olive et intestin

L'huile d'olive est une matière grasse qui réunirait d'excellentes conditions de digestibilité et d'absorption, sans oublier sa légère action laxative qui contribuerait à combattre la constipation et l'halitose (mauvaise haleine) (OMS, 2009).

III.5 L'huile d'olive et la grossesse

L'huile d'olive jouerait un rôle fondamental pour le fœtus au cours de la période de gestation, du fait de sa teneur importante en acides gras essentiels. Les enfants de mères ayant consommé de l'huile d'olive au cours de leur grossesse auraient un meilleur développement postnatal, en ce qui concerne la taille, le poids, le comportement et l'acquisition de réflexes psychomoteurs (Alain, 2010).

III.6 L'huile d'olive et l'allaitement

La vitamine E qui est présente dans le sang de la femme enceinte se concentre au cours de l'accouchement dans la glande mammaire, ce qui permet à la mère de continuer à apporter cette vitamine à son bébé pendant l'allaitement. Le maintien des niveaux de cette vitamine au cours de l'allaitement est fondamental. Il est à noter que le contenu en vitamine E est généralement plus élevé dans les huiles de première pression à froid que dans les huiles raffinées. Antioxydant majeur, la vitamine E protège la membrane qui entoure les cellules du

corps, en particulier les globules rouges et les globules blancs (cellules du système immunitaire) (Haroun, 2009).

III.7 L'huile d'olive et la croissance des enfants

L'acide oléique est un constituant normal et abondant de l'os, et l'huile d'olive favorise la croissance osseuse des enfants et combat la déminéralisation osseuse des adultes. Il faut conseiller la prise régulière d'huile d'olive dans tous les cas où une déminéralisation osseuse existe ou est à craindre : fractures, ostéoporose, prévention des fractures du col du fémur, prévention de l'ostéoporose de la ménopause (Haroun, 2009).

III.8 Les bienfaits de l'huile d'olive sur le système nerveux

L'huile d'olive joue un rôle capital dans le développement du système nerveux central. Un apport en acide oléique est très important pour la grossesse et le développement du système nerveux du fœtus. Une étude récente a montré que l'oléocanthal, réduit l'agrégation du peptide bêta amyloïde et sa liaison à la surface des neurones, ralentissant du même coup le développement de la maladie d'Alzheimer (Daccache, 2011).

III.9 L'huile d'olive et la dépression

Witztum et Steinberg, 2001 montrent que le régime alimentaire méditerranéen a non seulement un effet positif dans la prévention des récives d'accidents coronariens mais également, pour la première fois, que l'huile d'olive a un effet positif sur la dépression. Ces résultats ont une grande importance en raison de la forte incidence de la dépression et du risque qu'elle représente dans la récive des maladies coronariennes.

III.10 Effet de l'huile d'olive sur le vieillissement

En protégeant contre les radicaux libres, une des explications des bienfaits du "Manger Crétois" est la grande richesse de cette alimentation méditerranéenne en antioxydants : l'huile d'olive crétoise, qui se compose surtout d'acides gras mono-insaturés, bien plus stables que les acides gras polyinsaturés, contient des polyphénols antioxydants qui ne sont pas détruits à la cuisson.

Une équipe de recherche de l'université d'Athènes dirigée par Athena Linus en 2003, a montré qu' une consommation régulière d'huile d'olive réduisait le risque du développement de l'arthrite rhumatoïde, grâce aux antioxydants. La vitamine E, présente en grande quantité dans l'huile d'olive, a un rôle positif pour déplacer les radicaux libres, molécules impliquées dans certaines maladies chroniques et dans le processus de vieillissement (Haroun, 2009).

III.11 Les bienfaits de l'huile d'olive sur la peau, l'inflammation des muscles et des tendons

Dans l'Antiquité, les Grecs utilisaient l'huile d'olive autant pour leur hygiène que pour leur cuisine. Au gymnase et sur les stades, les athlètes s'enduisaient le corps afin d'échauffer leurs muscles, de se protéger contre les brûlures du soleil. L'huile d'olive servait de base à la fabrication de parfums et de savons. L'huile d'olive entrainait dans la formule de baumes et d'onguents destinés à cicatriser les plaies, guérir les ulcères et soulager les inflammations (Haroun, 2009).

Selon les travaux de [Beauchamp, 2005](#) l'huile d'olive présente les mêmes vertus anti-inflammatoires que l'ibuprofène ou. En effet selon ces mêmes auteurs l'oléocanthal présent dans cette huile raison de 200 µg/ml possède une action anti-inflammatoire et analgésique.

En tenant compte du coefficient d'absorption (de l'ordre de 60 à 90%), on peut facilement déduire que la consommation de 50 ml ou 4 cuillères à soupe d'huile d'olive extra vierge exerce une action anti-inflammatoire équivalente de 10% de la dose d'ibuprofène recommandée pour soulager la douleur des adultes ([Bianco et al, 2006](#)).

III.12 Prévention du cancer par la consommation de l'huile d'olive

Des études épidémiologiques auraient montré que l'huile d'olive exercerait un effet protecteur face à certaines tumeurs malignes (sein, prostate, endomètre, tractus digestif, etc.) ([Owen, 2004](#)). L'huile d'olive faciliterait la consommation des légumes verts et des légumes secs dont les effets positifs dans la prévention du cancer ont été amplement démontrés ([Camargo et al, 2010](#) ; [Edwin N. Frankel , 2011](#)).

III.13 L'huile d'olive et le cancer du sein

Une étude menée en Grèce et aux Etats Unis montre que l'augmentation de la consommation d'huile d'olive est accompagnée d'une réduction de la fréquence du cancer du sein, surtout chez les femmes ménopausées ([Corona, 2006](#))

[Han et al, 2009](#) ont étudié l'effet anti-prolifératif et apoptotique de l'oleuropéine et d'hydroxytyrosol (200 µg/ml et 50 µg/ml respectivement) sur les cellules du cancer du sein, les résultats ont montré que ces deux produits: diminuent la viabilité en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses et inhibent leurs prolifération.

En laboratoire l'acide oléique contenu dans l'huile d'olive supprime l'activité d'un oncogène, l'HER-2/neu et accroît l'efficacité d'un médicament du cancer du sein l'herceptine. Selon les travaux du [Menendez et al, 2005](#) Northwestern University Feinberg School of Medicine à Chicago, paru dans *Annals of Oncology*, l'acide oléique contenu dans l'huile d'olive bloque l'action d'un oncogène, l' HER-2/neu, que l'on retrouve dans 30% des cancers

du sein et qui est associé avec des tumeurs hautement agressives avec un pronostic défavorable. Selon [Menendez, 2005](#) il pourrait être possible de retarder ou d'empêcher la résistance à l'herceptine chez des patientes atteintes de cancer du sein en incluant l'huile d'olive dans leur régime ([Gasull et al, 2000](#)).

III.14 L'huile d'olive et SIDA

A l'heure actuelle, 29 médicaments sont autorisés aux États-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement de l'infection VIH-1 ([Hammer, 2005](#)). Ces agents peuvent être classés selon leur mécanisme d'action en:

- (i) inhibiteurs de la reverse transcriptase (IRT),
- (ii) inhibiteurs de la protéase (IP),
- (iii) inhibiteurs de la fusion.

La combinaison des IRT et des IP, communément connue sous le nom du Traitement Antirétroviral Hautement Actif (HAART) ([Hammer, 2005](#)) a considérablement réduit la morbidité et la mortalité du malade, en transformant le VIH/SIDA à une simple maladie chronique. Bien que le HAART puisse ralentir la progression de la maladie, il ne guérit pas l'infection au VIH. Le traitement antiviral doit être maintenu à long terme ce qui conduit à l'apparition de graves toxicités chroniques et à la résistance aux médicaments. Ceci conduit les chercheurs à orienter leurs efforts vers l'exploration de nouvelles drogues efficaces et non toxiques. Dans ce cadre, [Lee-Huang et al 2003](#) ont rapporté que l'extrait de feuilles d'olivier est efficace contre le VIH-1. Il a été prouvé que l'efficacité de l'extrait des feuilles d'olives est due à la présence de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol. Ces deux composés, abondants dans l'huile d'olive riche en polyphénols, sont actifs au niveau de plusieurs étapes du cycle de vie du VIH-1. Ils inhibent la transmission du VIH-1 d'une cellule à l'autre et ralentissent considérablement la multiplication virale ([Lee-Huang et al, 2007](#)).

Chapitre IV : l'huile d'olive et le système immunitaire

IV.1 Le système immunitaire et l'inflammation

L'inflammation est une réaction de défense des tissus contre des agents le plus souvent exogènes, mais parfois endogènes (processus dégénératifs). L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire (Barton, 2008; Medzhitov, 2008). Une agression par des microorganismes ou une lésion tissulaire induit de nombreuses réponses initiées par le tissu lésé comme la libération de cytokines pro inflammatoires, permettant l'activation du système vasculaire et des cellules immunitaires. Ces réponses sont à leur tour associées à une production accrue de cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation qui diffusent dans les fluides extracellulaires et circulent dans le sang (Barton, 2008).

IV.1.1 Inflammation aiguë

C'est la réponse immédiate à un agent agresseur. Elle est de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses. Les inflammations aiguës peuvent guérir spontanément ou non, mais dans les deux cas, elles peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante.

IV.1.2 Processus inflammatoire

Le déroulement de la réaction inflammatoire comporte initialement une phase locale ou vasculaire immédiate mettant en jeu des phénomènes cellulaires, humoraux et vasculaires. Dans certains cas, après mise en jeu de ces phénomènes, il existe une phase générale ou cellulaire comportant des perturbations protéiques, hormonales et hématologiques. L'ensemble de ces phénomènes contribue à la phase terminale de réparation et de cicatrisation (Barton, 2008).

La phase vasculaire constitue la tétrade classique de Celsus (douleur, rougeur, chaleur et tuméfaction) qui correspond à l'installation de deux phénomènes, la congestion et l'œdème. Cette réaction vasculaire est immédiate; en quelques secondes apparaît la rougeur associée à la douleur qui est liée à la congestion. Il s'agit d'une modification du calibre vasculaire qui apparaît très rapidement, après une brève vasoconstriction, et consiste en une vasodilatation artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte. La congestion est déclenchée par un mécanisme nerveux et par l'action de médiateurs chimiques (Kantari, 2008).

L'œdème inflammatoire est dû au passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un exsudat fait d'eau et de protéines plasmatiques. Sa traduction clinique est un gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, contribue à la douleur, également produite par des médiateurs chimiques. Ainsi l'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques (Charles *et al*, 2010).

Un troisième phénomène de la phase vasculaire est la migration des leucocytes hors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel. Elle intéresse d'abord les polynucléaires, pendant les 6 à 24 premières heures, puis un peu plus tard en 24 à 48 heures les monocytes et les lymphocytes, c'est la diapédèse (Charles *et al*, 2010).

IV.3 L'immunomodulation

Le terme immunomodulation inclut une influence en sens positif (stimulation) ou négatif (dépression). L'OMS a fixé un certain nombre de conditions pour de telles préparations. Le système immunitaire non spécifique comprend surtout les phagocytes (granulocytes, macrophages, monocytes) et un nombre de facteurs solubles comme le système de complément et les cytokines. Ceux-ci sont également considérés comme des cibles des immunomodulateurs. Le système immunitaire non spécifique n'est pas spécifique pour un antigène donné et ne possède dès lors pas d'effet de mémoire. Il est impliqué dans les phénomènes de la première ligne de défense entrant en action après une infection. Par contre, la mise en œuvre du système spécifique requiert plusieurs jours pour atteindre un titre suffisamment élevé. C'est pourquoi il est particulièrement important d'administrer les immunomodulateurs dès les premiers signes d'infection. Plusieurs études récentes ont rapporté que l'huile d'olive vierge extra exerce un effet immunostimulant. L'administration d'émulsion de l'huile d'olive vierge extra exerce un effet bénéfique sur le système immunitaire et en particulier chez les sujets immunodéprimés (Puertollano, 2010).

IV.3.1 L'effet de l'huile d'olive sur le système immunitaire

La consommation d'huile d'olive permet de renforcer le système immunitaire face aux agressions externes causées par des micro-organismes comme les bactéries ou les virus (COI, 2010). Des études menées récemment dans ce domaine ont permis de démontrer que les acides gras présents dans l'huile d'olive constituaient de bons alliés dans la réduction de paramètres immunologiques aussi importants que la lymphoprolifération induite par des mitogènes spécifiques de cellules B et de cellules T. Le rôle de ces acides gras dans diverses fonctions immunologiques a été démontré. Ceux-ci participent en effet à la régulation des

processus inflammatoires chronique et peuvent être efficaces dans le traitement de certaines maladies auto-immunes et dans la régulation du système immunitaire en général (Puertollano, 2010).

IV.3.2 Effet immunomodulateur de l'huile d'olive extra vierge

L'huile d'olive extra vierge est sans conteste la source de matière grasse la plus bénéfique connue. Plusieurs études de laboratoires, cliniques et épidémiologiques internationales le démontrent. Toutefois, avant même que des recherches aient été réalisées, l'huile d'olive extra vierge a prouvé ses bienfaits dans la communauté de la Crête, qui l'a intégré au centre de ses habitudes alimentaires depuis des siècles.

L'apport quotidien recommandé d'huile d'olive vierge extra représente de 10 à 15% en acide gras. Par conséquent, si le corps humain a besoin de 2500 calories par jour, une consommation de 25 à 35 grammes d'olive quotidiennement suffira à ingérer la quantité d'acides gras recommandée (Poggi, 2011).

Les scientifiques ont aussi observé d'autres effets sur plusieurs fonctions immunitaires. Ainsi, les acides gras contribuent à régulariser le processus d'inflammation, et aident à combattre certaines maladies auto-immunes (Kolympari, 2010).

IV.4 L'huile d'olive et la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune inflammatoire chronique des articulations dont les causes sont méconnues. Les facteurs génétiques, les agents infectieux, les hormones et le régime alimentaire seraient quelques-uns des facteurs responsables de l'apparition de cette maladie. Jusqu'à une date récente, certains auteurs suggéraient que l'huile d'olive pouvait permettre d'atténuer les symptômes de cette maladie mais aucune recherche n'avait encore confirmé cet effet protecteur.

Les résultats d'une étude publiée récemment indiquent que la consommation régulière d'huile d'olive permet de diminuer les risques de polyarthrite rhumatoïde.

Selon les auteurs de cette étude, les sujets dont le régime alimentaire est riche en huile d'olive ont moins de risques de souffrir de cette maladie. Il a en effet été vérifié que les individus qui consommaient moins d'huile d'olive avaient 2,5 fois plus de possibilités de souffrir de polyarthrite rhumatoïde que ceux qui en consommaient plus fréquemment.

Le mécanisme d'action n'est pas encore clairement défini. Toutefois, ce sont probablement les substances antioxydantes qui jouent un rôle positif (Puertollano, 2010).

Chapitre V : Immunisation et obtention d'anticorps polyclonaux

V.1 Obtention d'anticorps polyclonaux

La production d'anticorps polyclonaux dirigés contre un antigène d'intérêt est une technique importante applicable dans de nombreux domaines de la recherche biologique. Pour l'obtention d'anticorps polyclonaux de qualité, un protocole doit être suivi en se basant sur les points suivants :

V.1.1 Choix de l'animal

L'utilisation d'animaux dans la production d'antisérum polyclonal n'est pas difficile, mais les soins et la manipulation des animaux exigent l'expérience et la patience ([Arbault et Daussant, 2005](#)).

V.1.2 Immunisation

L'immunisation est un phénomène de médiation par les cellules immunitaires (lymphocytes-B) et est normalement le résultat d'une diffusion hématogène de l'antigène. Le parcours d'introduction peut être très important pour déterminer dans quelle mesure l'individu répondra à un antigène. Une série de rappel d'immunisation peuvent être utilisées pour la production d'anticorps. Le choix de la méthode utilisée dépend de la nature de l'antigène et le type d'anticorps voulu ([Burns, 2005](#)).

D'une façon générale, le principe d'immunisation se base sur l'immunisation primaire, une période de latence permettant la réponse immunitaire primaire et la formation des cellules de mémoire, une ou plusieurs immunisations de rappel induisent une réponse secondaire. La collecte du sérum est effectuée 10 à 14 jours après le dernier rappel ([Arbault et Daussant, 2005](#)).

V.1.3 Utilisation des adjuvants immunologiques

Les adjuvants immunologiques améliorant la réponse immunitaire aux antigènes administrés. Ainsi, la production d'anticorps est plus faible si l'antigène est administré seul. Une variété de mécanismes permet à cet adjuvant d'induire l'amplification, y compris :

- La formation d'un dépôt d'immunogène aboutissant à la libération lente et à la présentation de l'antigène au système immunitaire dans une période prolongée de temps.
- L'optimisation de la stimulation immunitaire en se concentrant en immunostimulant et un antigène dans le microenvironnement même où ils peuvent interagir avec l'antigène présentant les cellules et les lymphocytes simultanément.
- L'activation non spécifique des cellules du système immunitaire facilitant ainsi les interactions qui favorisent la production d'anticorps ([Monier, 1979](#))

V.1.3.1 Adjuvants de Freund

Les adjuvants les plus largement reconnus et utilisés sont l'eau et les émulsions d'huile initialement développées par Freund. Ces émulsions sont générées en mélangeant une solution aqueuse d'antigène soluble avec un volume égal d'huile à travers un processus d'émulsification. Au cours de cette procédure, les antigènes contenant des gouttelettes d'eau sont emprisonnés dans l'huile en formant des particules dans une émulsion très visqueuse, Pour assurer une activité adjuvante, il est essentiel que ces émulsions épaisses restent stables et que les composants ne soient pas séparés après mélange. Lors de l'administration dans les tissus de l'hôte, ce mélange visqueux agit comme dépôt d'antigène (Monier, 1979).

V.2 Dosage par Immunodiffusion radiale simple en gel: technique de Mancini

Ces dosages ont été les premiers à être mis au point et leur élaboration est généralement très simple. Ils ont l'avantage de pouvoir être réalisés avec un matériel et des réactifs peu onéreux, mais leur sensibilité est relativement faible. Etant basés sur la précipitation des complexe antigène-anticorps. Ces derniers peuvent être formés dans une matrice d'agar ou d'agarose. Lorsque l'antigène et l'anticorps diffusent l'un vers l'autre dans l'agar ou l'agarose ou lorsque l'antigène est incorporé dans l'agar ou l'agarose, une ligne visible de précipitation se forme dans la région d'équivalence .Ces réactions d'immunodiffusion peuvent être utilisées pour déterminer les concentrations relatives des antigènes ou des anticorps (Paraf, 2001).

Dans cette technique de Mancini, on utilise un gel en plaque, tout comme dans la méthode d'Ouchterlony, mais le gel, cette fois, contient une solution d'anticorps à une concentration inférieure à celle du point d'équivalence. Les solutions d'antigènes sont déposées grâce à des pipettes au fond de puits espacés régulièrement. L'antigène diffuse dans le gel contenant l'anticorps en un gradient de concentration décroissant. La précipitation du complexe antigène- anticorps se manifeste sous forme d'un cercle qui s'agrandit jusqu'à ce qu'il n'y ait .Plus d'excès d'antigène (figure 11), généralement au bout de 24 à 48 heures. Le diamètre du cercle est directement proportionnel à la concentration d'antigène ajoutée au puits et peut être comparée avec les valeurs obtenues avec des dilutions standard de l'antigène. Cette technique sert couramment pour un dosage simple et rapide des solutions d'antigène lorsque l'on utilise des anticorps monospécifiques. Sa sensibilité peut être augmentée par coloration après lavage des gels pour éliminer les molécules n'ayant pas précipité (Mancini *et al*, 1965).

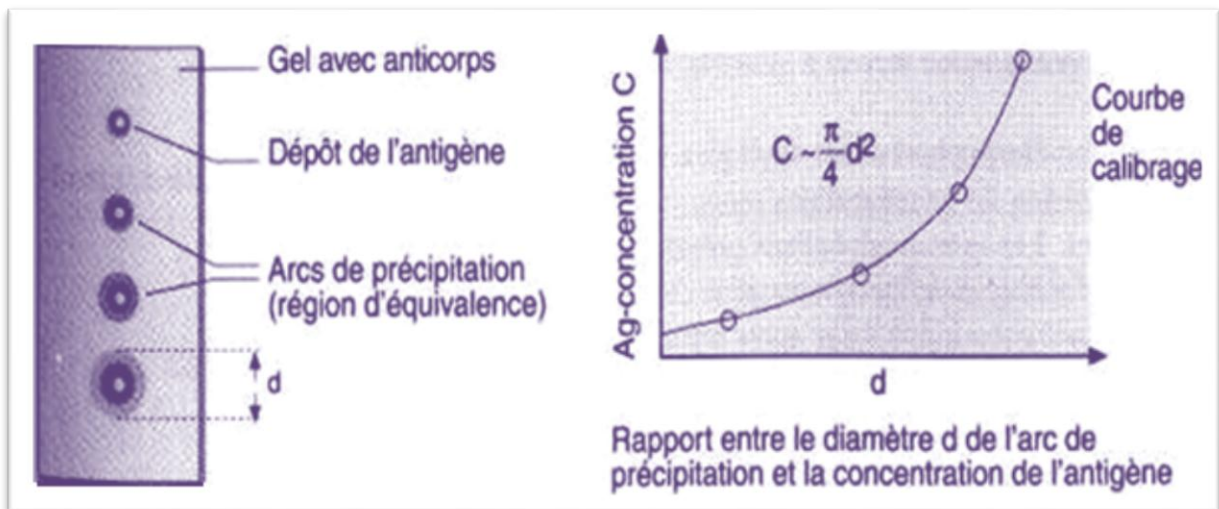


Figure 11 : Immunodiffusion radiale simple de Mancini (Mancini, 1969).

VI : Les polyphénols de l'huile d'olive

VI.1 Nature des composés polyphénoliques de l'huile d'olive

Le terme "polyphénols" est attribué à la fraction phénolique polaire de l'huile d'olive (un terme désuet dans les publications récentes). Ce terme est utilisé dans la littérature pour définir les substances qui possèdent un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyle, y compris leurs dérivés fonctionnels (Harborne, 1989).

Les composés phénoliques présents dans l'huile d'olive, extractibles par le mélange eau/méthanol, sont communément désignés comme bio-phénols (Carrasco, 2005). Le nombre de travaux qui s'intéressent à ces composés a augmenté de façon exponentielle au cours de ces 10 dernières années, pour diverses raisons : les composés phénoliques sont liés à la stabilité de l'huile, notamment, pour leurs propriétés biologiques. Actuellement, plusieurs composés phénoliques contenus dans l'huile d'olive, principalement l'hydroxytyrosol et ses dérivés, sont sujet de recherches approfondies dans le but d'établir une relation entre les apports alimentaires et le risque de plusieurs maladies telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires. La fraction phénolique de l'huile d'olive est constituée d'un mélange hétérogène de composés. Chacun affecte les propriétés chimiques et a une influence particulière sur la qualité de l'huile (Psomadiou *et al*, 2003).

Les monomères phénoliques de l'huile d'olive, qui regroupent les acides et les alcools phénoliques sont (en ordre alphabétique) : 4-acétoxy-éthyle-1, 2-dihydroxybenzène, 1-acétoxy-pinorosinol, apigénine, l'acide caféique, l'acide cinnamique (pas un phénol), acides o- et p-coumarique, acide férulique, l'acide gallique, l'acide homovanillique, acide p-hydroxybenzoïque, hydroxytyrosol, lutéoline, l'oleuropéine, pinorosinol, acide protocatéchique, l'acide sinapique, l'acide syringique, tyrosol, l'acide vanillique et la vanilline. La présence d'acide élénolique (pas un phénol) dans la même fraction a également été vérifiée à plusieurs reprises (Brenes *et al*, 2000 ; Morales et Tsimidou, 2002 ; Owen *et al*, 2000 ; Tripoli *et al*, 2005 ; Besançon *et al*, 2000). Le tyrosol, l'hydroxytyrosol et leurs dérivés sont les principaux représentants de la fraction monomérique. La partie la plus polaire de l'extrait méthanol/eau contient les phénols libres et les acides phénoliques. La partie la moins polaire contient l'oleuropéine aglycones (l'hydroxytyrosol estérifié à l'acide élénolique) et le ligstroside (tyrosol estérifié à l'acide élénolique), la lutéoline et l'apigénine (flavones), et aussi l'acide cinnamique et l'acide élénolique. Bianco *et al*, 2001 ont rapporté une nouvelle classe de phénols : hydroxyl-iso-chromanes. L'identification des deux composés de cette classe, 1-phényl-6, 7-dihydroxy-isochromane et 1 - (3-méthoxy-4-hydroxy) phényl-6, 7-dihydroxy-isochromane a été confirmée en comparant les spectres des polyphénols, isolés

de l'huile par extraction en phase solide, avec les spectres LC-MS des composés dérivant d'une réaction entre l'hydroxytyrosol et les aldéhydes aromatiques (Benzaldéhyde et vanilline). Une telle réaction se produit également dans la nature et l'acide oléique joue le rôle de catalyseur. L'hydroxytyrosol, présent dans les fruits de l'olivier, est dans sa forme glycosylée, mais principalement liée sous forme d'ester à la fraction aglycone de l'oleuropéine. Au cours de l'étape de malaxage, l'hydroxytyrosol est libéré sous l'action des glycosidases et des estérases. Ce processus hydrolytique, qui améliore également la quantité de composés carbonylés, favorise la formation de dérivés isochromane.

VI.2 Effet anti-inflammatoire des polyphénols de l'huile d'olive vierge extra

La réponse inflammatoire au cours de l'athérogénèse comprend l'adhésion des leucocytes, des monocytes et des lymphocytes à l'endothélium.

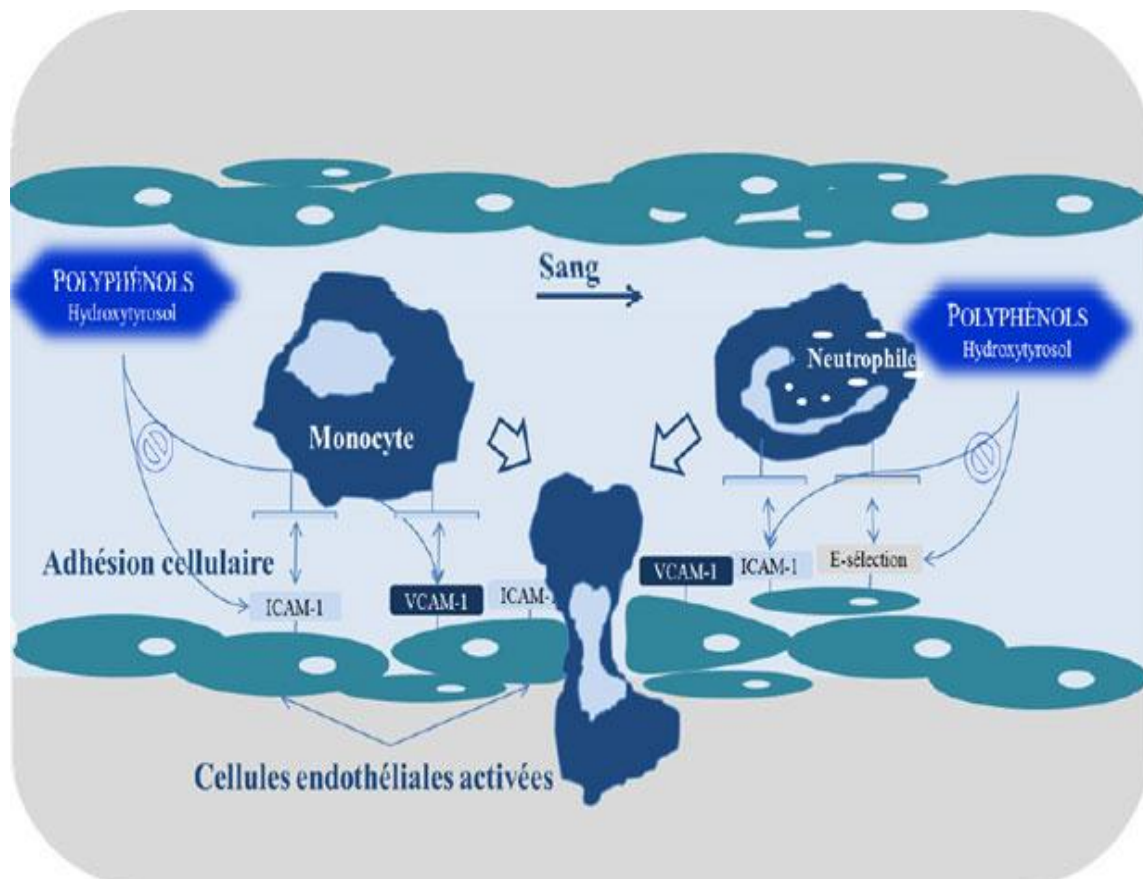


Figure 12 : Effet des polyphénols sur les molécules d'adhésion endothéliales. (Buil-Cosiales., 2008).

L'adhésion de ces cellules est facilitée par les molécules d'adhérence intercellulaire 1 (ICAM-1), les molécules d'adhésion cellulaires vasculaire-1 (VCAM-1) et le facteur E-sélection (Dell'Agli *et al*, 2006). Carluccio *et al*, 2003 ont rapporté que des doses physiologiquement pertinentes de composés phénoliques extraits de l'huile d'olive extra vierge réduisent l'expression des ICAM-1 et des VCAM-1 sur la surface des cellules. Un mélange de polyphénols de l'huile d'olive, y compris l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol a aussi provoqué une diminution du niveau des ARNm de VCAM-1, du facteur E-sélection et l'activité du promoteur du gène codant pour l'ICAM-1 (Carluccio *et al*, 2003). L'étude PREDIMED sur des sujets humains a constaté que le régime méditerranéen complété avec de l'huile d'olive entraîne une progression statistiquement significative de la réduction des marqueurs de l'inflammation dont la protéine C-réactive (synthétisée par le foie), l'interleukine-6, ICAM-1 et VCAM-1 par rapport à un régime faible en graisses (Estruch *et al* 2006).(figure12).

VI.3 Marqueurs biologiques de l'inflammation

L'inflammation possède généralement une traduction biologique. Certaines molécules plasmatiques connaissent une augmentation de leur taux plasmatiques d'au moins 25% par rapport à leur taux normal : ce sont les protéines de la phase aiguë de l'inflammation.

VI.3.1 La protéine-C-réactive (CRP)

La CRP (protéine-C-réactive) est une protéine de la réaction inflammatoire à cinétique rapide. C'est une protéine hépatique dont la synthèse est sous le contrôle de l'IL-6 et qui connaît des variations de concentration très importantes. La CRP se définit donc comme étant une protéine de l'inflammation, son taux peut être multiplié par 100 (voire 1000) dans les processus inflammatoires aigus. De plus grâce à sa demi-vie très courte, la CRP diminue rapidement dès que l'affection a disparu, pour retrouver son taux de base en 10 jours environ. La CRP permet une bonne cicatrisation tissulaire en assurant une clairance sensiblement accrue des débris cellulaires ou de divers corps étrangers. De plus, la CRP a un rôle opsonisant en se fixant sur la paroi des bactéries pour faciliter leur phagocytose en complétant l'action non spécifique de certaines fractions du complément, et l'action spécifique des immunoglobulines. Enfin, elle a un rôle immunomodulateur vis à vis des lymphocytes T (Volanakis,2001)

VI.3.2 La formule numéraire sanguine (FNS)

L'hémogramme est le résultat de l'étude quantitative et qualitative des éléments figurés du sang (globules rouges et blancs, plaquettes), mais il comprend également le taux d'hémoglobine et certaines valeurs calculées comme la VGM ou la TCMH. La formule de numération sanguine, ou NFS, est l'examen biologique qui permet de comptabiliser les

différents éléments figurés du sang. Cette analyse est indispensable pour évaluer une maladie inflammatoire ou infectieuse ou une anémie (Baijot, 2006).

VI.3.3 Le fibrinogène

Le fibrinogène est une protéine fabriquée par le foie qui, en cas d'activation de la coagulation, est transformée dans le sang en fibrine, principale protéine constitutive du caillot sanguin. Son dosage est utilisé dans l'exploration des processus inflammatoires et des troubles de la coagulation sanguine. Le taux de fibrinogène sanguin semble également être un marqueur de risque cardiovasculaire. Une augmentation du taux de fibrinogène sanguin traduit un état inflammatoire et pourrait refléter une augmentation du risque de maladie cardiovasculaire (infarctus du myocarde, angine de poitrine) d'un individu (Koenig, 2004).

VI.3.4 Inflammation par la carragénine

La carragénine ou carraghénane (ou carraghénine) est un polysaccharide (galactane) extrait d'algues rouges servant d'agent d'épaississement et de stabilisation dans l'industrie alimentaire. Il porte le code E407 de la classification des additifs alimentaires. Le carraghénane est surtout extrait du *Kappaphycus alvarezii* et du *Eucheuma denticulatum*. Le carraghénane est souvent utilisé par les scientifiques pour induire une inflammation tissulaire, afin de tester les médicaments anti-inflammatoires sur les animaux de laboratoire. Le carraghénane provoque l'inflammation des cellules épithéliales de l'intestin lors de la culture *in vitro* (Bhattacharyya, 2010). La consommation de carraghénane peut jouer un rôle dans l'inflammation intestinale. L'inflammation chronique de l'intestin est un précurseur de maladies plus sérieuses telles le cancer du colon (Borthakur, 2012).

VII. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sur le marché mondial. Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation (Nicolas *et al*, 2001). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc, jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères (Blain *et al*, 2000).

VII.1 Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens

Schématiquement les AINS agissent sur les modifications cellulaires et chimiques accompagnant la réaction inflammatoire. Ces réactions sont multiples et complexes. La réaction inflammatoire chronique implique des produits de la cascade l'acide arachidonique ainsi que des cytokines dont l'interleukine 1 qui fera intervenir le système immunitaire (prolifération de lymphocytes B ; stimulation des lymphocytes T et production de lymphokines). L'interleukine 1 (IL-1) et le Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α), sécrétés par les monocytes et les macrophages, sont les principales cytokines inflammatoires. Elles sont à l'origine de l'IL-8 des Macrophages qui attirent les neutrophiles et les mastocytes au foyer inflammatoire. Les migrations cellulaires, typiques de la réaction inflammatoire impliquent les MACs ou molécules d'adhésion cellulaire : les cadhérines, les intégrines, les sélectines et les immunoglobines dont l'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1). Leur expression est modulée par les cytokines. L'action commune et unanimement reconnue des AINS est d'inhiber l'une des deux enzymes de dégradation de l'acide arachidonique, la cyclooxygénase (Cox) ; il s'ensuit une diminution de la synthèse des PG : PGE1, PGE2, PGF alpha, PGF2 alpha (Menard *et al*, 1995) (figure13).

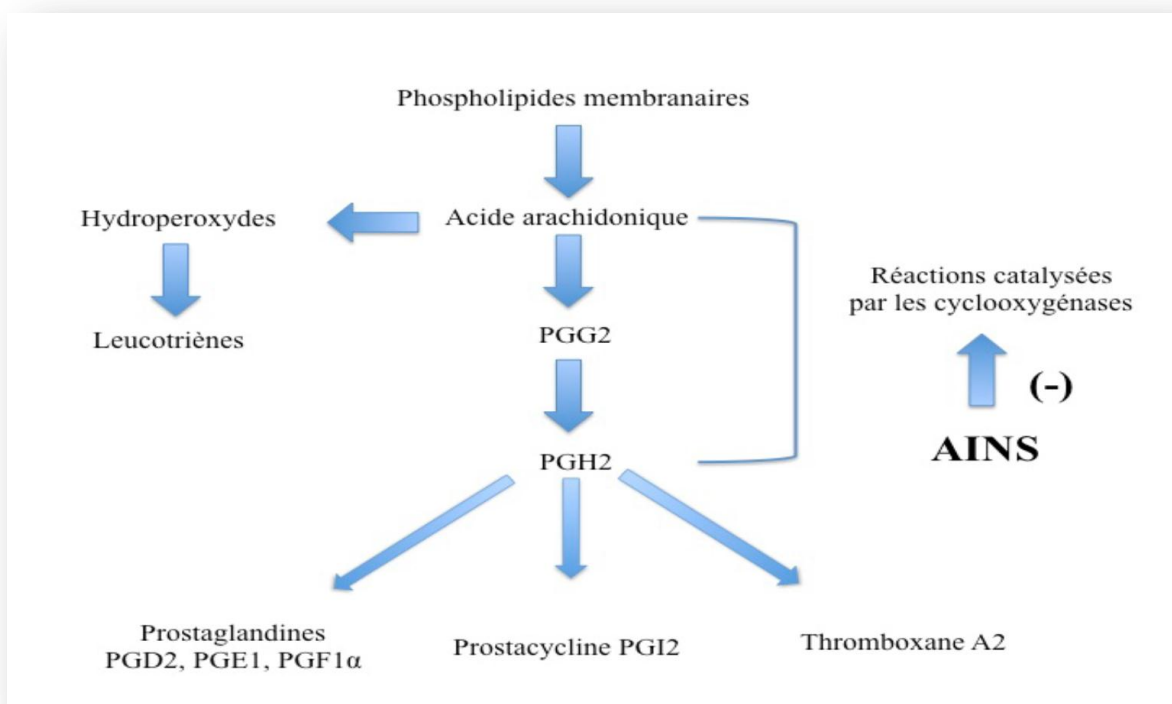


Figure 13: mécanisme d'action des AINS (Nicolas, 2001).

II. Matériels et méthodes

II.1 Matériel d'étude et caractérisation physicochimique et organoleptique

Notre choix s'est porté sur l'huile d'olive vierge extra (HOVE). Cette huile est obtenue à partir du fruit de l'olivier uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions thermiques qui n'entraînent pas d'altérations. En outre, elle ne subit aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation ou la filtration, contrairement aux autres huiles obtenues par solvant ou par des mélanges avec des huiles d'autre nature.

L'HOVE utilisée dans notre travail est donc obtenue par extraction à froid ou par pression à froid. Elle renferme par conséquent toutes les caractéristiques organoleptiques et les vertus thérapeutiques d'une huile d'olive comme suggéré par [Parmentier, 2008](#). Dans ces conditions c'est le type d'huile la plus commercialisée et la plus appréciée par les consommateurs à travers le monde ([COI, 2015](#)).

L'huile d'olive utilisée dans la présente étude provient de la campagne oléicole 2014/2015 et à partir de l'huilerie du groupe CHIALI située dans la zone industrielle de la willaya de Sidi Bel Abbes.

L'huilerie reçoit les olives provenant de vergers d'olivier appartenant au même groupe et aussi provenant des producteurs à travers la willaya de Sidi Bel Abbes durant la période octobre-décembre. Ces olives sont principalement les deux variétés les plus cultivées dans la région en l'occurrence la Chemelal et la Sigoise.

L'huile d'olive est stockée dans des tanks en inox alpha laval à l'abri de la lumière et à la température ambiante. Les prélèvements pour notre étude se font à partir du produit fini embouteillé et étiqueté selon la méthode d'échantillonnage conforme à la méthode [ISO 5555, 2012](#).

II.1.2 Analyses organoleptiques

Les analyses sensorielles portent sur les caractéristiques organoleptiques de l'HOVE en l'occurrence la couleur, la limpidité, l'odeur et la saveur ([Règlement CEE n°2568, 1991](#)).

II.1.3 Analyses physicochimiques

Elles portent sur la densité, l'indice de réfraction, l'indice de saponification, l'acidité libre, l'indice de peroxyde et le taux de polyphénols totaux selon les normes du [COI, 2015](#). Les esters méthyliques d'acides gras sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse selon les normes ([Norme ISO 5508, 1990](#)).

II.1.3.1 Indice de réfraction (IR)

Une goutte d'huile d'olive est déposée sur une lame du réfractomètre (marque Carl Zeiss) qui permet une lecture estimative des indices de réfraction de l'ordre du $2/10000^{\text{ème}}$ près en valeur absolue contre l'eau distillée (IR=1,33) à 20°C (ISO 6320, 2010).

II.1.3.2 L'acidité libre

L'échantillon d'HOVE (0,1 g) est dissout dans 50 ml d'éthanol, ensuite titré avec une solution d'hydroxyde de potassium 0,1 N en présence de phénolphthaléine comme indicateur coloré. L'acidité libre est exprimée en pourcentage d'acide oléique. (Norme ISO 660, 2009).

II.1.3.3 L'indice de peroxyde

Une solution saturée de KI (15 ml) est ajoutée à une solution d'HOVE (1g) dans 12,2 ml d'une solution d'acide acétique/chloroforme (12,2 ml) (3:2, V/V). Le mélange est placé à l'obscurité pendant 15 min, puis additionné de 60 ml d'eau distillée et 1ml d'une solution d'empois d'amidon. Une titration se fait par la solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 0,001N jusqu'à la disparition de la couleur violette. L'indice de peroxyde est exprimé en milliéquivalent d'oxygène actif par kilogramme d'huile ($\text{meqO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ d'huile) (Norme ISO 3960, 2010).

II.1.3.4 Indice de Saponification

Peser à 0,001g près 2 g d'HOVE et ajouter 25 ml de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium dans une fiole conique que l'on adapte à un réfrigérant. L'ensemble est porté à légère ébullition en agitant de temps en temps pendant 1 heure. Ajouter 4-5 gouttes de solution de phénolphthaléine, ensuite titrer la solution savonneuse encore chaude avec la solution d'acide chlorhydrique. Un essai à blanc est effectué dans les mêmes conditions sans HOVE. (Norme ISO 3657, 2013).

II.1.3.5 Dosage des polyphénols de l'huile d'olive vierge extra

Les phénols totaux sont déterminés selon la méthode de Gutfinger, 1981. Un échantillon d'HOVE (2,5 g) est extrait avec 5 ml d'hexane ensuite par 5 ml de méthanol/eau (60/40). Le mélange est vortexé vigoureusement pendant 2 min. Le réactif de Folin-Ciocalteu (0,5 ml) et l'eau bi distillée (4,8 ml) sont ajoutés à la fraction phénolique. Un volume de 1 ml de bicarbonate de sodium (35%, p/v) et de l'eau, sont ajoutés pour parvenir à un volume final de 10 ml. Le mélange est incubé pendant 2 h à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance du mélange est mesurée à 725 nm. Les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique par kg d'HOVE.

II.1.4 Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras (ISO 12966-1, 2014)

II.1.4.1 Caractéristiques de l'appareil CPG

- *La marque* : PERKIN ELMER.
- *Dispositif d'injection* : Le dispositif d'injection a un plus faible volume mort possible. Il est capable d'être porté à une température supérieure de 20 - 50°C à celle de la colonne.
- *Four*: le four est fait de sorte d'être capable de porter la colonne à une température d'au moins 220°C et de maintenir la température choisie à 1°C près.
- *Colonnes capillaires* : ont un diamètre de quelques dixièmes de millimètres (0,32mm) et une longueur de quelques dizaines de mètres (25mètres).

La phase stationnaire ou l'adsorbant sont déposés sur leur paroi interne, l'absence de remplissage leur donne une grande perméabilité ce qui autorise une grande longueur conduisant à de haute efficacité, tout en conservant des faibles pertes de charge. La faible quantité de phase stationnaire présente permet des analysés rapides, mais n'autorise d'injecter que des quantités infimes d'échantillon.
- *Détecteur* : le détecteur est fait de sorte d'être porté à une température supérieur à celle de la colonne.
- *Seringue* : la seringue utilisée au cours de l'injection est de 10µl, graduée en 0,1µl.
- *Enregistreur* : l'enregistreur est un appareil électronique de grande précision, utilisé pour calculer la composition du mélange analysé.
- *Intégrateur ou calculateur* : malgré l'existence d'un intégrateur électronique, ce dernier n'a pas été programmé pour le calcul des résultats pour des raisons techniques.
- *Gaz vecteur* : gaz vecteur (azote) soigneusement desséché et contenant moins de 10 mg/kg d'O₂
- *Gaz auxiliaires* : Hydrogène (de pureté > 99,9%), ne contenant pas d'impuretés organiques. Air ou oxygène, ne contenant pas d'impuretés organiques.
- *Produits d'étalonnage* : mélange d'esters méthyliques d'une huile, de composition connue.

II.1.4.2 Principe de la CPG

Il consiste en la détermination de la composition quantitative et qualitative d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras.

II.1.4.3 Préparation d'esters méthyliques

Principe

Elle consiste en une méthanolyse des glycérides en milieu alcalin.

Réactifs

- Méthanol
- Hydroxyde de potassium, solution méthanolique

Prise d'essai :

- Peser environ 1 gr d'huile d'olive
- Introduire la prise d'essai dans la fiole, ajouter 10 ml de méthanol + 5 gouttes de KOH méthanolique et un régulateur d'ébullition, adapter le réfrigérant à reflux à la fiole.
- La solution est portée à l'ébullition jusqu'à ce qu'elle devienne limpide la réaction est normalement terminée au bout de 5-10 min.
- Refroidir la fiole sous un courant d'eau et transvaser le contenu de la fiole dans une ampoule à décanter de 12ml.
- Rincer la fiole avec 10 ml d'heptane et les verser dans l'ampoule.
- Ajouter 10 ml d'eau, agiter et laisser décanter. Les esters se rassemblent dans la phase heptanique supérieure.
- Soutirer puis extraire la phase aqueuse une seconde fois par 10 ml d'heptane, réunir les deux extraits heptaniques et les lever deux fois avec 10 ml d'eau, laisser décanter puis à sécher sur sulfate de sodium. La solution heptanique est filtrée sur coton.
- Evaporer jusqu'à 10 ml environ le solvant au bain d'eau bouillante, avec barbotage d'azote, dans une fiole conique de 50 ml.

II.1.4.4 Méthode de calcul

On calcule la surface sous pic :

$$S = \frac{h \cdot B}{2}$$

h : hauteur

B : base

Dans le cas des pics à longue hauteur, on prend seulement les ½ hauteurs à ce niveau,

On calcule la base :

$$(S=h/2 \times B/2)$$

H: hauteur

B : base du 1/2 hauteur

Pour avoir la concentration pour chaque acide gras, on tient compte de:

- La somme des surfaces = total
- Le total = 100% et on calcule" donc les concentrations pour chaque surface

II.2 Evaluation de l'effet immunomodulateur de l'HOVE

II.2.1 Animaux et conditions d'élevage

Des rats Wistar (24) ayant 08 semaines d'âge et pesant $165 \pm 18,599$ g pour les mâles et $164,733 \pm 11,567$ g pour les femelles sont répartis séparément à raison de 06 rats par lot. Ces animaux nous ont été fournis par l'Institut Pasteur d'Alger et sont immunocompétents (figure 14). Les mâles et les femelles vivent séparément par groupe de sujets dans des cages conventionnelles, dotées d'une mangeoire et d'un biberon.



Figure 14 : Rats Wistar

La température est ajustée autour de 20°C. Les rats boivent de l'eau du robinet et sont nourris ad libitum durant toute la période de l'expérimentation avec un aliment standard en bâtonnets cylindriques compactés fourni par l'Office National de l'Alimentation du Bétail (ONAB) d'Alger et contenant 14,5% de protéines, 7,5 % de lipides, 55,8% de glucides, 4% de fibres alimentaires (cellulose), 5,7% de minéraux et vitamines et 12% d'eau (figure 15).

L'animalerie est alimentée en air filtrée. Elle est soumise à 12 heures de lumière 12 heures d'obscurité. Les manipulations sur les animaux effectuées en respectant le bien-être de l'animal, excluant tout état de stress susceptible d'interférer avec les résultats conformément aux lignes directrices du Comité d'éthique des animaux au niveau de l'université, compatibles avec ceux convenus par la Communauté européenne le 24 Novembre 1986 (86/609 / CEE).



Figure 15 : Tourteaux agglomérés de l'aliment destiné aux rats

II.2.2 Répartition des animaux

Les rats sont séparés dans 04 cages en polystyrène, dont les dimensions et la structure répondent aux bons usages chacune contenant 06 rats pour former les lots de l'expérimentation (figure 16).

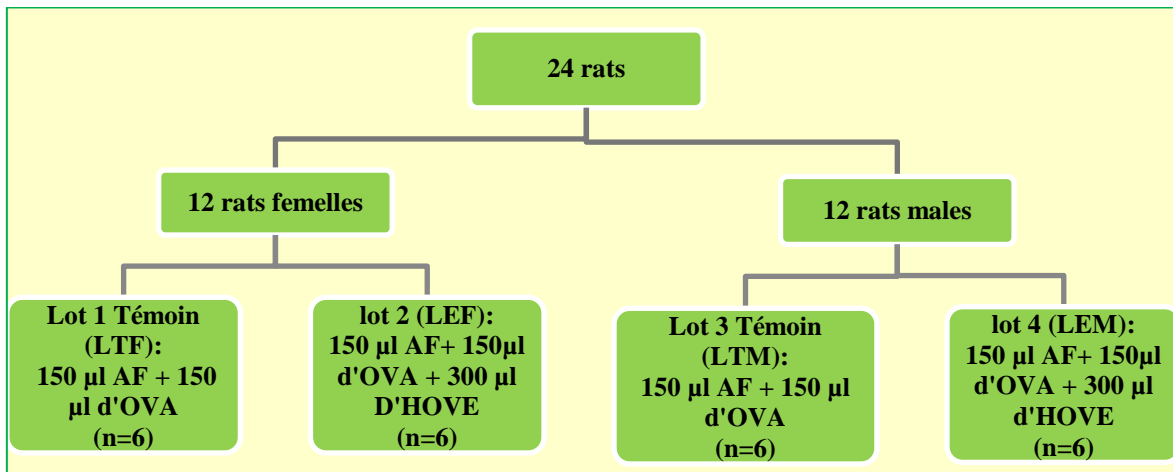


Figure 16 : Répartition des animaux et protocole expérimental

II.2.3 Immunisation des animaux

La solution antigénique est préparée en diluant 0,05g d'ovalbumine (OVA) (Sigma A-5253 200g lot 60Ko 844) dans 25 ml d'eau distillée stérile ensuite autoclavés à 120°C pendant 15 minutes. 1 ml de la solution d'ACF (Sigma F5881, lot 093K832) est vortexé en présence d'une solution antigénique contenant 30 µg d'ovalbumine. L'huile d'olive destinée à l'immunisation est prélevée dans des conditions aseptiques rigoureuses dans un flacon en verre stérile et conservée à l'abri de la lumière pour éviter toute éventuelle contamination ou oxydation.

Le protocole d'immunisation adopté selon les lignes directrices du conseil canadien de protection des animaux dure 35 jours (CCPA, 2002). Les lots témoins de rats males (LTM

n=6) et ceux de rats femelles (LTF) reçoivent en primo injection par voie sous cutanée 300 µl d'une solution antigénique constituée d'un mélange préalablement chauffé à 37°C d'adjuvant complet de Freund (ACF=150µl) et d'ovalbumine de poulet (OVA=150µl).

Les lots expérimentaux mâles (LEM) et femelles (LEF) reçoivent aussi en primoinjection sous cutanée respectivement la solution antigénique (150µl d'ACF, 150µl d'OVA) et 300µl d'HOVE.

L'injection de l'HOVA est effectuée simultanément avec l'injection de la solution antigénique dans des conditions d'asepsie au niveau des 4 pattes de l'animal après rasage. Les injections de rappel sont effectuées au 15^{ème} et 30^{ème} jour en utilisant l'antigène préparé dans les mêmes conditions en présence d'adjuvant incomplet de Freund (AIF) (Sigma F5506, lot 025K810).

II.2.4 Prélèvement et obtention de l'immunosérum

Au 35^{ème} jour de l'expérimentation les animaux sont sacrifiés. Le sacrifice se fait selon les lignes directrices du Comité régional d'éthique des animaux, compatibles avec ceux convenus par la Communauté européenne le 24 Novembre 1986 (86/609 / CEE). Le sang prélevé dans un tube sec est centrifugé et l'immunosérum est conservé à 04°C jusqu'à utilisation.

II.2.5 Recherche des anticorps anti-ovalbumine

La technique d'immunodiffusion radiale de Mancini qui se traduit par un dépôt du complexe Ag-Ac visible, est adoptée. L'avantage de cette technique dans notre cas réside dans sa simplicité et sa sensibilité et nous épargne l'usage de marqueurs dont certains sont dangereux pour l'utilisateur (radio-isotopes) et d'autres onéreux (enzymes).

II.2.6 Principe de la technique

Le principe consiste à déposer la solution d'Ac à doser dans des puits creusés dans un gel contenant l'Ag. Les Ac diffusent dans le gel et forment des anneaux de précipitation quand les concentrations relatives des deux éléments sont proches du point d'équivalence. La surface du disque est proportionnelle à la concentration en Ac. La concentration en Ag d'une solution peut être mesurée de la même manière en utilisant un gel contenant l'Ac.

II.2.7 Optimisation de la méthode d'immunodiffusion radiale inversée

Pour l'optimisation de cette technique des concentrations optimales d'antigènes et d'anticorps sont sélectionnées selon le protocole préconisé par [Vaerman *et al*, 1969](#).

Plusieurs solutions de différentes concentrations sont préparées à partir d'une solution antigénique mère contenant 10 mg d'ovalbumine dilués dans 20 ml d'acétate de Sodium et 2 g d'agarose déshydraté dilué dans 100 ml de tampon PBS avec une agitation pendant 30 minutes suivi d'un autoclavage à 120°C pendant 15 minutes pour stériliser le gel d'agarose. Toutes les opérations sont effectuées dans les conditions d'asepsie.

II.3 Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne suivie de l'écart type. L'analyse statistique des données des différents groupes est réalisée par le test de Student « t », ce test statistique paramétrique est adapté à une analyse comparative entre les moyennes des groupes expérimentaux et celle du groupe témoin. La probabilité de $P < 0.01$, est considérée significative.

II.4 L'étude de l'effet anti inflammatoire de l'huile d'olive vierge extra

II.4.1 Répartition des animaux

Les rats wistar (60) de l'expérimentation âgés de 08 semaines, et pesant $162,233 \pm 65$ g pour les mâles et $155,166 \pm 12$ g pour les femelles, sont séparés dans 5 cages en polystyrène pour chaque sexe (5 cages pour les males et 5 cages pour les femelles) dont les dimensions et la structure répondent aux bons usages chacune contenant 06 rats pour former les lots de l'expérimentation (86/609 / CEE). La répartition des lots est illustrée par la figure 17.

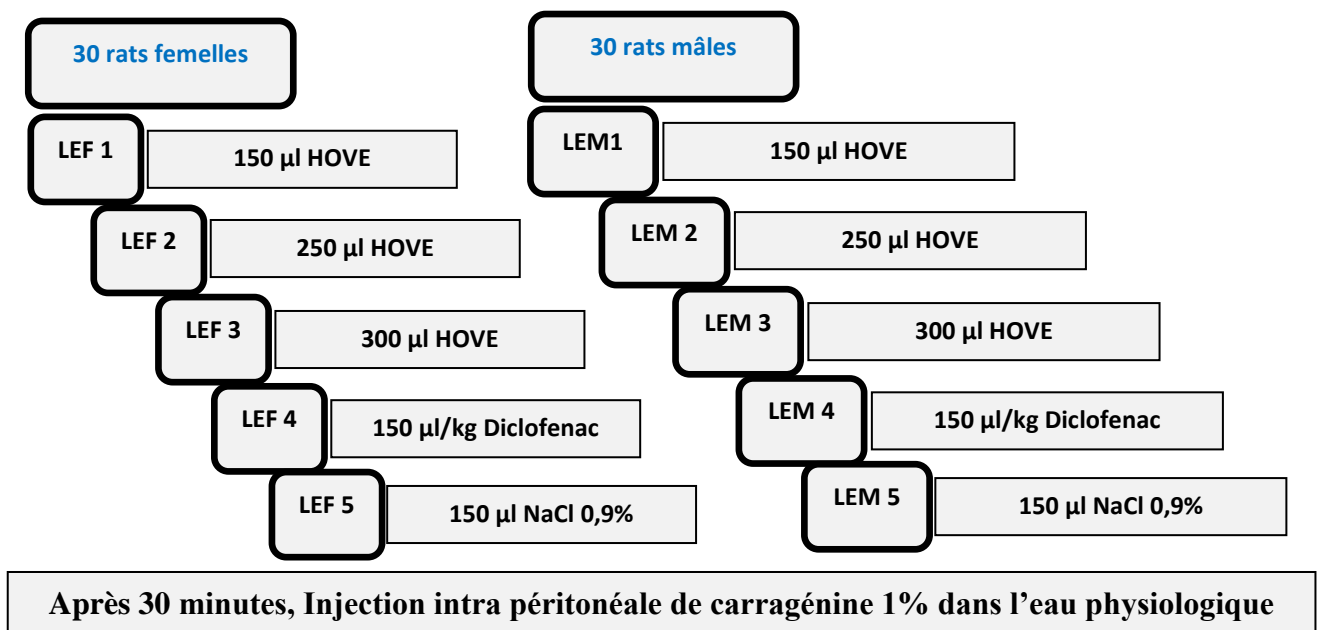


Figure 17 : Répartition des rats males et femelles et protocole expérimental

II.4.2 Antigène inflammatoire

La carragénine est utilisée comme antigène d'inflammation. Ce polysaccharide sulfaté extrait d'algue rouge, gélifiant et émulsifiant alimentaire, possède un pouvoir inflammatoire remarquable et est très utilisée pour tester les médicaments anti inflammatoires (Di rosa, 1972). Une solution de carragénine 1% dans de l'eau physiologique est extemporanément préparée et utilisée.

II.4.3 Voie d'injection

La voie intra-péritonéale est l'une des meilleures voies d'injection permettant une bonne captation de l'Ag par les cellules présentatrices de ce dernier de manière très efficace aux cellules immunocompétentes des ganglions lymphatiques (Revillard, 2001). L'important volume de la cavité péritonéale permet d'injecter une grande quantité de solution antigénique. Lors de l'injection la seringue est inclinée au cours de son introduction pour éviter de léser les organes (Wolfensohn et Lloyd, 2003).

L'huile d'olive vierge extra destinée à l'injection est prélevée dans des conditions aseptiques rigoureuses dans un flacon en verre stérile et préservée à l'abri de la lumière pour éviter toute éventuelle contamination ou oxydation.

L'injection de l'huile d'olive vierge extra est effectuée 30 min avant l'injection de la solution de carragénine 1% à l'aide d'une seringue d'insuline (Bilici *et al*, 2002).

Les injections sont effectuées par voies intra-péritonéale après désinfection de la peau de l'animal afin d'éviter toute éventuelle infection (figure 18).



Figure 18 : injection intra-péritonéale de l'huile d'olive vierge extra

II.4.4 Prélèvement sanguin

Les animaux sont sacrifiés 07 heures après l'injection de carragénine. Le sacrifice est effectué sous anesthésie générale on utilisant du chloroforme sous cloche en verre. Le sang est prélevé avec seringue à insuline de 01 ml par ponction dans l'aorte abdominale. L'avantage de cette technique est la possibilité de récolter une bonne quantité de sang stérile et la capacité de réaliser une exsanguination complète (weiss *et al*, 2000). Le sang prélevé est récupéré dans des tubes sous EDTA pour les tests hématologiques, dans des tubes héparines pour les tests biochimiques et dans des tubes secs pour les tests immunochimiques.

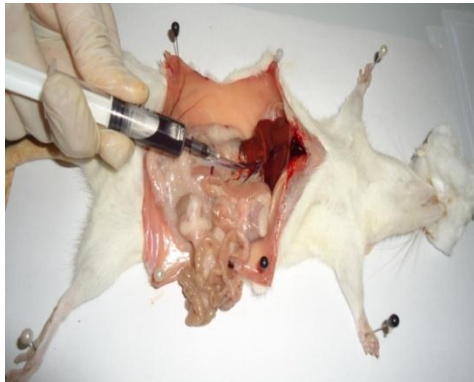


Figure 19: Prélèvement sanguin de l'aorte abdominale

II.4.5 Dosage des paramètres de l'inflammation

II.4.5.1 Hémogramme (dénombrement leucocytaire)

L'hémogramme représente l'étude cytologique quantitative et qualitative du sang circulant. Il s'agit donc d'un diagramme sanguin qui analyse le nombre, la proportion, la morphologie et les variations des éléments figurés du sang (Scipioni *et al*, 1997). Il comprend d'abord les numérations absolues érythrocytaire, leucocytaire et plaquettaire. On établit ensuite pour les globules blancs la formule leucocytaire donnant les pourcentages des différents types de leucocytes : granulocytes (ou polynucléaires) neutrophiles, granulocytes éosinophiles, granulocytes basophiles, lymphocytes et monocytes. A côté de la formule leucocytaire on peut évaluer le nombre d'érythroblastes présents sur le frottis. Ce nombre est exprimé en pourcentage du nombre total de globules blancs. Le volume sanguin total d'un rat est de 50 à 70 ml/kg, ce qui équivaut à 6-7% du poids corporel (Scipioni ,1997) corporel. La quantité de sang ponctionnable s'exprime donc soit en ml/kg, ce qui équivaut à un pourcentage du poids total, soit en pourcentage du volume sanguin total (Weiss ,2000) .Les analyses hématologiques sont effectuées à l'aide d'un automate marque : Beckman coulter Médonic au laboratoire central des analyses médicales de la wilaya de Mascara.

II.4.5.3 Dosage de la Protéine C-réactive (CRP)

La protéine C-réactive est synthétisée par le foie et elle constitue l'une des protéines de la phase aiguë de la réponse inflammatoire. Le taux plasmatique de certaines protéines, dont la CRP, augmente. La CRP est un marqueur précoce, sensible et spécifique de la réaction inflammatoire augmentant proportionnellement à son intensité (Geelen, 2004).

Elle apparaît dans les six heures suivant l'inflammation aiguë. Son taux augmente et est maximal après deux jours. Il peut baisser en moins de 6 heures lorsque la source de l'inflammation a été éradiquée. Le dosage de la concentration est utile pour détecter et évaluer les troubles inflammatoires, les lésions tissulaires et les infections. La CRP est une protéine positive de l'inflammation (Nelson, 2007).

II.4.5.4 Méthode de dosage de la CRP

Test immunoturbidimétrique

- ***Principe***

C'est une mesure par photométrie du trouble amené par la réaction Anticorps – Antigène, en méthode point final 340nm

- ***Prélèvements***

Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur tube sec à usage unique.

- ***Réactifs:***

Flacon R1 (Tampon)

-phosphate pH 7,43

-NaCl polyethylene glycol 40g/l

-Azide de sodium 0,95g/l

Flacon R2 (Anti CRP)

-phosphate pH 7,43

-Anti CRP humain polyclonale (chèvre)

-Azide de sodium 0,95g/l

Les réactifs (R1, R2) sont fournis par BIOLABO dans le kit.

- ***Mode opératoire***

50 µl du sérum est mis sur un cercle de la plaque de test, puis une microgoutte de 50µl du réactif contenant les AC anti-CRP est ajoutée sur un cercle d'une plaque-test.

Les gouttes sont mélangées à l'aide d'un agitateur à usage unique, en utilisant toute la surface du cercle. un mouvement de rotation est réalisé à la plaque à l'aide d'un agitateur

horizontal a 1500 tours/min ; ensuite l'agglutination est examinée pendant une période n'excédant pas 2 minutes.

- ***Lecture du résultat***

Les particules de CRP-Latex sont recouvertes d'anticorps anti-CRP humaine. Le réactif CRP-latex est standardisé pour détecter des taux de CRP dans le sérum aux environs de 6 mg/L, taux considéré comme étant la plus petite concentration ayant une signification clinique dans ce kit. Le mélange du réactif latex avec le sérum contenant la CRP conduit à une réaction antigène-anticorps qui se traduit par une agglutination facilement visible dans les 2 minutes. La présence ou l'absence d'agglutination visible indique la présence ou l'absence de la protéine.

II.4.5.5 Dosage de fibrinogène

Le fibrinogène est une glycoprotéine de haut poids moléculaire, synthétisé par le foie et représente la protéine de la phase finale de la cascade de la coagulation. Le fibrinogène est transformé en fibrine par la thrombine. C'est la protéine de la phase aigüe de l'inflammation. Une augmentation du taux de fibrinogène sanguin traduit un état inflammatoire (Fuller, 1982).

Le mode opératoire

Le sang est prélevé dans des tubes citratés (31,3 g/l de citrate de sodium 2H₂O), centrifugés rapidement à 4000 tours/minutes pendant 15 minutes (Biomnis, 2012). Le dosage repose sur l'évaluation chronométrique du fibrinogène selon la méthode de Clauss. En présence d'un excès de thrombine le temps de coagulation d'un plasma préalablement dilué est proportionnel à la quantité de fibrinogène plasmatique (koenig, 2003).

Le test devra être effectué dans un délai n'excédant pas 4 heures au plus après le prélèvement .On utilise à cet effet un kit dont le protocole sont fixé par le fabricant.

On introduit, 200µl de plasma de rat ou de contrôle dilué au 1/10 avec la solution tampon, dans un tube à hémolyse incubé à 37°C. Cette dilution permet d'obtenir habituellement un temps de coagulation compris entre 8 et 25 secondes.

On déclenche simultanément le chronomètre tout en ajoutant 200 µl de thrombine préalablement incubée à 37°C et on note le temps de coagulation dès l'apparition d'un mince filament de fibrine. Un tableau de conversion est utilisé pour déterminer la concentration de fibrinogène correspondant au temps de coagulation obtenu (Biomis, 2012).

II.4.6 Analyse statistique

Le logiciel Stat view permet de déterminer les moyennes des valeurs répétées et les écarts types. Le test de Student sur Excel est utilisé pour la comparaison entre groupes expérimentaux et témoins. Les valeurs de $p < 0.01$ sont considérées statistiquement significatives.

III. Résultats et Discussion

Les résultats des analyses physico-chimiques, et organoleptiques des différents paramètres analysés sont comparés aux normes du [Conseil Oléicole International, 2015](#). Cela concerne la dénomination de cette huile qui est assujettie aux critères de qualité en l'occurrence l'odeur la saveur, la couleur et l'aspect à 20°C pendant 24 h. Cela concerne aussi les paramètres physicochimiques qui ont porté sur la densité, l'indice de saponification, l'acidité libre l'indice de peroxyde, la teneur en polyphénols totaux et en acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

III.1 Analyse organoleptique

Les analyses organoleptiques sont effectuées dans le centre technique de l'olivier à Aix en Provence en France et les résultats sont présentés dans le ([tableau 02](#)). Notre échantillon d'huile d'olive est de couleur jaune verdâtre avec un aspect limpide à 20°C pendant 24h. Il présente une amertume et un caractère piquant de 03/10 pour chacun et une intensité fruitée de 4,8/10 sans aucun défaut majeur. A la lumière de ces résultats, notre huile étudiée est classée dans la catégorie d'huile d'olive vierge extra ([Règlement \(CEE\) n° 2568/91](#)).

Tableau 02: résultats des analyses organoleptiques de l'huile d'olive

Analyses organoleptiques	Résultats	Méthode	Classification
Analyses organoleptiques en Jury (08 dégustateurs)	Intensité fruitée: 4,8	Règlement (CE) n°2568/91	Huile d'olive vierge extra
	Défaut majeur : néant		

III.2 Composition en acides gras par CPG

Les acides gras (AG), sous forme de leurs esters méthyliques, sont analysés par CPG ([tableau 03](#)).

Tableau 03 : Composition en acides gras de l'huile d'olive

Acide gras	Concentration (%)	Normes COI, 2015 (%)
Acide palmitique	10,5	7,5 à 20,6
Acide oléique	80	55 -83
Acide palmitoléique	2,5	0,3 – 3,5
Acide linoléique	0,3	≤ 1
Acide linoléique	4,5	3,5 – 21
Acide arachidique	0,5	≤ 0,5
Somme des AG saturés	11	
Somme des AG monoinsaturés	82,5	
Somme des AG polyinsaturés	4,8	

Les analyses de chromatographie en phase gazeuse montrent que les acides gras saturés ne représentent que 11% alors que ceux monoinsaturés sont prépondérants particulièrement l'acide oléique qui constitue un marqueur de bonne qualité de cette huile. Aussi les acides gras polyinsaturés comme les acides linoléiques et linoléniques sont présents en quantités conformes aux normes du [COI, 2015](#) et du [Codex Alimentarius, 2015](#) pour une HOVE (figure 20).

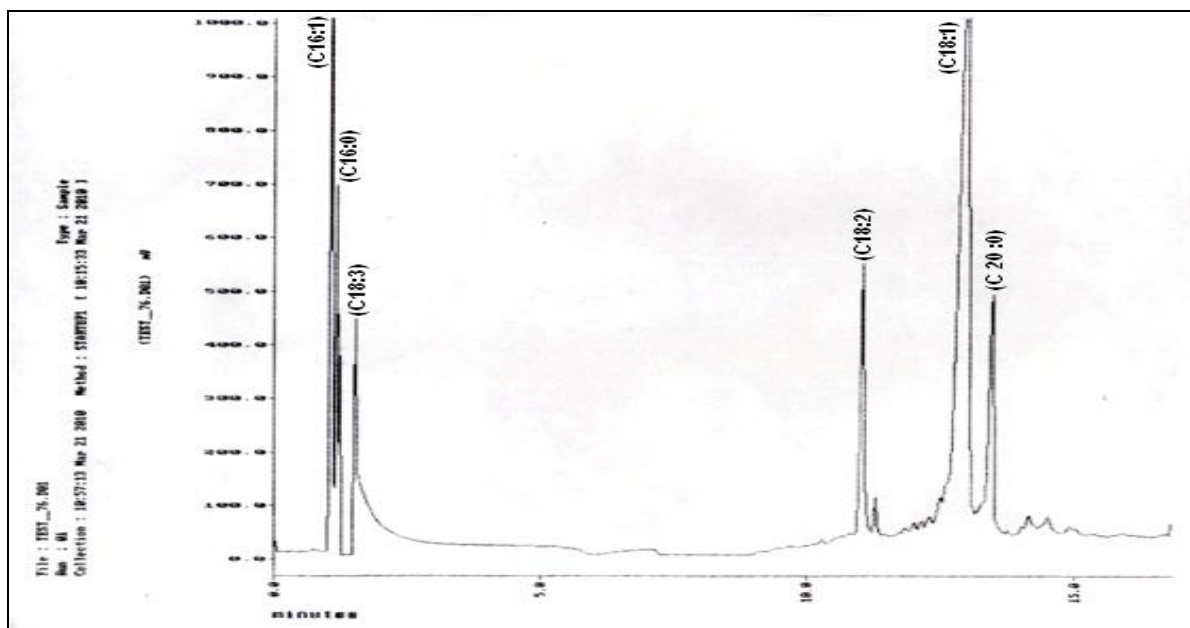


Figure 20 : Analyse des acides gras de l'huile d'olive vierge extra par CPG.

La composition en AG est analogue à celle observées par d'autres auteurs ([Abaza et al, 2002](#); [Ollivier et al, 2007](#)). Il y a une prédominance nette d'acides gras insaturés par rapport aux acides gras saturés.

III.3 Analyses des paramètres physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques sont effectuées dans le laboratoire du Centre Algérien de Contrôle de Qualité et de l'Emballage (CACQE) et les résultats figurent dans le [tableau 04](#).

La valeur de l'indice de réfraction est de $1.468 \pm 0,006$ alors que la densité à 20°C est de $0,916 \pm 0,002$. Ces valeurs sont conformes aux normes internationales en vigueur ([COI, 2015](#) et [Codex Alimentarius, 2015](#)). L'acidité libre est un facteur de qualité qui permet de donner un niveau de l'état de dégradation de la matière grasse de l'huile d'olive, constituée de triglycérides. Elle s'exprime en grammes d'acide oléique libre pour 100 grammes d'huile d'olive ([COI, 2015](#)). Notre échantillon présente un taux de 0.1% pour une valeur maximum de 0.8% autorisée pour l'HOVE. Les peroxydes sont formés pendant l'oxydation. L'indice de

peroxyde est un paramètre de degré d'oxydation lipidique. Pour l'huile d'olive étudiée, il exprime une valeur de 4 meq O₂/kg d'huile qui est nettement inférieure à la limite maximale de 20 meq O₂/kg établie pour une huile d'olive de catégorie vierge extra. Ces résultats sont en conformité avec ceux de [BenTekaya et al, 2005](#) ; [Salvador et al, 2007](#) ainsi que le [COI, 2015](#).

Tableau 4: résultats des analyses physico-chimiques de l'échantillon d'huile d'olive

Paramètres	*Résultats	Normes (COI, 2015 & Codex Alimentarius, 2015)
Indice de réfraction	1,468±0,006	1,4677 à 1,4705
Densité à 20°C	0,916±0,002	0,910 à 0,916
Indice de saponification	184±1,00	184 à 196
Indice de peroxyde meq d'O ₂ /Kg d'huile	4±0,635	≤ 20
Acidité libre exprimée en % d'acide oléique	0,1±0,005	0.8
Polyphénols totaux (mg Acide Gallique/Kg d'huile)	280±5,437	**100 à 800 mg/kg

* Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne±Ecart-type (n = 3).

** [Maestro-Duran et al, 1994](#)

L'huile d'olive vierge est caractérisée par sa teneur élevée en polyphénols. Ces composés sont significativement liés à la qualité de l'huile d'olive vierge et leur contribution à la stabilité oxydative de ce produit est largement acceptée ([Blekas et al, 2002](#)). Les conditions agronomiques, les procédés technologiques de la production et la maturité des olives, affectent fortement la qualité et la quantité des composés phénoliques hydrophiles de l'huile d'olive. La teneur en polyphénols totaux de l'huile d'olive étudiée est de 280 mg/kg exprimée en acide gallique. La concentration en polyphénols peut être supérieure à 500 mg/kg ([Montedero et al, 1992](#)) et varie entre 100 et 800 mg/kg ([Maestro-Duran et al, 1994](#)). [Owen et al, 2000](#) ont rapporté une teneur en phénols de 232 mg/kg pour l'huile d'olive vierge extra et de 62 mg/kg pour l'huile raffinée. ([Sánchez-Fidalgo et al, 2013](#)) rapportent une concentration exprimée en tyrosol de 350 (ppm) ou mg/kg de composés phénoliques de l'extrait méthanolique d'HOVE. Notre huile peut être considérée comme riche en polyphénols lui conférant les effets bénéfiques pour la santé.

A la lumière de ces résultats physico-chimiques l'huile d'olive étudiée est conforme aux normes internationales et est classée "Huile d'Olive Vierge Extra". Ce type d'huile obtenue à basse pression est riche en antioxydants et présente un faible taux d'acidité lui permettant de bien se conserver à l'abri de la lumière et de la chaleur et lui conférant des vertus thérapeutiques intéressantes (Sebbagh *et al*, 2009).

III.4 Immunomodulation par l'HOVE chez les rats Wistar

III.4.1 Observation générale sur les rats de l'expérimentation

Durant l'expérimentation, le suivi régulier des animaux n'a montré aucun vomissement, diarrhée, anorexie, démangeaison, abcès ou œdème. Ces symptômes peuvent être secondaires à un régime déterminé.

III.4.2 Optimisation et évaluation du taux des immunoglobulines IgG anti OVA par la technique d'immunodiffusion radiale inversée

L'optimisation de la technique d'immunodiffusion radiale inversée a permis suite un tableau croisé de retenir les conditions opératoires permettant d'obtenir l'optimum de précipitation (tableau 05).

Tableau 05 : Optimisation de la méthode d'immunodiffusion radiale inversée

Solutions antigéniques	Formation de l'anneau de précipitation sur agarose
2 ml de solution mère d'OVA+ 1 ml de tampon d'acétate de Sodium à pH 7,2+ 8 ml d'agarose.	+
1 ml de solution mère d'OVA + 2 ml de tampon d'acétate de Sodium à pH 7,2+ 8 ml d'agarose.	+++
0,666 ml de solution mère d'OVA+ 2,333 ml de tampon d'acétate de Sodium à pH 7,2+ 8 ml d'agarose.	-
0,5 ml de solution mère d'OVA+ 2,5 ml de tampon d'acétate de Sodium à pH 7,2+ 8 ml d'agarose.	-
0,4 ml de solution mère d'OVA+ 2,6 ml de tampon d'acétate de Sodium à pH 7,2+ 8 ml d'agarose.	-
0,334 ml de solution mère d'OVA+ 2,666 ml de tampon d'acétate de Sodium à pH 7,2 + 8 ml d'agarose.	-

Ainsi 1 ml de solution mère d'OVA et 2 ml de tampon d'acétate de Sodium à pH 7,2 en présence de 8 ml d'agarose sont les conditions optimales de formation de complexes immuns. En effet, dans ces conditions, les anticorps polyclonaux de l'antisérum diffusent radialement en fonction de leur concentration ; plus le diamètre de l'anneau est grand plus la concentration en anticorps est forte (Mancini *et al*, 1965 ; Vaerman *et al*, 1968).

Les diamètres des précipités immuns mesurés chez les animaux du LTM et LTF traduisent des taux d'anticorps différents ($P < 0,01$ $n=6$). Le taux d'IgG chez le LTF est supérieur à celui du LTM. Les mêmes constatations sont faites pour les animaux du LEM et LEF ($P < 0,01$, $n=6$) (figure 21).

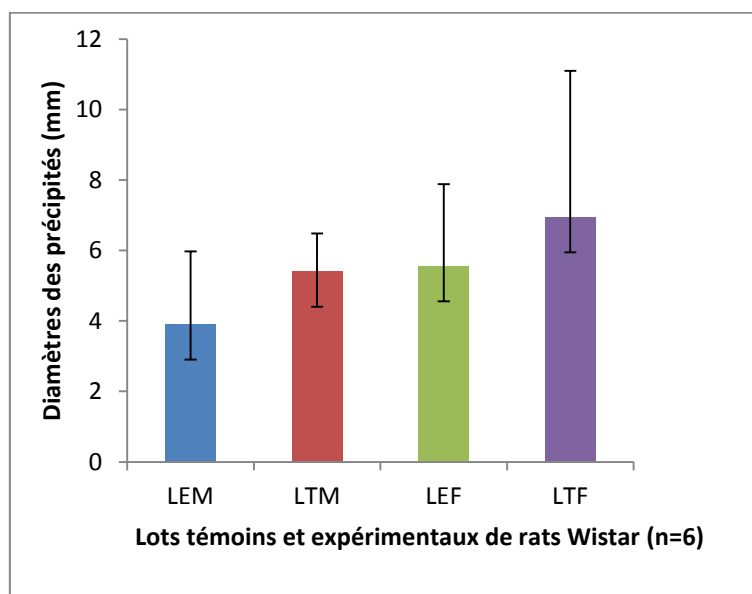


Figure 21: Diamètres (mm) des précipités immuns chez les lots de rats mâles et femelles immunisés respectivement par l'OVA et l'OVA + HOVE ($P < 0,01$; $n=6$; Ecart types $\times 10$)

Plusieurs études récentes ont montré que le sexe femelle chez les mammifères présente une réponse immunitaire humorale plus intense et plus significative que celle du sexe mâle. En effet, Grossman, 1989 a montré que la forte production d'anticorps polyclonaux chez les souris femelles est due aux hormones du système endocrinien qui sont intimement impliquées dans ce dimorphisme immunologique regroupant notamment les stéroïdes gonadiques, les glucocorticoïdes surrénales, l'hormone de croissance la prolactine hypophysaire, les hormones thymiques et les cytokines produites par les lymphocytes activés.

L'analyse statistique des résultats montre que le diamètre des puits chez les femelles LEF qui ont reçu une dose de 300 μ l d'HOVE est inférieur à celui des femelles témoins LTF.

Ces résultats traduisent une production très faible en anticorps anti-OVA pour les femelles expérimentales par rapport aux femelles témoins ($P < 0,01$ $n=6$) (figure 21).

Le même résultat est constaté chez les rats mâles LEM où le diamètre des puits des rats ayant reçu la dose de 300 μ l d'HOVE est inférieur à celui du groupe témoin LTM, ce qui indique une faible production d'anticorps Anti-OVA en comparaison avec le groupe témoin ($P < 0,01$ $n=6$) (figure 21).

Ces résultats convergent avec plusieurs études réalisées sur les rats et les souris à travers le monde et qui confirment que l'huile d'olive vierge extra diminue la réponse immunitaire. En fait, les acides gras contenus dans l'huile d'olive permettent de diminuer la prolifération de lymphocytes de types B et T. Les acides gras contribuent à moduler le processus d'inflammation et le système immunitaire en général et aident à lutter contre certaines maladies auto-immunes (Manuel *et al*, 2004).

La plupart des études portant sur les effets des acides gras sur le système immunitaire ont montré qu'une alimentation contenant l'huile d'olive administrée aux animaux favorise une réduction significative de la prolifération des lymphocytes en réponse à l'effet mitogène de la concanavaleine A (Yaqoob, 1994). Les effets immunosuppresseurs de l'huile d'olive sont probablement dus à l'acide oléique, plutôt que d'autres composants de cette matière grasse (Jeffery *et al*, 1997). L'administration des régimes contenant de l'huile d'olive pendant 8 ou 12 semaines a produit une augmentation de la production d'IL-2 chez les souris (Yaqoob et Calder, 1995; De Pablo, 1998). L'IL-4 est une autre cytokine ayant des fonctions anti-inflammatoires ; la production de cette cytokine est augmentée chez les souris après l'administration pendant quatre semaines d'un régime alimentaire contenant de l'huile d'olive (Puertollano *et al*, 2004). Dans les études animales, l'administration d'huile d'olive réduit l'activité des cellules NK (Yaqoob *et al*, 1994). La comparaison des données entre les animaux nourris de différentes quantités d'acide oléique a montré une relation linéaire négative, indiquant que l'acide oléique est responsable d'une réduction de l'activité des cellules NK chez les rats (Jeffery *et al*, 1997).

III.5 Effet anti inflammatoire d'huile d'olive vierge extra

III.5.1 Dénombrement des globules blancs

Par définition l'hémogramme est l'étude cytologique quantitative et qualitative du sang circulant. Il s'agit donc d'un diagramme sanguin qui analyse le nombre, la proportion, la morphologie et les variations des éléments figurés du sang ([Scipioni et al , 1997](#) ; [Wright et al,1983](#)). Il comprend d'abord les numérations absolues érythrocytaire, leucocytaire et plaquettaire. On établit ensuite pour les globules blancs la formule leucocytaire donnant les pourcentages des différents types de leucocytes : granulocytes neutrophiles, granulocytes éosinophiles, granulocytes basophiles, lymphocytes et monocytes (les granulocytes sont parfois appelés polynucléaires). Nous nous sommes limités dans notre cas à l'évaluation particulière des globules blancs ou la totalité des leucocytes et étudié leur variation au cours des différentes expérimentations.

Les rats normaux présentent une formule numéraire sanguine telle que présentée en annexe. Les valeurs usuelles des globules blancs présentées pour les rats males et femelles sont respectivement de $8,66.10^9/l$ et $6,96.10^9/l$ ([CRL, 1982](#)).

Selon [Teeter et Franciscus, 2004](#), le nombre élevé de globules blancs indique que l'organisme lutte contre une infection ou une inflammation. Le nombre de leucocytes augmentent dans le sang en réponse à une inflammation ([Charles et al, 2010](#)). La carragénine provoque une inflammation typiquement liée à l'activation de la cyclooxygénase ([Di rosa, 1972](#)). Cette inflammation est biphasique. En effet, il est connu que, chez l'animal vivant, la carragénine dans une première phase provoque la synthèse de médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine qui entretiennent l'inflammation ([Di Rosa, 1972](#)). Dans une seconde phase, cette molécule de référence induit la synthèse de prostaglandines principalement, de protéases et de lysosomes. Cette dernière étape est sensible aux antagonistes de synthèse des prostaglandines et aux anti-inflammatoires naturels ou de synthèse tels que les glucocorticoïdes ([Della loggia et al, 1968](#) ; [Alcaraz et Jimenez, 1988](#) ; [Reto et al, 2014](#)).

Le nombre de globules blancs est très élevé chez le groupe témoin de rats femelles (LTFNaCl) traités avec du NaCl 0,9% comparés à tous les autres groupes femelles expérimentaux (LEFDiclo, LEF150, LEF250 et LEF300)) ($P<0,01$) ([Figure 22](#)). Cela montre que le traitement des rats femelles par le Diclofénac et les différentes doses d'HOVE entraîne une diminution du nombre de leucocytes. Cependant la comparaison du groupe LEFDiclo à LEF300 ne montre pas de différence significative alors qu'elle l'est pour le groupe LEF150

où les leucocytes sont plus abondants. Ces résultats expliquent l'effet dose de l'HOVE qui réduit le nombre de leucocytes en fonction de la concentration. Cette réduction est importante avec de l'HOVE mais reste légèrement inférieure à celle provoquée par le diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien. En effet le traitement des rats femelles avec 150 μ l d'HOVE reste insuffisant comparé au traitement avec le diclofénac. L'effet anti-inflammatoire de l'HOVE est similaire à celui du Diclofénac à la dose de 300 μ l ($P < 0,01$).

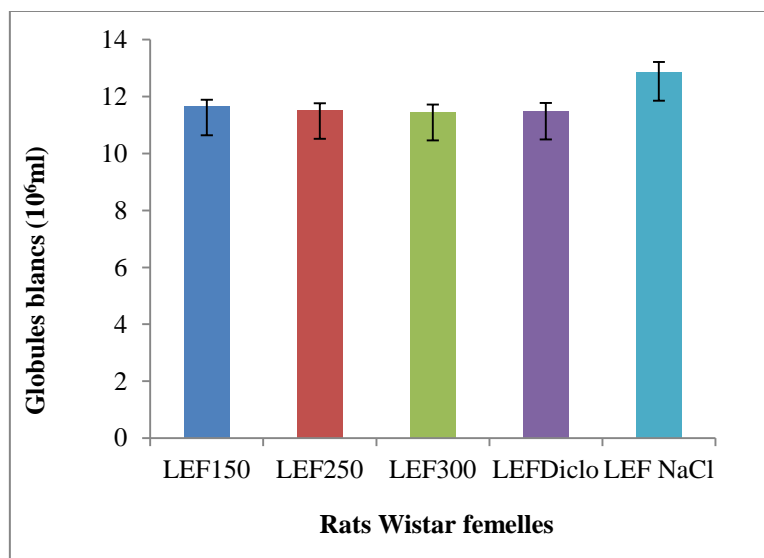


Figure 22 : Nombre de globules blancs chez les rats femelles
Les valeurs représentent les moyennes \pm écart-types ($P < 0,01$)

Les rats expérimentaux mâles auxquels on a administré du NaCl à 0,9% présentent eux aussi une inflammation optimale mesurée après injection de carragénine à 1%. Le nombre de globules blancs est réduit chez tous les lots expérimentaux traités au Diclofénac ou à l'HOVE mis à part celui traité par 150 μ l d'HOVE (LEM150) qui ne présente pas d'effet anti-inflammatoire et donc pas de réduction de globules blancs ($P < 0,01$) (figure 23).

A la dose de 150 μ l d'HOVE Les rats mâles présentent une réaction inflammatoire optimale avec un nombre de globules blancs important comparable à celui des rats mâles traités par du NaCl à 0,9%. Les rats mâles ont un système immunitaire qui par l'intermédiaire de la prolifération des globules blancs en réponse à l'injection d'HOVE, résiste à l'effet anti-inflammatoire de l'huile à la dose de 150 μ l comparativement au rats femelles ($P < 0,01$).

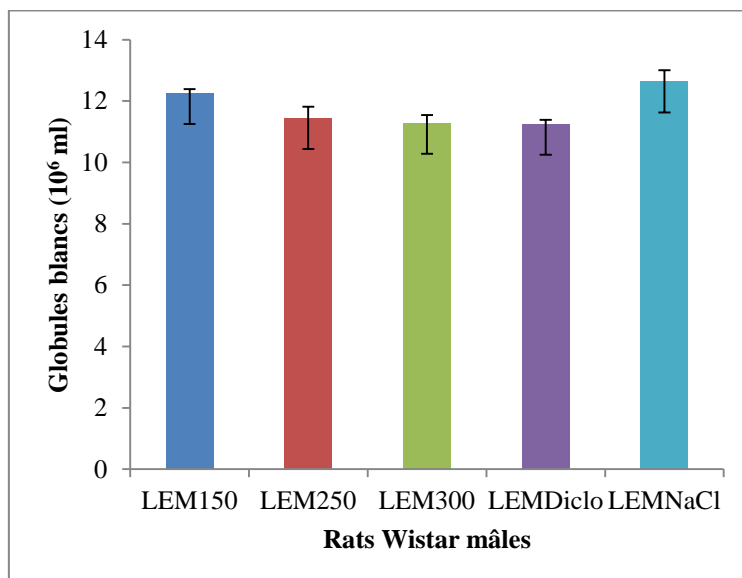


Figure 23 : Nombre de globules blancs chez les rats males
Les valeurs représentent les moyennes \pm écart-types.

Le taux des globules blancs augmente suite à l'inflammation induite par la carragénine par voie intrapéritonéale. Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place, sont les polynucléaires. Le plus souvent, les polynucléaires sont progressivement remplacés sur le site inflammatoire par les cellules monocytes. Parmi celles-ci, les macrophages ont pour fonction d'assurer la détersion grâce à leur capacité de phagocytose. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène (Nathan, 2002). Cette diminution des globules blancs chez les rats des deux sexes ayant reçus les doses de 250 et 300 μ l d'HOVE confirme que ce produit exerce un effet anti inflammatoire presque similaire que celui du Diclofenac (anti inflammatoire non stéroïdien) ($P < 0,01$).

III. 5. 2 la protéine C réactive

La protéine C-réactive est synthétisée par le foie son taux normal est < 6 mg/L la CRP constitue l'une des protéines de la phase inflammatoire aiguë. Au cours de cette dernière, le taux plasmatique de certaines protéines, dont la CRP, augmente. Le dosage de la concentration de la CRP est utile pour déceler et évaluer les troubles inflammatoires, les lésions tissulaires et les infections. La CRP peut atteindre le taux de 200 mg/L suite à une infection bactérienne (Kushner, 1982). La concentration de la CRP chez le rat (CRPr) est environ 300–500 mg/l dans les conditions normales (Nunomura, 1994). La CRPr joue le même rôle que celle chez l'homme (Niubel Diaz Padilla, 2003).

D'après la figure 24 on remarque que le taux de CRPr chez les rats du lot LEFNaCl est remarquablement élevé par rapport aux autres groupes ayant reçu le Diclofénac LEFDiclo et les différentes doses d'HOVE (LEF150, LEF250, LEF300) ($P < 0,001$). Aussi, la réduction de la CRPr chez les lots LEF ayant reçu les différentes doses d'HOVE est dose-dépendante ($P < 0,01$). La comparaison entre le taux de CRPr du lot LEFNaCl et les lots LEF150, LEF250 et LEF300 révèle une différence hautement significative ($P < 0,001$), par contre la comparaison entre le taux de CRPr chez le lot LEFDiclo et le lot LEF300 révèle une différence négligeable, et une différence hautement significative avec les deux autres lots LEF150 et LEF250. D'après ces résultats on déduit que l'HOVE à 300 μ l (LEF300) peut avoir le même effet anti inflammatoire que celui du Diclofenac (LEFDiclo).

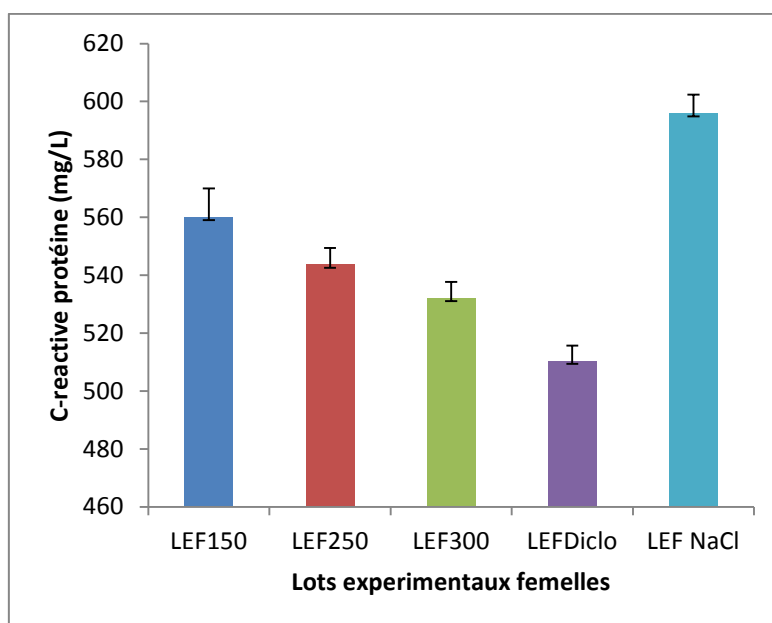


Figure 24 : Variations de la CRP chez les rats femelles

Les valeurs représentent les moyennes \pm écart-types.

Le taux de CRPr est élevé d'une manière remarquable chez le lot LEMNaCl et le lot LEM150 par rapport aux autres lots expérimentaux (LEM250, LEM300 et LEMDiclo) avec une différence hautement significative ($P < 0,001$) (figure 25). Cependant la différence entre les groupes expérimentaux qui ont reçu les différentes doses d'HOVE demeure non significative. Le même résultat est décelé chez les lots LEMNaCl et LEM150. La comparaison entre le taux de CRPr chez les animaux des lots LEMDiclo et LEM300 ne montre aucune différence significative. Par contre on note une différence significative entre les taux de CRPr chez les lots LEM150, LEM250 et LEMDiclo ($P < 0,001$). Cette différence est aussi significative entre

les lots LEM150, LEM250 et LEM300 ($P < 0,01$). Ces résultats montrent que l'HOVE a abaissé le taux de CRP avec un effet dose. Aussi, la dose de 300 μ L de HOVE la diminution de la CRPr reste inférieure à celle provoquée par le Diclofenac ($P < 0,01$).

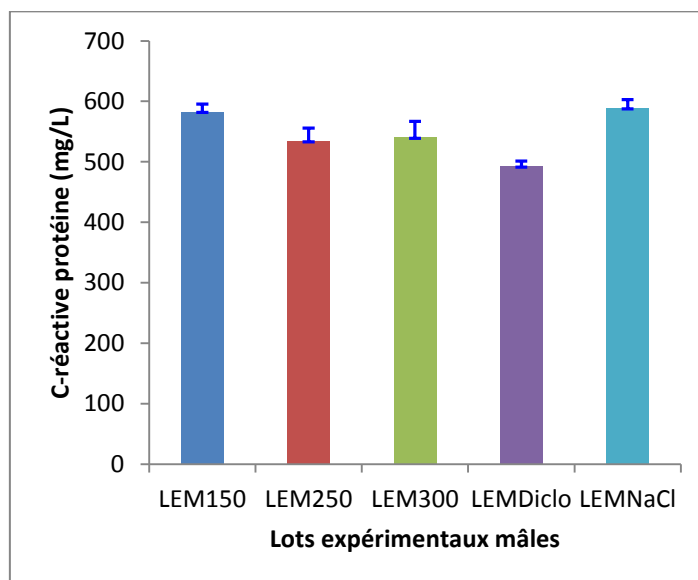


Figure 25 : Variations de la CRPr chez les rats mâles

Les valeurs représentent les moyennes \pm écart-types.

Ces résultats corroborent ceux d'[Dell'Agli et al, 2007](#) qui ont examiné les effets des extraits d'huile d'olive de haute et de basse teneur en polyphénol et des composés phénoliques simples sur l'agrégation plaquettaire. Les extraits de l'huile d'olive, et les phénols simples ont présenté un effet inhibiteur des marqueurs de l'inflammation. En effet, l'interleukine 6 et la protéine-C-réactive, se sont révélés être des signes de maladie cardiovasculaire ; la consommation de polyphénols de l'huile d'olive, à une dose journalière de 50 mL d'HOVE, diminue les taux circulants de l'IL-6 et de la CRP chez des sujets coronariens stabilisés ([Fito et al, 2008](#)).

Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en polyphénols était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) dans le plasma ([Salas- Salvado et al, 2008](#)), que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines

(IL-8, IL-13 et IFN- α) circulantes (Karlsen *et al*, 2007) ou encore que l'augmentation du pouvoir antioxydant du plasma, dû à une consommation des polyphénols concentrés, était associée à une diminution des cassures de brins d'ADN et la synthèse des molécules d'inflammation sérique (Nantz *et al*, 2006).

L'oléocanthal est un autre composé phénolique, isolé de l'huile d'olive vierge extra qui présente des propriétés anti-inflammatoires (Beauchamp *et al*, 2005). Selon ces mêmes auteurs, cette molécule, peut provoquer des irritations de la gorge à fortes doses et offre les mêmes caractéristiques que l'ibuprofène, anti-inflammatoire non stéroïdien. Malgré les différences structurales entre ces deux composés, ils agissent de la même façon en inhibant l'activité des cyclooxygénases COX-1 et COX-2. Aussi l'ingestion quotidienne de 50 g d'huile d'olive fournirait 200 microgrammes/L d'oléocanthal, soit l'équivalent de 10 % de la dose d'ibuprofène nécessaire pour calmer la douleur chez l'adulte (Beauchamp *et al*, 2005).

Schwingshackl *et al*, 2011 n'ont pas constaté d'effet d'intervention d'une alimentation riche en AGMI sur les taux de CRP. En contrepartie, plusieurs auteurs auraient observé une diminution de la CRP, de l'IL-6 et des molécules d'adhésion cellulaire avec un mode alimentaire de type méditerranéen riche en huile d'olive (Calder *et al*, 2011).

Dans un essai contrôlé randomisé à Naples, en Italie, 180 sujets souffrant d'un trouble métabolique ont été invités à suivre un régime alimentaire méditerranéen complété avec de l'huile d'olive. Après 2 ans, Il y a eu des réductions substantielles des marqueurs d'inflammation vasculaire systémique, y compris la protéine C réactive et les interleukines. Plus de 66% des sujets ont connu des réductions dans les facteurs de risque, de telle sorte qu'ils ne sont plus classés comme ayant un syndrome métabolique (Esposito *et al*, 2004).

Les polyphénols de l'huile d'olive vierge extra modulent la réponse inflammatoire notamment les interleukines (Wahle, 2004).

L'oleuropéine de l'HOVE et ses métabolites sont dotés de vertus antioxydantes et anti-inflammatoires. Ils pourraient ainsi limiter le stress oxydant, une perturbation métabolique associée à de nombreuses pathologies (Dai *et al*, 2010). Ce sont effectivement des piègeurs de radicaux libres et des chélateurs de métaux. Ainsi l'oleuropéine et le tyrosol inhibent l'oxydation des LDL in vitro (Visioli et Galli, 1994 ; Visioli *et al*, 2000). Coni *et al*. 2000 ont confirmé ces propriétés in vivo. Ils ont ainsi démontré que la consommation d'huile d'olive extra vierge par des lapins augmentait la résistance des LDL à l'oxydation ; l'effet étant exacerbé lorsque le régime était supplémenté en oleuropéine. Outre ces effets antioxydants, les composés phénoliques de l'huile d'olive exercent une activité anti-inflammatoire. In vitro,

l'hydroxytyrosol, ainsi que le tyrosol et l'oleuropéine dans une moindre mesure, peuvent inhiber la formation de leucotriène B4 ou LTB4 qui possède un rôle chimiotactique pour les leucocytes (macrophages, neutrophiles) sur les sites de l'inflammation en réduisant l'activité de la 5-lipoxygénase (De la Puerta *et al*, 1999). De plus, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine peuvent bloquer la flambée respiratoire des neutrophiles, phénomène à l'origine de la surproduction de radicaux libres lors de l'inflammation (Visioli *et al*, 1998). Sur un modèle d'inflammation induite par l'injection sous cutanée de carraghénane chez le rat, Martinez et Dominguez en 2001 ont mis en évidence une amélioration des paramètres de l'inflammation chez les animaux ayant consommé l'huile d'olive (contenant 200 mg/kg de polyphénols), par rapport à un régime contrôle à base d'huile de tournesol. Ces données ont été corroborées récemment par la démonstration de l'amélioration de la capacité anti-oxydante chez des personnes âgées institutionnalisées ayant reçu une alimentation enrichie en un extrait d'oleuropéine et de ses dérivés pendant six semaines (Oliveras-Lopez *et al*, 2013).

II.5.3 le fibrinogène

Le fibrinogène est une protéine tardive de l'inflammation, elle augmente à partir du 2^{ème} jour pour atteindre un maximum au 5^{ème} jour. La perméabilité accrue des capillaires permet la fuite des facteurs de coagulation dans les tissus. La coagulation sanguine est déclenchée et le fibrinogène finit par être converti en un épais réseau de filaments fibriniques insolubles, qui localise et piège les microbes envahisseurs, empêchant ainsi leur propagation. La synthèse de fibrinogène augmente à la suite d'un stress, au cours de la grossesse, lors d'une blessure ou après injection d'endotoxine, de prostaglandine ou d'hormone de croissance. Cette production accrue de fibrinogène est due à une autorégulation dont le mécanisme est à peine connu. Au cours de la phase aiguë de la réponse inflammatoire il y a transformation du fibrinogène en fibrine et activation du système fibrinolytique (Fuller, 1982).

Le dosage de fibrinogène est utilisé actuellement en pratique courante dans les laboratoires d'analyses cliniques pour mettre en évidence les cas d'inflammation. Ainsi, dans un état inflammatoire (infections, lymphomes, cancers, maladies rhumatoïdes), le taux de fibrinogène peut atteindre 6 à 10 mg/L (Baijot, 2006). Le fibrinogène est un marqueur spécifique de l'inflammation chez l'homme et aussi chez le rat (Engler, 1993).

D'après la [figure26](#), le taux de fibrinogène est élevé chez le groupe LEFNaCL en comparaison avec les groupes expérimentaux LEF150, LEF250 LEF300 et le groupe de référence LEFDiclo (P<0,001).

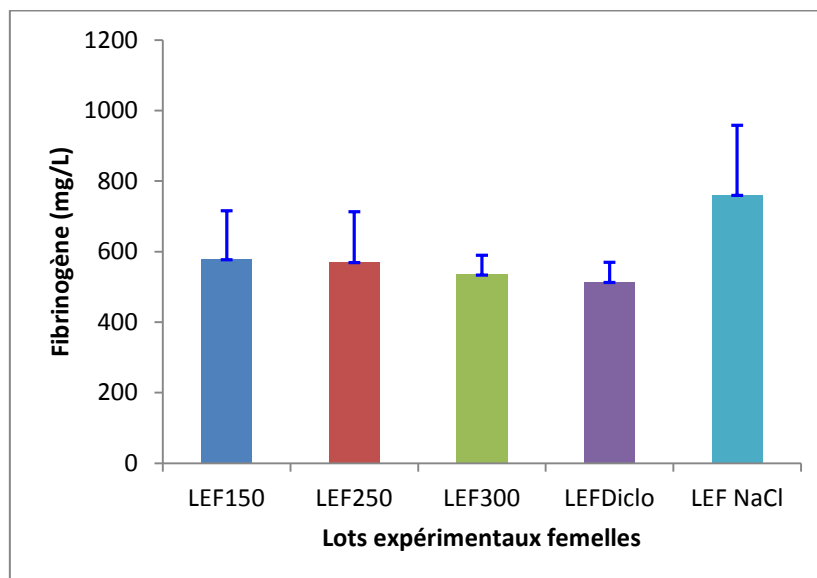


Figure 26 : Variations de fibrinogène chez les rats femelles

Les valeurs représentent les moyennes ± écart-types

(Les écart-types ont été multipliés par 10)

Cependant le taux de fibrinogène chez le lot LEF300 est diminué par rapport à celui du groupe témoin et les autres groupes expérimentaux LEF150 et LEF250 d'une part, d'une autre part la comparaison entre le groupe de référence qui a reçu le Diclofenac et celui de lot5 LEF300) ne révèle aucune différence significative, la comparaison entre le taux de fibrinogène entre les lots LEF150, LEF250, LEF300 ne montre aucune différence significative. En revanche le taux de fibrinogène est remarquablement diminué chez le lot LEFDiclo et le lot LEF300 en comparaison avec le lot LEFNaCL avec une différence hautement significative ($P < 0,001$), on outre la différence est non significative entre le lot LEFDiclo et LEF300, cela montre que HOVE exerce le même effet anti inflammatoire que ce lui de Diclofenc avec une différence non significative.

Selon la [figure 27](#) on remarque que taux de fibrinogène est diminué chez les lots LEM150, LEM250, LEM300 et LEMDiclo par rapport au lot LEMNaCL ($P < 0,001$), par contre aucune différence significative n'est révélée entre les lots LEM150, LEM250, LEM300. La différence est hautement significative en comparant le taux de fibrinogène chez le lot LEMNaCL et celui de lot LEM300, ce pendant la comparaison entre le taux de fibrinogène chez le lot LEMDiclo et celui de lot LEM300 n'a pas montré une différence significative. Le taux diminue de fibrinogène chez les lots ayant reçu les différentes doses

d'HOVE et le lot traité par le Diclofenac est le résultat d'un effet anti inflammatoire exercé par Diclofenac et HOVE. Ces résultats prouvent que l'HOVE exerce un effet anti inflammatoire similaire que celui de Diclofenac (un anti inflammatoire non stéroïdien).

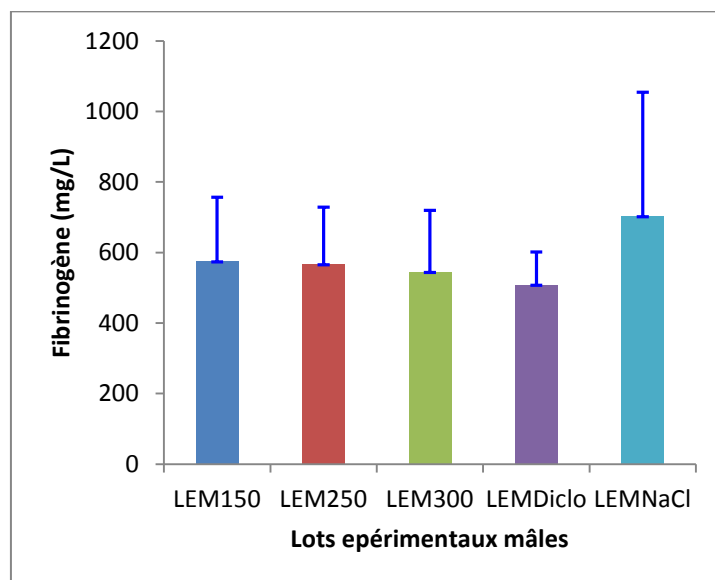


Figure 27 : Variations de fibrinogène chez les rats mâles

Les valeurs représentent les moyennes \pm écart-types

(Les écart-types sont multipliés par 10)

Nos résultats convergent avec de nombreuses études réalisées à travers le monde. Selon une étude menée par [Giffen et al, 2003](#) sur des rats Wistar ils ont montré que l'augmentation du taux de CRP entraîne une augmentation du taux de fibrinogène et en conclusion ils affirment que le fibrinogène est un marqueur d'inflammation très significatif. Nos résultats montrent une augmentation du fibrinogène lors de l'inflammation provoquée par l'injection de carragénine. Aussi l'utilisation d'HOVE a diminué le taux de fibrinogène chez les rats qui ont reçus les différentes doses de ce produit. Ces résultats convergent avec ceux de [Sanchez-Fidalgo et al, 2013](#) qui montrent qu'une supplémentation avec l'huile d'olive diminue l'expression des protéines pro inflammatoires hépatiques notamment le fibrinogène. L'oléocanthal identifiée dans l'huile d'olive agit de la même façon que l'Ibuprofène un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien et inhibe l'activité des enzymes cyclooxygénases (Cox 1 et Cox 2), impliquées dans la synthèse des prostaglandines, des médiateurs de l'inflammation participant à l'apparition et à l'entretien de la douleur. La

consommation de 50 grammes d'huile fraîchement pressée équivaut à environ 10% de la dose quotidienne d'Ibuprofène recommandé pour calmer la douleur chez l'adulte. De ce fait, si la consommation d'huile d'olive ne permet pas de soulager les maux de tête, les douleurs musculaires ou les douleurs dentaires, elle pourrait en revanche présenter les mêmes avantages à long terme que le recours à l'AINS de référence, par exemple dans la diminution du risque de certains cancers ([Daccache, 2011](#))

Outre les effets antioxydants, les composés phénoliques de l'huile d'olive exercent une activité anti-inflammatoire. In vitro, l'hydroxytyrosol, ainsi que le tyrosol, et l'oleuropéine dans une moindre mesure, peuvent inhiber la formation de leucotriène B4 en réduisant l'activité de la 5-lipoxygénase ([De la Puerta et al, 1999](#)). De plus, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine peuvent bloquer la flambée respiratoire des neutrophiles, phénomène à l'origine de la surproduction de radicaux libres lors de l'inflammation ([Visioli et al, 1998](#)).

Dans le cadre de l'exploration de l'effet biologique éventuel des produits de l'olivier, [Keiler et al. 2013](#) ont testé l'impact d'un extrait polyphénolique d'huile d'olive vierge extra, administré à la dose de 800 mg/kg de régime chez la rate ovariectomisée, sans toutefois pouvoir mettre en exergue une quelconque efficacité sur le squelette. À l'inverse, dans un modèle expérimental d'ostéoporose sénile associant castration et inflammation, [Puel et al. 2006](#) ont démontré que la consommation d'oleuropéine (ester formé d'une molécule d'hydroxytyrosol et d'acide élénolique), à la dose de 0,015 % dans le régime alimentaire, permet une protection efficace du squelette contre les effets délétères de l'inflammation (cumulés à ceux induits par la carence oestrogénique), principalement en améliorant les marqueurs de l'inflammation tels que les leucocytes et la concentration plasmatique en alpha-1-glycoprotéine. D'autre part, l'hydrolyse de l'oleuropéine libère l'hydroxytyrosol et l'acide élénolique. Parallèlement, le tyrosol, quant à lui, provient de la dégradation du ligstroside. [Puel et al, 2008](#) ont étudié le potentiel ostéoprotecteur de ces métabolites (tyrosol, hydroxytyrosol), in vivo et démontré leur efficacité. Il en est de même pour les travaux publiés par [Hagiwara et al, 2011](#) qui confirment l'effet préventif de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol, chez la souris ovariectomisée. La consommation d'un repas riche en composés phénoliques de l'huile d'olive a amélioré la vasodilatation microvasculaire endothélium-dépendante pendant les 4 premières heures de la période postprandiale chez des volontaires hypercholestérolémiques et régule la concentration plasmatique en marqueurs d'inflammation ([Ruiz-Canela et al, 2011](#)).

En ce qui concerne l'inflammation de cartilage, [Gong et al, 2012](#) ont démontré l'efficacité, notamment sur le score histologique, d'un extrait de feuilles d'olivier (source d'oleuropéine) dans un modèle d'arthrose induite par des injections de carragénine et de kaolin.

Enfin, [Impellizzeri et al, 2011](#) ont analysé l'impact de l'administration d'oleuropéine sous sa forme aglycone sur la modulation de la réponse inflammatoire, après induction d'une arthrose par injection de collagène chez des souris. La molécule a permis d'améliorer les signes cliniques, ainsi que les paramètres histologiques. Ceci s'explique notamment par une réduction des dommages oxydatifs et des taux plasmatiques en cytokines pro-inflammatoires.

Conclusion générale

L'huile d'olive fait partie de la culture méditerranéenne, tant d'un point de vue historique que d'un point de vue alimentaire. De l'entrée au dessert, l'huile d'olive est employée par de grands chefs et se retrouve dans nos cuisines pour ses propriétés organoleptiques, nutritionnelles mais également thérapeutiques. En effet, ce que subodorait déjà la médecine antique de façon empirique est confirmé aujourd'hui par les études scientifiques. Leurs résultats ont montré les vertus bénéfiques de l'huile d'olive dans des domaines variés de la santé.

L'intérêt donné à l'huile d'olive porte essentiellement sur ses caractéristiques organoleptiques et sa composition biochimique. La connaissance de notre patrimoine variétal, sa bonne gestion et son exploitation pourront contribuer à améliorer la filière oléicole en Algérie.

L'huile d'olive se caractérise par sa composition en acide oléique (représentant 65 à 80 % de la fraction lipidique) et en composants mineurs, notamment par des teneurs non négligeables en antioxydants, ce qui en fait un corps gras exceptionnel. Elle est tout à la fois un aliment et un "médicament", le rôle de l'alimentation ayant un intérêt indiscutable en médecine préventive.

Cette étude a porté sur la caractérisation, physicochimique et organoleptique de l'huile d'olive vierge extra de la région de Sidi Bel-Abbes (Nord ouest d'Algérie) et la mise en évidence de son effet immunomodulateur et de ses propriétés anti inflammatoires sur les rats Wistar mâles et femelles. Les résultats obtenus montrent que l'huile d'olive vierge extra présente des caractéristiques organoleptiques excellentes (Intensité fruitée: 4,8 et défaut majeur : néant) et une richesse en acide oléique (80%). Cette huile présente également, un taux élevé de polyphénols (280mg/kg). Les analyses physicochimiques révèlent des valeurs de $1,468 \pm 0,006$ pour l'indice de réfraction, $0,916 \pm 0,002$ pour la densité à 20°C, $184 \pm 1,00$ pour l'indice de saponification, $4 \pm 0,635$ meq d'O₂/Kg d'huile pour l'indice de peroxyde, $0,1 \pm 0,005\%$ d'acide oléique pour l'acidité libre et $280 \pm 5,437$ mg Acide Gallique/Kg d'huile pour les polyphénols totaux. Ces résultats confirment la conformité de notre huile d'olive vierge extra aux normes du Codex Alimentarius et aux normes du conseil oléicole international.

La mise en évidence de l'effet immunomodulateur de l'huile d'olive vierge extra chez les rats Wistar males et femelles suite à l'immunisation par l'ovalbumine et l'adjuvant de Freund, montre que le taux des immunoglobulines G anti ovalbumine chez les rats femelles est supérieur à celui des rats mâles révélant ainsi que le sexe femelle chez les rats, présente une réponse immunitaire humorale plus intense et plus significative que celle des rats de sexe mâle.

Les résultats montrent aussi une production très faible en anticorps anti-OVA pour les femelles expérimentales ayant reçu de l'ovalbumine, de l'huile d'olive et de l'adjuvant de Freund, comparées aux femelles témoins recevant seulement de l'ovalbumine et l'adjuvant de Freund. Le même résultat est constaté chez les rats mâles expérimentaux comparés au groupe témoin. En définitive, ces différents résultats sont en faveur d'un effet modulateur du système immunitaire par l'administration de l'HOVE. Cet effet est corroboré par de nombreux travaux qui ont montré les bienfaits de l'huile d'olive sur le système immunitaire. En fait, les acides gras contenus dans l'huile d'olive permettent de diminuer la prolifération des lymphocytes B et T due aux éléments mitogènes.

L'évaluation de l'effet anti inflammatoire de l'huile d'olive vierge extra a été étudié chez les rats Wistar males et femelles par le dénombrement des globules blancs, le dosage de la protéine C-Réactive (CRP) et le fibrinogène. Cette étude a montré que l'huile d'olive vierge extra exerce un effet anti inflammatoire qui se traduit par une diminution du nombre de globules blancs, du taux de CRP et du fibrinogène chez les groupes expérimentaux traités par différentes doses d'HOVE par rapport aux groupes de rats témoin avec une différence hautement significative ($p < 0,001$). La comparaison entre l'effet anti inflammatoire du Diclofenac (anti inflammatoire non stéroïdien) et celui de l'huile d'olive vierge extra a montré que cette dernière exerce un effet anti inflammatoire comparable avec une légère différence nous permettant de confirmer que l'huile d'olive vierge extra possède à concentration élevée un effet anti inflammatoire similaire à celui du Diclofenac. Ainsi, le régime méditerranéen, en tant que vecteur d'acides gras et de composés phénoliques dans des proportions suffisantes peut permettre de limiter l'apparition des maladies cardiovasculaires en agissant favorablement sur les différents organes de l'appareil digestif et exerce un effet protecteur vis-à-vis de l'incidence de certains cancers, notamment des cancers du sein et du côlon. Il favorise la minéralisation et le développement des os, prévient l'apparition de l'ostéoporose et réduit le risque du développement de la polyarthrite rhumatoïde. Il est probable que les mécanismes d'action mis en jeu par les molécules d'huile d'olive vierge extra soient

beaucoup plus complexes que de simples phénomènes d'inhibition des processus oxydatifs et inflammatoires et qu'ils impliquent notamment une modulation de multiples voies de signalisation moléculaires. Toutefois, les données sont actuellement manquantes. Il n'en demeure pas moins que le régime méditerranéen, en raison de sa diversité et de sa richesse en micronutriments, offre un potentiel intéressant, déjà reconnu d'ailleurs pour d'autres cibles biologiques. Dans ce contexte, l'huile d'olive connue pour sa richesse en acides gras mono-insaturés et en phytomicronutriments variés incluant les composés polyphénoliques, peut être considérée comme un aliment fonctionnel à part entière. Les résultats de cette étude contribuent à la valorisation de notre huile d'olive vierge extra locale et ouvrent les portes pour d'autres études plus approfondies lui conférant toutes les vertus nutritionnelles et thérapeutiques dues à son exceptionnelle composition.

L'étude de ce produit du terroir permet l'ouverture d'autres voies d'exploration et de valorisation de divers autres produits locaux comme les miels, les plantes alimentaires, médicinales, condimentaires et aromatiques.

Références bibliographiques

Abaza L., Msallem M., Daoud D., Zarrouk M. (2002) Caractérisation des huiles de sept variétés d'olivier tunisiennes. *Oléagineux, Corps Gras Lipides*. 9: 174-179.

Alain K (2010) Manuel des corps gras. Edition: Tec et Doc P 190.

Alcaraz M.J., Jimenez, M.J. (1988) Flavonoïde and anti-inflammatory agent. *Fitoterapia* 59: 25-38.

Aldaz-Carroll (2008) Les techniques immunologiques basées sur l'interaction Ag/Ac

Alonso A, Ruiz-Gutierrez V. (2006) Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure, epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public Health Nutr* 9 : 251-257.

Arbault P., Daussant J. (2005) Méthodes d'analyses immunochimiques pour le contrôle de qualité dans les IAA. *Edition Lavoisier* : 409.

Andréawill (1997) 8 semaines pour arriver à une santé convenable. American livre.

Baijot S (2006) Cours de biologie clinique, HENaC 2005-2006.

Barton G. M. (2008) A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, 118, 413-420.

Bhattacharyya S., Dudeja P.K., and Tobacman J.K. (2010) Tumor necrosis factor alpha-induced inflammation is increased but apoptosis is inhibited by common food additive carrageenan. *Journal of Biological Chemistry* 285: 39511-22.

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.

Beauchamp G., Keast R., Morel D. (2005) Photochemistry; Ibuprofen-like Activity in Extra Virgin Olive Oil. *Nature* 437: 45-46.

Beauchemin R. (2011) l'huile d'olive. *Edition Masson*, Paris, pp. 116

Blekas G., Psomiadou E., Tsimidou M. (2002) On the Importance of Total Polar Phenols to Monitor the Stability of Greek Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 340-346.

BenTekaya I., Hassouna M. (2005) Etude de la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge extra tunisienne au cours de son stockage. *OCL* 12, 447-454.

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

- Bermudez B., Lopez S., Ortega A., Varela L.M., Pacheco Y.M., Abia R., Muriana F.J. (2011) Oleic Acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Curr Pharm Des.* 17:831-43.
- Besançon P., Debosque S., Delpuech F., Descomps B., Gerber M., Léger J.L., Padilla M., Puygrenier M., Ferro-Luzzi A. (2000) Alimentation méditerranéenne et santé : actualités et perspectives. Edition Montrouge France : *John Libbey Eurotext*, 176 p.
- Bianco A., Chiacchio M., Grassi D. (2006) Phenolic Components of *Olea europaea*: Isolation of New Tyrosol and Hydroxytyrosol Derivatives. *Food Chem.* 95: 562-565.
- Bilici D., Akpinar E., Kiziltunç A. (2002) Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. *Pharmacol Res.* 46:133–139.
- Biomnis précis de biopathologie d'analyses médicales spécialisées 2012 Rédigé par Jonathan Evans, MD. Publié par McKesson Provider Technologies
- Blain Jouzeau., Netter, Jeandel. (2000) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev Méd Interne*, 21, 978-88.
- Bottani D. (1994) Le guide des routes de l'olivier. Edition *La Manufacture*, 116p
- Brenes M., Hidalgo F., Garcia A. (2000) Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, Two New Phenolic Compounds Identified in Olive Oil. *JAACS* 77:715-720.
- Borthakur A., Bhattacharyya S., Anbazhagan A. N., Kumar A., Dudeja P.K. and Tobacman J. K. (2012) Prolongation of carrageenan-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NFκB-BCL10 loop. *Biochimica and Biophysica Acta* 1822: 1300-1307.
- Buil-Cosiales P., Irimia P., Berrade N. (2008) Carotid intima-media thickness is inversely associated with olive oil consumption. *Atherosclerosis* 196:742–748.
- Bruneton J. (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} édition, Edition *Tec & doc*, 1120p
- Burns R (2005) Immunization Strategies for Antibody Production. Immunochemical protocols Totowa: *Humana Press*, 01-11.
- Daccache A., Lion C., Sibille N., Gerard M., Slomianny C., Lippens G., Cotelle P. (2011) Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry International* 58:700-707.
- Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K.(2011) Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *The British journal of nutrition.*106: S5-78
- Charbonnier A. (1996) L'huile d'olive. Aliment-Santé-Cœur-Vaisseaux-Os-Digestion Editions *Frison-Roche*, 282p.

- Charles Guy (2008) *Asthme lergies chez l'enfant et l'adolescent*. Masson, Paris, 213.
- Charles N., Serhan Peter A, Ward Derek W., Gilroy. (2010) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, 2-3.
- Campbell, Sanchez-Villegas A, Bes-Rastrollo M. (2003) Adherence to a Mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study. *the SUN cohort* 30 (2) : P 350.
- Camargo A., Ruano J., Fernandez J.M., Parnell L.D., Jimenez A., Santos-Gonzalez M., Marin C., Perez-Martinez P., Uceda M., Lopez-Miranda J., Perez-Jimenez F. (2010) Gene expression changes in mononuclear cells from patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. *BMC Genomics*. 11:253.
- Carluccio M., Siculella L., Ancora M. (2003) Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:622–629.
- Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Gallina- Toschi T., Cantarelli C. (1961) Sui polifenoli presenti nella drupa e nell'olio di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse*. 38: 69–72.
- Caputo A.C., Scacchia F., Pelagagge P.M. (2003) disposal of byproducts in olive oil industry: waste to-energy solutions, *app therm eng* 23: 197-214.
- Codex Alimentarius (2015) Norme pour les huiles d'olive et les huiles de grignons d'olive. *CODEX STAN 33-1981*.
- Communauté européenne le 24 Novembre 1986 (86/609/CEE).
- Conseil Oléicole International (2014) Production mondiale d'huile d'olive.
- Conseil Oléicole International (2010) Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive, T.15/NC n° 3/Rév. 5.
- COI (2015) Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive COI/T.15/NC n° 3/rév. 8.
- Conseil Oléicole International (2015) Analyse sensorielle de l'huile d'olive: méthode d'évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge. COI-T.20, Doc.n°15, Rev.2. Septembre 2015.
- Conseil Oléicole International (2015) L'huile d'olive et l'appareil digestif.
- Conseil oléicole international (2015) COI/T.15/NC n° 3/Rév. 8 février 2015.
- Conseil Oléicole International (2009) : Production mondiale d'huile d'olive.
- Conseil Oléicole International (2010): Analyse sensorielle de l'huile d'olive: méthode d'évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge. COI-T.20, Doc.n°15, Rev.2. Septembre 2010.

Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) (2002) lignes directrices: production d'anticorps.

Conférence des Nations Unies sur le Commerce Et le Développement (2009) Accord international de 2009 sur l'huile d'olive et les olives de table. Nations Unies TD/OLIVE.OIL.10/6.

Coni E., D. I., Benedetto R., D. I., Pasquale M. (2000) Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*; 35:45-54.

Conseil Oléicole International (2010) Analyse sensorielle de l'huile d'olive: méthode d'évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge. COI-T.20, Doc.n°15, Rev.2. Septembre 2010.

Corona G., Deiana M., Incani A. (2007) Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem Biophys Res Commun* 362:606–11.

CRL (1982) Baseline haematology and clinical chemistry values for Charles River Wistar rats CRL:(WI)BR as a function of sex and age -CRL Technical Bulletin[online] Vol 1, Num 2.

Covas M.I., De la Torre K. (2009) Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic Biol Med*, February 15; 40: P 608-16.

Dai J., Ziegler T.R., Bostick R.M., Manatunga A.K., Jones D.P, Goldberg J. (2010) High habitual dietary alpha-linolenic acid intake is associated with decreased plasma soluble interleukin-6 receptor concentrations in male twins. *The American journal of clinical nutrition*,92:177-85. (1):45-54.

D'Aygalliers P. (2010) L'Olivier Et L'Huile D'Olive : Histoire Naturelle de L'Olivier, Culture de L'Olivier, PR Paration, Falsifications, Et Usages Des Produits, : *Warren Press, Paris*, 368.

De la Puerta R., Ruiz-Gutierrez V., Houtt J. R.. (1999) Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.* 57: 445-9.

Dell'Agli M., Fagnani R., Mitro N. (2006) Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *J Agric Food Chem.* 54: 3259–3264.

Della Loggia A., Tubaro A., Dri P., Zilli, C., Del Negro P. (1968) The role of flavonoids in the anti-inflammatory activity of Chamomilla recutita. *Clin and Biol Res* 213: 481-486.

Di Rosa M (1972) Biological properties of carrageenan. *J Pharma and Pharmacol* 24: 89-102.

Dupin H., Cuq J. L. (1992) Alimentation et nutrition humaines. Éd: ESF, Paris, 887-900
Meta-analysis of 60 Controlled Trials. *Am J Clin Nutr.* 77: 1146-1155.

- Edwin N Frankel .(2011) Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem*
- Engler R. (1993) Protéines de la réaction inflammatoire. *Veterinary Research, BioMed Central*; 24 (4):.337-343
- Estruch R., Martinez-Gonzalez M., Corella D. (2006) Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors. *Ann Int Med.* 145:1–11.
- Espinosa E., Chillet P. (2006) l'immunologie. *Ed: Ellipses*, 135-153.
- Esposito K., Marfella R., Ciotola M. (2004) Effect of a Mediterranean style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA.* 292:1440–1446.
- Fernndez-Gutierrez A (2005) Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* 28: 837 – 858
- Fernandez. (2002) Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* November 20; 337(21): P1491-9.
- Folin O., Ciocalteu V. (1927) tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J.Biol. Chem.* 73: 627-650.
- Fito M., Cladellas M., De la Torre R. (2008) Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients : a randomized, crossover controlled trial. *Eur J Clin Nutr*; 62:570-574.
- Fuller G.M., Ritchie D.G.(1 982)A regulatory pathway for fibrinogen biosynthesis involving an indirect feedback loop. *Ann NY Acad Sei*; 389: 308-2.
- Gasull A., Landa M.C., Frago N., Tres A. (2000) Diet and the risk of breast cancer in Spain. *J-Nutr.* 3(4): P 313-20.
- Geelen A, Brouwer I A, Schouten E G, Kluft C, Katan M B, Zock PL. (2004) Intake of n-3 fatty acids from fish does not lower serum concentrations of C-reactive protein in healthy subjects. *European journal of clinical nutrition*;58(10):1440-2.
- Giffen P. S., Turton J., Andrews C. M, Barrett P., Clarke C.J, Fung K. W., Munday M.R, Roman I.F., Smyth R., Walshe K., York M. J.(2003) Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Jul*; 77(7):392-402. *Epub* 2003 Mar 22.
- Gong D., Geng C., Jiang L., Wang L., Yoshimura H., Zhong L.(2012) Mechanisms of olive leaf extract-ameliorated rat arthritis caused by kaolin and carrageenan. *Phytother. Res.* 26 : 397–402.
- Gong D., Geng C., Jiang L., Wang L., Yoshimuram H., Zhong L.(2011) .Olive leaf extract facilitates healing of experimental cartilaginous injuries in rabbits. *J. Med. Food.* 14: 268–275.

Grossman C J. (1989) Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis, *Journal of Steroid Biochemistry*, 34, n.1-6 , 241-251.

Gutiérrez F.,Arnaud T.,Garrido A.(2001). Contribution of polyphenols to the oxidative stability of virgin olive oil. *Journal Sciences. Food Agriculture*. 81, 1-8.

Gutfinger T (1981) Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 58: 966-968.

Hagiwara K.,Goto T.,Araki M.,Miyazaki H.,Hagiwara H.(2011) Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur. J. Pharm.* 662 : 78–84.

Hamdi K., Hamdi., Castellon R. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 334 : 769 778.

Hammer S .M (2005) Clinical practice. Management of newly diagnosed HIV infection. *N Engl J Med*; 353: 1702–1710.

Han J., Talorete T.P., Yamada P., Isoda H. (2009) Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*. 59:45–53.

Haroun Y (2009) Les miracles du Coran, ED : IQRA, Paris, P410.

Harborne J. B., Dey P. M. (1989) Methods in Plant Biochemistry. *Academic Press, London (UK)*.

Huang C L, Sumpio B E. (2008) Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *J Am Coll Surg*. 207 :407–16.

Impellizzeri D., Esposito E., Mazzon E. (2011) Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339 : 859–869.

ISO 6320 (2010) Fats of plant and animal – Determination of refractive index.

ISO 660: 2009 (2014) Fats of plant and animal - Determination of acid value and acidity.

ISO 3960: 2007 (2010) Fats of plant and animal - Determination of peroxide value - Determination with iodometric stop point.

ISO 3657: 2013 (2013) Fats of plant and animal - Determination of saponification value.

ISO 12966-1: 2014 (2014) Fats of plant and animal - gas chromatography of methyl esters of fatty acids - Part 1: Guidelines for the modern gas phase chromatography of methyl esters of fatty acids.

Jeffery N. M., Yaqoob P., Newsholme E. A., Calder P.C. (1997) The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions are due to oleic acid. *Ann. Nutr. Metab.* 40, P 71–80.

Jeffery N. M., Cortina M., Newsholme E. A., Calder P. C. (1997) Effects of variations in the proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.* 77, P 805–823.

Kantari C., Pederzoli-Ribeil M., Witko-Sarsat V.(2008) The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib. Microbiol.* 15, 118-146.

Karlsen A L., Retterstol P., Laake. (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of proinflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr* 137: 1951-1954.

Karleskind A (1992) Manuel des corps gras, *Ed : Tec Doc* :1312-1324.

Keiler A. M., Zierau O., Bernhardt R.(2013) Impact of a functionalized olive oil extract on the uterus and the bone in a model of postmenopausal osteoporosis. *Eur. J. Nutr.* 53 : 1073-81

Koenig W (2004) fibrinogen in cardiovascular disease. Update from haemost, - 601-609

Kolympari (2010) Dietary lipids and risk of autoimmune disease. Ed: *Clin Immunol Immunopathol*; 72: P193–197.

Kusher (1982) the phenomenon of the acute phase response ,*Ann NY Acad Sci* 82,39-48.

Lambert M (1993) L'olivier et la préparation des olives en Provence, *Collection Campanile*: 63.

Lee-Huang S., Zhang, L., Huang ,P.L., Chang ,Y.T. (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.

Lee-Huang P (2007) Discovery of Small-Molecule HIV-1 Fusion and Integrase Inhibitors Oleuropein and Hydroxytyrosol: I. Fusion Inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 23; 354(4): 872–878.

Liorente – Cortes R.,Estruch M P., Mena E., Ros M. A., Gonzales M., Fitò R. M., Lamuela-Raventós L., Badimon.(2009) “Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk”, *Atherosclerosis, Ann Int Med.* 145:1–11.

López-Miranda J., Pérez-Jiménez F., Ros E . (2008) Olive oil and health : summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain). *Nutr.Metab. Cardiovasc. Dis.* 20 : 284–294.

Lucas L., Russell A., Keast R.(2011)Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr Pharm Design.*;17:754-768.

Male D., Brostoff J., Roth D. B., Roitt Y. (2007) Immunologie Ed: Elsevier, 7ème édition, Paris-France, 78.

Maestro-Duran R., Leao-Cabello R., Ruiz-Gutierrez V., Fiestas P., Vasquez-Roncera A. (1994) *Grasas y Aceites*. 45 332.

Martinez-Dominguez E., de la Puerta R., Ruiz-Gutierrez V. (2001) Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. *Inflamm. Res.* 50 :102–106.

Manchado Cheynier (2006) Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 1981; 58: 966-8.

Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J. F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion, *immunochemistry*. PergImamon Press, Vol.2, n° 3, 235-254.

Manuel A., de Pablo., María A., Puertollano .,Gerardo Álvarez de Cienfuegos .(2004) Olive oil and immune system functions: potential involvement in immunonutrition, Ed: *Grasas y Aceites*, 55. Fasc. 1, P42-51.

Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428-435.

Menard G., Bentue-Ferrer D., Cillard J., Allain H. (1995) Pharmacologie des prostaglandines. *Angéiologie* ; 47 : 47-52.

Menendez J. A., Vellon L., Colomer R., Lupu R.(2005) Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin™) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Ann Oncol*; 16(3):359-71.

Mensink R.P., Zock P.L., Kester A.D. (2003) Effects of Dietary Fatty Acids and Carbohydrates on the Ratio of Serum Total to HDL Cholesterol and on Serum Lipids and Apolipoproteins: a Meta-analysis of 60 Controlled Trials. *Am J Clin Nutr.* 77: 1146-1155.

Michel S (2010) Les guides de prévention AG2R : Agir pour lutter contre diabète, Ed : Centre européen d'étude du Diabète, Paris, 1-12.

Ministère de l'agriculture et de développement (2015).

Ministère de l'agriculture et de développement rural production de l'huile d'olive compagne (2014- 2015).

Montedoro G.F., Garofolo L., Bertuccioli M. (1986) Factors Shaping the Quality Characteristics of an Olive Oil. *Industria Alimentari.* 25 : 549-555.

Morales M., Tsimidou M., Harwood J., Aparicio R. (2002) Handbook of Olive Oil. Gainesburg. *Aspen Publishers*,: 393-438.

- Montedoro G., Servili N., Baldioli M., Miniati E. (1992) Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:1571-1576.
- Monier J.C (1979) Adjuvants de l'immunité et immunostimulants, *d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 19, 2 89-94.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846-852.
- Nantz M. P, C A., Rowe C., Nieves J. R. (2006). Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate. *J Nutr* 136: 2606-2610.
- Nelson T. L., Stevens J. R, Hickey M. S. (2007) Inflammatory markers are not altered by an eight week dietary alpha-linolenic acid intervention in healthy abdominally obese adult males and females. *Cytokine* ;38(2):101-6.
- Nicolas Jean-François., Florence Cousin., Jean Thivolet (2001) Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance lergie. *John Libbey Eurotext*, 2001, 55-58.
- Niubel- Diaz., Padilla,Wim. , Bleeker K,VonneY., ,Lubbers,Gemma M ., Rigter M, Gerard J., van Mierlo,Mohamed R, Daha, Erik Hack (2003) C rat C-reactive protein activates the analogous complement system. *Immunology Aug*; 109(4): 564–571.
- Nunomura W., Takakuwa Y., Higashi T. (1994) Changes in serum concentration and mRNA level of rat C-reactive protein. *Biochim Biophys Acta.*;1227:74–8.
- Oliveras-López M.J., Molina J .J., Mir M .V., Rey E. F., Martín F., de la Serrana H. L. (2013) Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 57 : 234–242.
- Ollivier D., Pinatel C., Dupuy N., Guère M., Artaud J. (2007) Caractérisations sensorielles et chimiques d'huiles d'olive vierges de six AOC françaises . *Oléagineux, Corps Gras, Lipides.* 14, 2, 116-129.
- Ollivier D., Boubault E., Pinatel C., Souillol S., Guère M., Artaud J. 2004. Analyse de la fraction phénolique des huiles d'olive vierges. J. Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique, N.965, p: 169 - 19
- Organisme officiel de l'oléiculture française (2015).
- Organisation Mondiale de la Santé (2009) Les bienfaits d'huile d'olive sur l'intestin.
- Organisation internationale de standardisation 661 (2003) Corps gras d'origines animale et végétale : Préparation de l'échantillon pour essai.
- Owen R w, Giacosa A, Hullc W E, Haubner R, Spiegelhaldera B, Bartscha H. (2000) *European Journal of Cancer* 36; 1235-47.

Owen RW. (2004): Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*, August; 13(4):319-26.

Owen R. W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Wurtele G., Spiegelhalder B, Bartsch, H. (2000) Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 1, 107–112.P 1-4.

Pagnol J., Rey-Billeton L.(2002) L'huile d'olive. *Edition Aubanel*, 159.

Papadopoulos G., Boskou D. (1991) Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society.* 68 : 669–671.

Paraf A., Geptre. (2001) L'immunoanalyses pour l'agriculture et l'alimentation. Edition IRNA.

Parmentier (2008) L'huile d'olive "vierge extra " : Caractéristiques organoleptiques et vertus thérapeutiques, P 12-19.

Perona J. S, Canizares J., Montero E., Sanchez-Dominiguez J. M., Catala V, Ruiz-Gutierrez V. (2004) Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects. *Clin. Nutr.* 23 (5), 1113–1121.

Pelikan (2005) Mediterranean diets: historical and research overview. Ed : *Am J Clin Nutr*; 61;1313–20.

Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N.,Montedoro G .F., Galli C. (1995) "Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of *olive oil*". *Thrombosis Research* 78 (2): 151–60.

Poggi C (2011) Maladies auto-immunes et conseils alimentaires : Neuilly-sur-Seine, Ed : *Cabinet de nutrition et diététique*, 1-8.

Polese J. M (2005) La culture de l'olivier, Ed : *ARTEMIS*, 63-68.

Protocole de production des anticorps polyclonaux chez les rats www.agro-bio. (2010).

Puel C., Mardon J., Agalias A.(2008) Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *J. Agric. Food. Chem.* 56 : 9417–9422.

Psomiadou E., Karakostas K., Blekas G. (2003). Proposed Parameters for Monitoring Quality of Virgin Olive Oil (Koroneiki cv). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105: 403-408.

Puertollano M. A. (2010) Significance of olive oil in the host immune resistance to infection. *The Br. J. Nutr.*, 98 Suppl 1: S54-58.

Puertollano M. A., Puertollano E., Ruiz-Bravo A., Jimenez-Valera M., de Pablo M.A, Alvarez de Cienfuegos G. (2004) Changes in the immune functions and susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection in mice fed dietary lipids. *Immunol. Cell Biol.* 82, P 370–376.

- Puel C., Mathey J., Agalias A . (2006) Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol in an ovariectomy/ inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clin. Nutr.* 25 : 859–868.
- Qi L., Van Dam R.. M., Whole-Grain. (2006) Bran, and Cereal Fiber Intakes and Markers of Systemic Inflammation in Diabetic Women. *Diabetes Care*, February 1, 29(2), 207 - 211.
- Reto M., Almeida C., Rocha J., Sepodes B., Figueira M. E. (2014) Green Tea (*Camellia sinensis*): Hypocholesterolemic Effects in Humans and Anti-Inflammatory Effects in Animal. *Pharmacology & Pharmacy* 5: 1113-1118.
- Revillard J .P (2001) Immunologie, 4^{ème} édition, Ed : *Boeck université.* - 600 pages
- Riccardi G., Giacco R., Rivellese. A. (2004) Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*; 23: 447-56.
- Rozier M (2010) Les variétés françaises d'olivier et leurs terres d'accueil. Nîmes, Lacour.
- Ruiz-Canela M., Martínez-González M .A. (2011) Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas.* 68: 245–250.
- Russel , Culter (2008) L'encyclopédie mondiale des arbres : Classification botanique de l'olivier.
- Ruiz-Gutierrez V., Juan M. E, Cert A., Planas J. M. (2000) Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC. *Analytical Chemistry.* 72: 4458–4461.
- Ryan D., Robards .K. (1998) Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31R–44R.
- Salvador M. D., Arande F., Gomez-Alonso S., Fregapane. G. (2007) Cornicabra virgin olive oil A study of five successive crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chem* , 74 ,267-274.
- Salas-Salvado J. J., Fernandez-Ballart E. Ros. (2008) Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial." *Arch Intern Med* 168: 2449-2458.
- Sánchez-Fidalgo S., Cárdeno A., Sánchez-Hidalgo M., Aparicio-Soto M, Alarcón de la Lastra C (2013) Dietary extra virgin olive oil poly-phenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24:1401–1413.
- Scipioni R.,L,diters R.W., Myers W. R., Hart S. M. (1997) Clinical and clinicopathological assessment of serial phlebotomy in the Sprague-Dawley rat-*Lab.Anim. Sci*, 47, 3, 293-299.
- Schwingshackl L., Strasser B., Hoffmann. G.(2011) Effects of monounsaturated fatty acids on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Annals of nutrition & metabolism* ;59(2-4): 176-86. Epub 2011/12/07.

Sebbagha N., Cruciani-Guglielmacci C., Oualib F., Erthault M .F., Rouchb C., Chabane Saria D., Magnanb C. (2009) Comparative effects of Citrullus colocynthis, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes and Metabolism* :35, Issue 3, P 178-184.

Stark A. H, Kossoy G., Zusman I., Yarden G., Madar. Z. (2004) Olive oil consumption during pregnancy and lactation in rats influences, *Nutr. Rev* 60, P 170-176.

Teeter T., Franciscus A.(2004) Comment interpréter un rapport de laboratoire : notions élémentaires. HCSP Publications., www.hcvadvo.org . 28 07 2010.

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. (2005) The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*. 18 (1) 98-112.

Vaerman J. P., Lebacq-Verhayden A .M., Scolari L., Heremans J. F. (1968) Further studies on single radial immunodiffusion-II The reversed system: Diffusion of antibodies in antigen-containing gels, *Immunochemistry*, Vol. 6, n°2, 287-293.

Vaerman J .P., Lebacq-Verhayden A. M, Scolari L., Heremans J F, (1969) Further studies on single radial immunodiffusion-I Direct proportionality between area of precipitate and reciprocal of antibody concentration, *Immunochemistry*, Vol. 6, n°2, 279-285.

Visioli F, Galli C. (1994) Oleuropein Protects Low-Density-Lipoprotein from Oxidation. *Life Sci*. 55 : 1965–1971.

Visioli F, Caruso D, Galli C, Sala A. (2000) Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans.*Biochem Biophys. Res. Commun*. 278 : 797–799.

Visioli F., Bellomo G., Galli C. (1998) Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Bioch. Bioph. Res. Commun*. 247 : 60–64.

Visioli F., Galli C. (1998) Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J. Agric. Food Chem*. 46, 4292–4296.

Volanakis J.E (2001) Human C-reactive protein : Expression, structure and function. *Mol Immunol*; 38 , 189-97.

Wahle K.W., Caruso D., Ochoa J. J., Quiles J. L. (2004) Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids*; 39:1223-31

Weil A (2005) Healthy Aging : A lifelong guide to your physical and spiritual well-being. Éditions Knopf. New York, P 1-5.

Weiss J., Taylor G. R., zimmermann F., Nebendahl k.(2000) Collection of body fluids- In: krinke,G.J.- *The laboratory Rat, The handbook of experimental Animal*-Academic press-, Chap 25, 485-495.

Wolfensohn S., Lloyd M.(2003) humane methods of killing. In Wolfensohn S ,and Lloyd M,Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare ,3rd edition, *United States of America*,74-84.

Witztum J. L., Steinberg D. (2001) The Oxidative Modification Hypothesis of Atherosclerosis: Does it Hold for Humans? *Trends Cardiovasc Med.* 11: 93-102.

Wright J .R., Yates A J., Shah N T., Thiber T.P.(1983)Hematological characteristics of the BB Wistar rat- *Veterinary Clinical Pathology* , 12, 1, 9-13.

Yaqoob P., Calder P. (1995) Effect of Dietary Lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophage. *Cell Immunol*; 163:120–8.

Yaqoob, P., Knapper ,J.A., Webb, D.H.,Williams ,C.M., Newsholme, E.A., Calder, P.C. (1998) Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J., Clin Nutr*; 67: P 129–35.

Yaqoob P., Newsholme E .A., Calder P.C. (1994) Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett*; 41: P 241–7.

Zoubir Sahli (2009) Produits de terroir et développement local en Algérie Cas des zones rurales de montagnes et de piémonts Options méditerranéennes, A n°89.

<http://www.drweil.com/drw/u/QAA401181/Is-Carrageenan-Safe.html> Consulté le 12.3.2016

http://www.criver.com/techdocs/82oct_tb/t82tab01.htm Consulté le 12.3.2016

Annexe I

➤ PBS (Phosphate-buffer-saline) pH 7,4

NaCl	8g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Eau distillée	1000 ml
Ajuster pH à 7,4 avec HCl	

➤ Préparation de tampon acétate de sodium

Acétate de sodium	1g
Eau distillée	1000 ml
Ajuster pH à 7,4	

Annexe II

Résultats statistiques des diamètres de cercle de précipités Ag-Ac (les groupes mâles).

Lot expérimental mâle	
	Diamètre du cercle
R1	4,5
R2	5,4
R3	5
R4	5,5
R5	6
R6	6
Moyenne	5,4

Lot témoin mâle	
	Diamètre du cercle
R1	3,5
R2	4,5
R3	3,2
R4	4
R5	4,2
R6	4
Moyenne	3,9

Résultats statistiques des diamètres de cercle de précipités Ag-Ac (les groupes femelles).

Lot exp. Femelle	
	Diamètre de cercle
R1	6,5
R2	6,5
R3	7,5
R4	6,5
R5	7,2
R6	7,5
Moyenne	6,95

Lot Témoin Femelle	
	Diamètre de cercle
R1	5,2
R2	4,5
R3	6,2
R4	5
R5	6,5
R6	6
Moyenne	5,56666667

Les différentes moyennes des diamètres de l'anneau de précipitation Ac- Ag chez les groupes de l'expérimentation.

Groupes de l'expérimentation	Moyenne de diamètre de l'anneau (mm)
Tém.Mâle	3,9
Exp. Mâle	5,4
Tém.Femelle	5,56
Exp. Femelle	6,95

Annexe IV

Fiche des résultats d'analyse physicochimique

CENTRE TECHNIQUE DE L'OLIVIER



Accréditation n°1-2172
Portée disponible sur www.cofrac.fr

Rapport d'Analyse n°10-4607b

Edité le jeudi 25 février 2010

Client :

Abdelkader SALLAT
CHIALI TUBES Spa Filiale du Groupe CHIALI
Voie ABP 160/08-Zone Industrielle
2008 SIDI BEL ABBES (ALGERIE)
E-mail : abdelkader.sallat@groupe-chiali.com

Echantillon :

Vos références : cuve 1, 25 CL
Date de réception de l'échantillon : 22/02/10

Ref. CTO	Critères analytiques	Résultats	Méthode	Date de l'analyse
4607	Acidité* (% acides gras libres, équivalent acide Oléique)	0,1	Programme 82 - Règlement (CE) n°2568/91-Anneexe II modifié	24/02/10
4607	Indice de Peroxyde* (mEq O ₂ /Kg)	4	Programme 82 - Règlement (CE) n°2568/91-Anneexe III modifié	23/02/10

C. PINATEL
Directeur Technique

Caractéristiques des huiles d'olive selon le règlement (CE) n°2568/91 modifié :

Catégorie	Acidité (%)	Indice de peroxyde (mEq O ₂ /kg)	K232	K270	ΔK	Évaluation organoleptique	
						Médiane du défaut (Md)	Médiane du fruit (Mf)
Huile d'olive vierge extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
Huile d'olive vierge	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
Huile d'olive lampante	> 2,0	-	-	-	-	Md > 3,5	-

Ce rapport d'analyse concerne uniquement le produit soumis à l'analyse. La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale. L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seules analyses couvertes par l'accréditation, qui sont identifiées par le symbole *.

CENTRE TECHNIQUE DE L'OLIVIER

Siège social
Espace des Associations
Rue de l'Industrie
C.S. 20101
20085 SIDI BEL

Laboratoire Réalisation des analyses
Espace des Associations
92 av. l'Industrie
20085 Sidi Bel Abbes - Algérie
Tél : 01 40 25 04 02 - 01 40 25 07 00
E-mail : ctm@infocofrac.com

N° NAF : 0144575700010 code APE 9110 N° TVA : FR 01 404 005 757
Association Loi 1901

Annexe III

Fiche des résultats d'analyse organoleptique

CENTRE TECHNIQUE DE L'OLIVIER

Rapport d'Analyse n°10-4607a

Edité le vendredi 26 février 2010

Client :

Abdelkader SALLAT
CHIALI TUBES Spa Filiale du Groupe CHIALI
Voie ABP 160/08-Zone Industrielle
2008 SIDI BEL ABBES (ALGERIE)
E-mail : abdelkader.sallat@groupe-chiali.com

Echantillon :

Vos références : cuve 1
Réception de l'échantillon le : 22/02/10
Date de fin d'analyse : 25/02/10

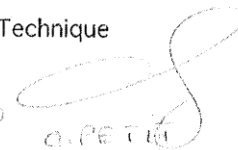
Ref. CTO	Analyse sensorielle	Résultat	Méthode	Classification
4607	ANALYSE SENSORIELLE EN JURY RÉDUIT (3 dégustateurs)	Intensité Fruité : 4,8	Règlement (CE) n° 2568/91	Huile d'olive vierge extra
		Défaut majeur :		
		Néant		

Selon le règlement CE 2568/91 consolidé, le résultat de cette analyse classe cet échantillon dans la catégorie :

HUILE D'OLIVE VIERGE EXTRA

Le Directeur Technique

C. PINATEL



Ce rapport d'analyse concerne uniquement le produit soumis à l'analyse. La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

Réf : L2-Rapp-AS V2: 02/06/09

1/1

CENTRE TECHNIQUE DE L'OLIVIER

Siège social
Maison des Agriculteurs
Maison de Sapsara
CS 36/91
34875 Lattes

Siège administratif
Maison des Agriculteurs
22 av. Henri Frenet
13626 Aix en Provence Cedex 1
☎ 04 42 23 01 90 - ☎ 01 42 23 92 06
E-mail : contact@ctolivar.org

N° SIREF : 494 495 757 00010 cbox APE 911 C - N° TVA : FR 01 494 495 757
Association Loi 1901

CENTRE TECHNIQUE DE L'OLIVIER

Maison des Agriculteurs - 22, Avenue Henri Pontier

13626 Aix-en-Provence CEDEX 1

Tél : 04 42 23 01 92 - Fax : 04 42 23 92 56

Mail: contact@ctolivier.org

Le 26/02/10

Destinataire :

Abdelkader SALLAT

Numéro CTO: **4607**

Nous vous communiquons par le tableau ci-après quelques commentaires organoleptiques sur les échantillons que vous nous avez transmis :

Référence huile : cuve 1
Estimation du niveau de défaut: pas de défaut détecté
Caractère nez : Verduze
Défaut(s) nez :

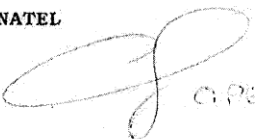
Caractère bouche : Artichaut Amande
Amer: 3,0 sur 10
Piquant: 3,0 sur 10
Intensité du fruité: 4,8 sur 10

Défaut(s) bouche :

Ce qui classe l'échantillon en : **HUILE D'OLIVE VIERGE EXTRA**

Description succincte: Fruité vert équilibré.

Le Responsable de l'analyse : C. PINATEL

RP

C. PINATEL

Les résultats de dégustation réalisées en protocole 1 ne peuvent être utilisés qu'à titre indicatif.

Annexes

Introduction

Conclusion

*Références
Bibliographiques*

Etude
Bibliographique

*Matériels
et méthodes*

Résultats et discussion

**REGULAR ARTICLE**

Physicochemical and organoleptic characterization and evaluating immunomodulatory effect in Wistar rats of extra virgin olive oil from northeastern of Algeria

Yamina Aissaoui¹, Saâd Mebrek¹, Yamina Mehdi², Amina Imène Benali^{1,3}, Insaf Fatima Zohra Mansour¹, Bouziane Abbouni⁴, Mohammed Benali^{1*}

¹*Biotoxicologie Laboratory, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Djilali Liabes, Sidi Bel Abbès 22000, Algeria*

²*Research Center of Physicochemical Analysis Techniques of Tipaza, Algeria*

³*FASSKA Laboratory, 1348 Louvain la-Neuve Belgium*

⁴*Molecular Microbiology and Proteomic Laboratory, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Djilali Liabes, Sidi Bel Abbès 22000, Algeria*

ARTICLE INFO*Article History:*

Received: 9 Jan 2016

Revised: 21 Jan 2016

Accepted: 23 Jan 2016

**Corresponding Author:*Email: benalimo@yahoo.fr

Telephone: 00213771291104

Keywords: Extra virgin olive oil, Sensory analysis, physicochemical analysis, Wistar Rats, immunomodulation, reverse radial immunodiffusion

ABSTRACT

Physicochemical and organoleptic characterization of the local extra virgin olive oil was performed. It has a pale green color indicating no taste or smell of deterioration with a clear appearance at 20 ° C for 24 h. It has bitterness and a piquant character identified by a panel of tasting each of which gave it a score of 03/10. It also has a fruity intensity rated 4.8 / 10. The acidity (0.1% oleic acid), density (0.916), peroxide value (04), refractive index (01.4685) and saponification index (184) were in accordance with standards. Total polyphenols was 280 mg GAE / kg of product. Spectrum of fatty acids, obtained by gas chromatography, shows a wealth equivalent to 80% of oleic acid. These results were used to classify this product in the category extra virgin oil according to the international standards. Immunomodulatory effect of this oil was performed in males and females rats. A dose of 300 µl of extra virgin olive oil was injected subcutaneously into male and female experimental groups simultaneously with an injection of 300 µl of antigenic ovalbumin solution in the presence of Freund's adjuvant. Evaluation of IgG by the reverse radial immunodiffusion technique of Mancini gives a precipitate of diameter in control females (5.56 ± 0.74 mm) greater than that of control males (3.9 ± 0.45 mm) thereby demonstrating an immune stimulation or immunomodulation difference more intense in female controls (p <0.05).

1. Introduction

Olive oil is obtained solely from the fruit of the olive tree *Olea europaea L.* excluding oils obtained using solvents or re-esterification processes and of any mixture with oils of other kinds. Extra virgin olive oil (EVOO) is characterized by a free acidity,

expressed as oleic acid with up to 0.8 g per 100 g (IOC, 2015). The EVOO is rich in phenolic compounds with antioxidant properties. These phenolic compounds were related to the stability of the oil, in particular, for their biological properties. Currently, more phenolic compounds in olive oil, main-

ly hydroxytyrosol and its derivatives, were subject of extensive research in order to establish a relationship between food intake and the risk of many diseases such as cancer and cardiovascular disease (Estruch et al., 2006). The phenolic fraction of olive oil comprises a heterogeneous mixture of compounds. Each of these compounds affects the chemical properties and has a particular influence on the quality of the oil (Psomiadou et al., 2003). The consumption of EVOO rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy adults (Oliveras-López, 2014). The importance of the protective effect of HOVE against cancer and cardiovascular and neurodegenerative diseases, is correlated with the fact that it is considered like an exceptional source of polyphenols, similar to all well known plants rich in polyphenols such as green tea, pomegranate, dates, red grape from *Vitis vinifera* L. variety (Figueiredo-González Martínez-Carballo et al., 2012a, b), onions (Gregorio Perez et al., 2014) and other plants. The EVOO exerts biological effects on endothelial function (Storniolo et al., 2014). Its consumption helps strengthen the immune system against external attack caused by microorganisms such as bacteria or viruses (IOC, 2015). Also, the fatty acids present in olive oil are good allies in reducing immunological parameters as important as the lymphoproliferation induced by cell-specific mitogens B and T cells. The role of these fatty acids in various immunological functions shows that they participate in the regulation of inflammatory processes and may be effective in the treatment of certain autoimmune diseases and in the regulation of the immune system in general (De Pablo et al., 2004).

No previous work reports the use of olive oil by injection to evaluate its therapeutic properties. This study was carried out following the requests of officials of private oil mill CHIALLI group wishing to develop this product for the international market. Then, the aim of this study was to evaluate the Physicochemical and sensory characteristics of this EVOO in order to verify its compliance to the standards. Moreover, the subcutaneous injection of this product for the first time in Wistar rats was performed to study its immunomodulatory effect by evaluating immunoglobulins directed against ovalbumin in reverse radial immunodiffusion.

2. Material and methods

2.1. Reagents and chemicals

- Freund's complete adjuvant (CFA) (Sigma

F5881, lot 093K832)

- Incomplete Freund's adjuvant (IFA) (F5506, lot 025K810)
- Ovalbumin (OVA) (Sigma A-5253 200g 60KB lot 844)

All other chemicals and solvents were of analytical grade.

2.2. Choosing olive oil

Our study focused on the extra virgin olive oil (EVOO). It is a precious vegetable oil produced without any preliminary refining process (Olias et al., 1993). It is extracted from fresh and healthy fruits of olive trees (*O. europaea* L.) by well adapted technological processes, to preserve its volatile and nonvolatile compounds responsible for its fragrance and delicate flavor much appreciated by consumers. Olive oil used in this study comes from the olive campaign 2010/2011 at the initiative of the private producer. It was produced in one of the best oil mills (CHIALLI group) located in the industrial area of Sidi Bel Abbes city in northeastern of Algeria.

2.3. Physicochemical and sensory characteristics of virgin olive oil

Sensory analyzes concern the organoleptic characteristics of EVOO, namely, color, clarity, smell and taste (Regulation (EEC) No 2568/91, 1991).

The physicochemical analyzes focused on density, refractive index, saponification value, free acidity, peroxide value and the rate of total polyphenols according to IOC standards (2015). The methyl esters fat was determined by gas chromatography according to standards (ISO 12966-1, 2014).

2.4. Refractive index (RI)

A drop of olive oil was deposited on a blade refractometer (Carl Zeiss) for an estimated reading of the order refractive indices of the 2/10,000th absolute value against distilled water ($n_D^{20}=1,33$) at 20°C (ISO 6320, 2010).

2.5. Free acidity

The sample EVOO (0.1 g) was dissolved in 50 ml of ethanol, then titrated with a potassium hydroxide 0.1 N solution in the presence of phenolphthalein as a color indicator. Free acidity was expressed as a percentage of oleic acid (ISO 660, 2014).

2.6. Peroxide index

A saturated solution of KI (15 ml) was added to a solution of EVOO (1g) in 12.2 ml of acetic acid / chloroform solution (3: 2, V/V). The mixture was placed in the dark for 15 min, followed by addition of 60 ml of distilled water and 1 ml of a starch solution. Titration was done by 0.001N Na₂S₂O₃ solution until the disappearance of the violet color. The peroxide value was expressed in milliequivalents of active oxygen per kilogram of oil (meqO₂.Kg⁻¹ Oil) (ISO 3960, 2010).

2.7. Saponification Index

Weigh 2 g (nearly 0,001g) of EVOO and add 25 ml of ethanolic solution of potassium hydroxide in a conical flask which was adapted to a refrigerant. The whole was brought to a simmer, stirring occasionally for 1 hour. Add 4-5 drops of phenolphthalein solution and then titrate the still hot soap solution with the hydrochloric acid solution. A blank test was performed in the same conditions without EVOO (ISO 3657, 2013).

2.8. Evaluation of total polyphenols

The total phenols were determined by the method of Gutfinger (1981). A sample of HOVE (2.5 g) was extracted with 5 ml of hexane then with 5 ml of methanol / water (60/40). The mixture was vortexed vigorously for 2 min. Folin-Ciocalteu reagent (0.5 ml) and bidistilled water (4.8 ml) were added to the phenolic moiety. A volume of 1 ml of sodium bicarbonate (35%, w / v) and water are added to achieve a final volume of 10 ml. The mixture is incubated for 2 h in the dark at room temperature. The absorbance of the mixture was measured at 725 nm. The results are expressed in mg of gallic acid per kg EVOO.

2.9. Animals and feed

According to the guidelines of the regional Committee of Ethics of Animals, consistent with those agreed upon by the European Community on 24 November 1986 (86/609/EEC), Wistar rats (24) having 08 weeks of age and weighing 165 ± 18,599g for males and 164.733 ± 11,567g for females were distributed separately with six rats per batch. These animals were provided by the Pasteur Institute of Algiers and were immunocompetent. Males and females live separately by group of subjects in conventional cages, with a manger and a baby bottle. The temperature was adjusted to around 20°C. The rats were drinking tap water and fed ad libitum

during the entire period of experimentation with a standard food compacted into cylindrical sticks provided by the Algiers's National Office of Cattle Feed (ONAB) and containing 14.5% protein, 7.5% fat, 55.8% carbohydrate, 4% of dietary fiber (cellulose), 5.7% minerals and vitamins and 12% water.

2.10. Immunization of animals

The antigen solution was prepared by diluting 0.05 g of OVA in 25 ml sterile distilled water then autoclaved at 120°C for 15 min. 1 ml of Freund's complete adjuvant (CFA) solution was vortexed in the presence of an antigen solution containing 30 µg of ovalbumin. Olive oil for immunization was taken under strict aseptic conditions in a sterile glass vial and stored away from light to prevent possible contamination or oxidation.

The immunization protocol adopted in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care was done over a period of 35 days (CCAC, 2002). The animals were divided into groups of 06 rats per cage. Control groups of male rats (n = 6) LTM and those of female rats (LTF) received primary injection subcutaneously 300 µl of a solution comprised of a mixture antigenic preheated to 37 ° C complete Freund adjuvant (CFA = 150µl) and chicken ovalbumin (OVA = 150µl).

The males (LEM) and female (LEF) experimental groups also received subcutaneous primary injection respectively of antigenic solution (ACF 150µl, 150µl OVA) and EVOO (300 µl).

Injection of EVOO was performed simultaneously with the injection of the antigenic solution under aseptic conditions at the 4 legs of the animal after shaving. Booster injections were made at the 15th and 30th day using the antigen prepared in the same conditions in the presence of incomplete Freund's adjuvant (IFA).

2.11. Sampling of immune serum

On the 35th day of the experiment the animals were sacrificed. The sacrifice was done according to the guidelines of the regional Committee of Ethics of Animals, consistent with those agreed upon by the European Community on 24 November 1986 (86/609/EEC). The blood collected in a dry tube was centrifuged and the immune serum was stored at 04°C until use.

2.12. Determination of anti-ovalbumin antibody

The rate of immunoglobulins was assayed by the

reverse radial immunodiffusion technique of Mancini. The principle consists in depositing the antibody solution to be assayed in dug wells in a gel containing antigen. Antibodies diffuse into the gel and form rings of precipitation when the relative concentrations of the two elements are close to the equivalence point. The disc surface was proportional to the concentration of antibody (Male and Fonteneau, 2005). The diameter of the immune precipitates was measured using a Digital Caliper "Digimatic" of Mitutoyo® brand.

2.13. Optimizing reverse radial immunodiffusion method

In order to optimize this technique optimal concentrations of antigens and antibodies were selected according to the protocol recommended by Vaerman et al. (1969). Several solutions of different concentrations were prepared from antigenic solution containing 10 mg ovalbumin diluted in 20 ml of sodium acetate. The dried agarose (2 g) was diluted in 100 ml of PBS with stirring for 30 minutes. The latter solution was sterilized by autoclaving at 120°C for 15 minutes. All operations were performed in aseptic conditions.

2.14. Statistical Analysis

Results were expressed as mean followed by the standard deviation. Statistical analysis of the different groups data was carried out by Student's test. This parametric statistical test is suitable for a comparative analysis between means of the experimental groups and the control group. The probability of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

The results of physicochemical and sensory analysis were compared to the standards of the International Olive Oil Council, 2015. This concerns the name of this oil that was subject to quality criteria in this case the flavor odor, color and appearance at 20°C for 24 h. These were also the physicochemical parameters relating to density, saponification value, free acidity, peroxide value, total polyphenol content and fatty acids determined by gas chromatography (GC).

3.1. Sensory analyses

The sensory analysis were performed at the technical center of the olive tree in Aix en Provence in France, and the results are shown in Table 01. Our olive oil sample was greenish yellow color with a clear appearance at 20 °C for 24 h. It presents

Organoleptic analysis	Results	Method	Classification
Organoleptic analysis Jury (08 tasters)	Fruity intensity: 4.8 Major fault: none	Commission Regulation (EEC) No. 2568/91	Extra Virgin Olive Oil

Table 01: Results of the organoleptic analysis of the olive oil.

bitterness and a piquant character of 03/10 for each and a fruity intensity of 4.8 / 10 without any major defects. In light of these results, our studied oil was classified as Extra Virgin Olive Oil category (Council Regulation (EEC) No 2568/91).

3.2 Fatty Acid Composition by gas chromatography (GC)

Fatty acids (FA) in the form of their methyl esters were analyzed by GC (Table 02). This analysis showed that the saturated fatty acids represented

*Fatty acid	Concentration (%)	**IOC standards, 2015 (%)
Palmitic acid (C16 : 0Δ)	10,5	7,5 à 20,6
Oleic acid (C18 : 1Δ ⁹)	80	55 -83
Palmitoléic acid (C16 : 1Δ ⁹)	2,5	0,3 – 3,5
Linolenic acid (C18 : 3Δ)	0,3	≤ 1
Linoleic acid (C18 : 2Δ ^{9,12})	4,5	3,5 – 21
Arachidic acid (C20 : 0Δ)	0,5	≤ 0,5
Saturated fatty acids	11	
Monounsaturated fatty acids	82,5	
Polyunsaturated fatty acids	4,8	

Table 02: Fatty acid composition of the olive oil.

*Δ: number of double bonds; 9, 12, 15: location of double bonds; **International Olive Council

only 11%. The predominant (80%) fatty acid in olive oil was a monounsaturated fat called oleic acid, which is a marker of good quality of the oil extremely healthy. Oleic acid is believed to help reduce inflammation, and may have beneficial effects on genes linked to cancer (Menendez and Lupu, 2006). Monounsaturated fats in extra virgin olive oil are also quite resistant to high heat, making it a healthy choice for cooking (Qu et al., 1992). Also polyunsaturated fatty acids such as linoleic and linolenic acids were present in amounts in accordance with IOC standards (2015) and the Codex Aliment-

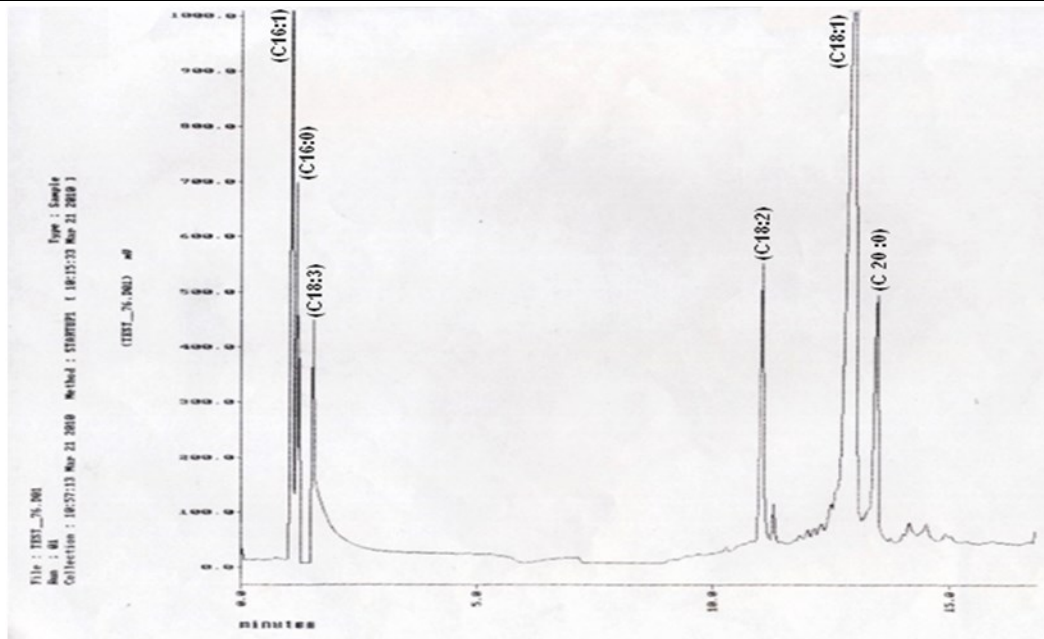


Figure 01: Analysis of the fatty acids of the extra virgin olive oil by GC.

tarius (2015) for EVOO (Figure 01). The fatty acid composition is similar to that observed by other authors (Abaza et al., 2002; Olivier et al., 2007). According to IOC standards, linolenic acid should be less than 1% and considered to be nutritionally beneficial but particularly unstable and susceptible to oxidation (rancidity). Ideally the oil should also have less palmitic acid, which is the major saturated fat. The higher levels of linoleic acid (4.5%), although nutritionally acceptable, are also likely to contribute to reduced storage stability in the oil.

3.3. Physicochemical parameters

The physicochemical analyzes were performed in the laboratory of quality Control and packaging Algerian center (CACQE) and the results are shown in Table 03.

Parameters	*Results	Standards (COI, 2015 & Codex Alimentarius, 2015)
Refractive index	1,468±0,006	1,4677 à 1,4705
Density at 20°C	0,916±0,002	0,910 à 0,916
Index of saponification	184±1,00	184 à 196
Peroxide index meq O ₂ /Kg oil	4±0,635	≤ 20
Free acidity expressed as oleic acid (%)	0,1±0,005	0.8
Total polyphenol (mg gallic acid/kg olive oil)	280±5,437	**100 à 800 mg/kg

Table 03: Results of olive oil physicochemical analysis.

*Values are presented as mean ± SD (n = 3)

**Maestro-Duran et al, 1994

The value of the refractive index is 1.468 ± 0.006 , whereas the density at 20 °C is 0.916 ± 0.002 . These values are in accordance with international standards (ISO 6320, 1985) and the Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2015). Free acidity is a quality factor that gives a level of the state of degradation of the fat in olive oil, made up of triglycerides. It is expressed in grams of oleic acid per 100 grams free olive oil (IOC, 2015). The sample exhibits a level of 0.1% to a maximum value of 0.8% allowed for EVOO. The peroxides were formed during oxidation. The peroxide value is a parameter of degree of lipid oxidation. For olive oil study, it expresses a value of 4 meq O₂ / kg oil which is significantly lower than the maximum limit of 20 meq O₂ / kg established for a category of EVOO. These results are in conformity with those of Tekaya et Hassouna (2005); Salvador et al. (2007) and IOC (2015). The virgin olive oil is characterized by its high content of polyphenols. These compounds are significantly related to quality of virgin olive oil and their contribution to the oxidative stability of the product is widely accepted (Blekas et al., 2002). Agromonic conditions, the technological processes of production and maturity of the olives, strongly affect the quality and quantity of hydrophilic phenolic compounds of olive oil. In our case, the total polyphenol content of olive oil was 280 mg / kg expressed as gallic acid. Polyphenol concentration may be greater than 500 mg/kg (Montedero et al., 1992) and varies between 100 and 800 mg/kg (Maestro-Duran et al., 1994). Owen et al. (2000) reported a phenol content of 232 mg/kg for extra virgin olive oil and 62mg/kg for refined oil. Sánchez

-Fidalgo et al. (2013) report a phenolic concentration of 350 ppm expressed as tyrosol of the EVOO methanolic extract. Our oil can be considered rich in polyphenols conferring beneficial effects for health. In light of these physicochemical results, our olive oil meets international standards is classified as "Extra Virgin Olive Oil". This type of oil obtained at low pressure, is rich in antioxidants and has a low acidity allowing it to be preserved well, protected from light and heat, conferring it interesting therapeutic properties (Sebbagh et al., 2009).

3.4. EVOO immunomodulation in rats

General observations

During the experiment, the regular monitoring of the animals showed no vomiting, diarrhea, anorexia, itching, abscess or edema. These symptoms may be secondary to a specified plan.

Optimization of the reversed radial immunodiffusion method

This optimization allows, following a crosstab, to retain the operating conditions of optimum precipitation (Table 04). Thus, 1 ml of albumin stock solution and 2 ml of sodium acetate buffer at pH 7.2 in the presence of 8 ml of agarose represent optimal conditions of immune complex formation. Indeed, under these conditions, a test sample containing immunoglobulin placed in a well of antibody (anti-immunoglobulin antiserum) containing agarose, diffuses into the gel and forms a precipitin ring. The ring diameter is related to the concentration of the immunoglobulin in the test sample (Mancini et al.,

Antigenic solutions	Precipitin ring formation on agarose
2 ml of stock solution of OVA + 1 ml of sodium acetate buffer pH 7.2+ 8 ml agarose.	+
1 ml of stock solution of OVA + 2 ml of sodium acetate buffer pH 7.2+ 8 ml agarose.	+++
0,666 ml of stock solution of OVA + 2.333 ml of sodium acetate buffer pH 7,2+ 8 ml agarose.	-
0.5 ml of stock solution of OVA + 2.5 ml of sodium acetate buffer pH 7,2+ 8 ml agarose.	-
0.4 ml of stock solution of OVA + 2.6 ml of sodium acetate buffer pH 7,2+ 8 ml agarose.	-
0.334 ml of stock solution of OVA + 2.666 ml of sodium acetate buffer pH 7,2+ 8 ml agarose.	-

Table 04: Optimizing reverse radial immunodiffusion method.

1965; Vaerman et al., 1968).

Evaluation of anti OVA IgG

The diameters of the immune precipitates measured for animals of LTM and LTF groups reflect different antibodies rates ($P < 0.05$ $n = 6$). The IgG in the LTF group is greater than that of the LTM group. The same findings were observed for animals of LEM and LEF groups ($P < 0.05$, $n = 6$) (Figure 2). Several recent studies have shown that in mam-

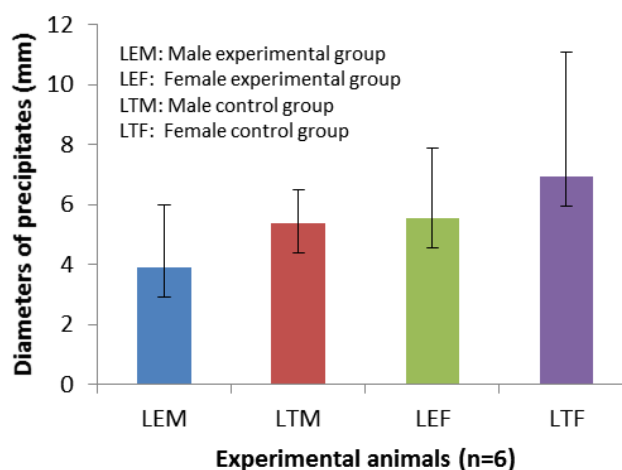


Figure 02: Diameters of the immune precipitates in males and females rats immunized respectively by OVA and OVA+EVOO ($P < 0.05$; $n = 6$; Standard Deviations are multiplied by 10).

mals, animals of the female gender have a stronger antibody response than that of animals of the male sex. Indeed, Grossman (1989) showed that the high production of polyclonal antibodies in female mice is caused by endocrine hormones which are intimately involved in the immunological dimorphism consisting in particular of gonadal steroids, adrenal glucocorticoids, growth hormone pituitary prolactin, thymic hormones and cytokines produced by activated lymphocytes. Statistical analysis of the results shows that the diameter of the wells in females (LEF) who received a dose of 300µl EVOO is lower than that of control females (LTF). These results reflect a very low production of anti-OVA antibodies for experimental females compared to female controls ($P < 0.05$ $n = 6$) (Figure 2). These results converge with several studies on rats and mice around the world and confirm that extra virgin olive oil decreases the immune response. In fact, the fatty acids in olive oil reduce the proliferation of types B and T lymphocytes. Fatty acids contribute to modulate the process of inflammation and the immune system in general and helps fight against certain autoimmune diseases (Manuel et al., 2004).

Most studies on the effects of fatty acids on the

immune system have shown that diets containing olive oil administered to animals promotes a significant reduction in cell proliferation in response to mitogenic effect concanavalin A (Yaqoob, 1994). The immunosuppressive effects of olive oil are probably due to the oleic acid, rather than other components of the fat (Jeffery, 1997a). The administration of diets containing olive oil for 8 or 12 weeks produced an increase in production of IL-2 in mice (Yaqoob and Calder, 1995; De Pablo, 1998). IL-4 is another cytokine with anti-inflammatory functions; production of this cytokine is increased in mice after administration for four weeks a diet containing olive oil (Puertollano et al., 2004). In animal studies, olive oil administration reduced the activity of NK cells (Yaqoob et al., 1994). The comparison of data between animals fed different quantities of oleic acid showed a negative linear relationship, indicating that the oleic acid is responsible for a reduction in the activity of NK cells in rats (Jeffery et al., 1997b).

4. Conclusion

Olive oil is a major source of fat in the Mediterranean diet which is well known for its beneficial effects on human health. Our oil produced in northeastern of Algeria (Chiali group) present biochemical and sensory characteristics that allow it to be classified in the category of extra virgin oils. Olive oil is mainly composed of oleic acid and other compounds such as sterols, alcohols, antioxidants, and other fatty acids (other than oleic acid) of minor. These biological components are involved in the modulation of immune functions and reveal immunosuppressive effects probably attributed to oleic acid. Polyphenolic substances contained in olive oil have antioxidant and anti-inflammatory effect. The injection of extra virgin olive oil subcutaneously for the first time in the rat and the quantification of the IgG anti OVA corroborates the many scientific works that report a decrease in the activity of B cells and thus the humoral immune response.

Conflict of Interest

No conflict of interest exists in the submission of this manuscript.

References

Abaza L, Msallem M, Daoud D, Zarrouk M (2002) Caractérisation des huiles de sept variétés d'olivier tunisiennes. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 9:174-79

Blekas G, Psomiadou E, Tsimidou M (2002). On the Importance of Total Polar Phenols to Monitor the Stability of Greek Virgin Olive Oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104: 340-346

Codex Alimentarius (2015) Norme pour les huiles d'olive et les huiles de grignons d'olive. CODEX STAN 33-1981

Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) (2002) lignes directrices: production d'anticorps

COI (2015) Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive COI/T.15/NC n° 3/Rév. 8.

Conseil Oléicole International (2011) Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. T. 15/NC n° 3/Rév. 6.

Conseil Oléicole International (2010) Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive, T.15/NC n° 3/Rév. 5.

De Pablo MA, Puertollano MA, De Cienfuegos GA (2004) Olive oil and immune system functions: potential involvement in immunonutrition. *Grasas y Aceites* 55: 42-51

De Pablo MA, Ortega E, Gallego AM, Alvarez C, Pancorbo PL, De Cienfuegos GA (1998b) The effect of dietary fatty acid manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 44 : 57-67

Estruch R, Martinez-Gonzalez M, Corella D (2006) Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors. *Annals of Internal Medicine* 145:1-11

Figueiredo-González M, Martínez-Carballo E, Cancho-Grande B, Santiago J L, Martínez MC, Simal-Gándara J (2012a) Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol fingerprints, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food Chemistry* 130: 9-19.

Figueiredo-González M, Simal-Gándara J, Boso Alonso S, Martínez Rodríguez MC, Santiago Blanco JL, Cancho-Grande B (2012b) Flavonoids in Gran Negro berries collected from shoulders and tips within the cluster, and comparison with Brancellao and Mouratón varieties. *Food Chemistry* 133:806-815

Grossman CJ (1989) Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *Journal of Steroid Biochemistry* 34:241-251

ISO 6320 (2010) Fats of plant and animal - Determination of refractive index

ISO 660: 2009 (2014) Fats of plant and animal - Determination of acid value and acidity

ISO 3960: 2007 (2010) Fats of plant and animal - Determination of peroxide value - Determination with iodometric stop point

ISO 3657: 2013 (2013) Fats of plant and animal - Determination of saponification value

ISO 12966-1: 2014 (2014) Fats of plant and animal - gas chromatography of methyl esters of fatty acids - Part 1: Guidelines for the modern gas phase chromatography of methyl esters of fatty acids

Jeffery NM, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC (1997a) The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions are due to oleic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism* 40:71-80

- Jeffery NM, Cortina M, Newsholme EA, Calder PC (1997b) Effects of variations in the proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions. *British Journal of Nutrition* 77:805-823
- Maestro-Duran R, Leon-Cabello R, Ruiz-Gutierrez V, Fiestas P, Vazquez-Roncero A (1994) Bitter phenolic glucosides from seeds of olive (*Olea europaea*). *Grasas y Aceites* 45:332-335
- Male D, Fonteneau P (2005) *Immunology, Memory-Aid Illustrated*. 4th Edition, De Boeck, Paris 132
- Mancini G, Carbonara AO, Heremans J F (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion, immunochromatography. *Pergamon Press* 2:235-254
- Menendez JA, Lupu R (2006) Mediterranean dietary traditions for the molecular treatment of human cancer: anti-oncogenic actions of the main olive oil's monounsaturated fatty acid oleic acid (18:1n-9). *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7:495-502
- Montedoro G, Servili N, Baldioli M, Miniati E (1992) Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:1571-1576
- Oliveras-López MJ, Berná G, Jurado-Ruiz E, López-García de la Serrana H, Martín F (2014) Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *Journal of functional foods* 10:475-484
- Ollivier D, Pinatel C, Dupuy N, Guérère M, Artaud J (2007) Caractérisations sensorielles et chimiques d'huiles d'olive vierges de six AOC françaises. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 14:116-129
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer* 36:1235-1247
- Psomiadou E, Karakostas K, Blekas G (2003) Proposed Parameters for Monitoring Quality of Virgin Olive Oil (Koroneiki cv). *European Journal of Lipid Science and Technology* 105: 403-408
- Puertollano MA, Puertollano E, Ruiz-Bravo A, Jimenez-Valera M, de Pablo MA, Alvarez de Cienfuegos G (2004) Changes in the immune functions and susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection in mice fed dietary lipids. *Immunology and Cell Biology*. 82:370-376
- Qu YH, Xu GX, Zhou JZ, Chen TD, Zhu LF, Shields PG, Wang HW, Gao YT (1992) Genotoxicity of heated cooking oil vapors. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 298:105-111
- Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oils and olive-pomace oil and relevant methods of analysis
- Salvador M D, Aranda F, Gomez-Alonso S, Fregapane G (2001) Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chemistry* 74:267-274
- Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, Alarcón de la Lastra C (2013) Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24:1401-1413
- Sebbagh N, Cruciani-Guglielmacci C, Ouali F, Berthault MF, Rouch C, Chabane Sari D, Magnan C (2009) Comparative effects of Citrullus colocynthis, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes and Metabolism* 35:178-184
- Storniolo CE, Roselló-Catafau J, Pintó X, Mitjavila MT, Moreno JJ (2014) Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biology* 2:971-977
- Tekaya BI, Hassouna M (2005) Étude de la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge extra tunisienne au cours de son stockage. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 12:447-454
- Vaerman JP, Lebacqz-Verhayden AM, Scolari L, Heremans JF (1969) Further studies on single radial immunodiffusion-I Direct proportionality between area of precipitate and reciprocal of antibody concentration. *Immunochemistry* 6:279-285
- Yaqoob P, Calder P (1995) Effect of Dietary Lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophage. *Cellular Immunology* 163:120-128
- Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC (1994) Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunology Letters* 41:241-247
- Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC (1994) The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* 82:603-610