

Professeur BENLEMLIH Mohamed
Docteur GHANAM Jamal
Préface et annexes du Professeur JOYEUX Henri

POLYPHENOLS D'HUILE D'OLIVE, TRESORS SANTE!

Polyphénols aux actions
antioxydantes, anti-inflammatoires,
anticancéreuses, anti-vieillessement
et protectrices cardio-vasculaires

Medicatrix

3^e édition mise à jour et augmentée

DANGER



**LE PHOTOCOPIAGE
TUE LE LIVRE**

Ce pictogramme mérite une explication. Son objet est d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, particulièrement dans le domaine de l'édition technique et universitaire, le développement massif du PHOTOCOPIAGE.

Nous rappelons à nos lecteurs français que le Code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit en effet expressément la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droits. Or, cette pratique s'est généralisée dans les établissements d'enseignement supérieur, provoquant une baisse brutale des achats de livres et de revues, au point que la possibilité même pour les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.

Nous rappelons donc que toute reproduction, partielle ou totale, de la présente publication est interdite sans autorisation, en France, du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC, 20 rue des Grands-Augustins, 75006 Paris) et en Belgique, de Repobel (87 rue du Prince Royal, B-1050 Bruxelles).

Toute reproduction, adaptation, représentation ou traduction, même partielle, du présent ouvrage, sous la forme de textes imprimés, de microfilms, de photographies, de photocopies ou de tout autre moyen chimique, informatique, électronique ou mécanique ne peut être réalisée sans l'autorisation écrite de l'éditeur.

Tous droits réservés pour tous pays
y compris les états de l'ex-URSS et la Chine.

Imprimé en France (Nouvelle Imprimerie Laballery)

© marco pietteur, éditeur

ISBN 978-2-87211-159-6

Dépôt légal 2016/5053/X1

3^e édition mise à jour et augmentée

22, route des Fagnes – B-4190 Ferrières (Belgique)

Tél.: + 32 (0) 4 365 27 29 – Fax: + 32 (0) 4 341 29 21

Courriel: infos@mpeditions.be

Sommaire

Avant-propos	7
Préface du Pr Henri Joyeux	9
Introduction du Pr Henri Joyeux	13

1^{re} PARTIE

Généralités sur l'olivier et l'huile d'olive 43

Chapitre 1 - L'Olive, un fruit grassement pourvu de nutriments santé 45

1. Origine 45
2. Historique 45
3. Caractéristiques de l'olivier et de son fruit, l'olive 46
 - 3.1 Stades de maturation 48

Chapitre 2 - Du fruit d'olive à l'huile d'olive 53

1. Principe de l'extraction 53
 - 1.1 Nettoyage des fruits 54
 - 1.2 Broyage 54
 - 1.3 Malaxage 54
 - 1.4 Séparation de la phase liquide et solide 56
 - Système à presse 56
 - Centrifugation 58

Chapitre 3 - Conditions de stockage de l'huile d'olive 61

2^e PARTIE

Composition et propriétés chimiques de l'huile d'olive 63

Chapitre 1 - L'huile d'olive, source d'anti-oxydants et de bons acides gras 65

1. Acide gras, triacylglycérols, et glycérides partiels 69
2. Les polyphénols de l'huile d'olive, antioxydants très puissants 70
 - 2.1 Les monomères phénoliques 71
3. Tocophérols 76
4. Hydrocarbures 76
5. Pigments 77

Chapitre 2 - Analyse et quantification des polyphénols de l'huile d'olive	79
3^e PARTIE	
Effets de l'huile d'olive sur la santé	81
Chapitre 1 - Les bienfaits de l'huile d'olive sont essentiellement attribués à ses polyphénols	83
Chapitre 2 - Les polyphénols de l'huile d'olive sont très biodisponibles et bioactifs	87
1. Absorption des composés phénoliques	87
2. Métabolisme	91
3. Excrétion	93
Chapitre 3 - Pouvoir antioxydant des polyphénols de l'huile d'olive	95
1. Systèmes antioxydants enzymatiques	98
2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	98
3. Les polyphénols de l'huile d'olive, composés à fort pouvoir antioxydant	100
Chapitre 4 - L'huile d'olive riche en polyphénols, son effet contre le vieillissement	105
1. Effet positif de l'hydroxytyrosol sur la biogénèse mitochondriale	106
2. Effet anti-âge des polyphénols de l'huile d'olive sur les cellules cardiaques	108
Chapitre 5 - L'hydroxytyrosol et l'oleuropéine contre le SIDA	109
Chapitre 6 - L'Hydroxytyrosol et les polyphénols de l'huile d'olive, puissants anticancéreux	111
1. Généralités	111
2. Hydroxytyrosol/Oleuropéine, polyphénols à fort effet anticancéreux	112
3. Effet efficace de l'Hydroxytyrosol/Oleuropéine sur le traitement et la prévention du cancer du sein	113

Chapitre 7 - Etude <i>in vitro</i>	117
1. Résumé	118
2. Introduction	119
3. Résultats	120
4. Discussion	128
Chapitre 8 - Effet protecteur des polyphénols de l'huile d'olive sur le système cardiovasculaire	131
1. Généralités	131
2. Composés phénoliques et prévention de l'athérosclérose	134
3. Effet des polyphénols de l'huile d'olive contre l'agrégation plaquettaire	141
4. Effet anti-inflammatoire des polyphénols de l'huile d'olive	142
5. L'hydroxytyrosol de l'huile d'olive augmente le taux du monoxyde d'azote, gaz vasodilatateur	144
Chapitre 9 - La protection des polyphénols contre les lésions des protéines	147
Chapitre 10 - Effet antimicrobien des polyphénols de l'huile d'olive	149
Chapitre 11 - Prévention des polyphénols de l'huile d'olive contre le diabète	151
Chapitre 12 - Prévention des polyphénols contre la maladie d'Alzheimer	155
Chapitre 13 - Témoignages	157
Chapitre 14 - Etudes <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> et cliniques avec Olivie Riche	165
1. Arthrite rhumatoïde	165
1.1 Résumé	165
1.2 Introduction	167
1.3 Matériels et méthodes	169
1.4 Résultats	175
1.5 Discussion et conclusion	183

2. Effets anti-cancéreux	188
2.1 Résumé	188
3. Effets hypoglycémiants et hypolipidémiants	189
3.1. Résumé	189
4. Activités anti-inflammatoires et analgésiques	192
5. Effet anti-microbiens	193
Références bibliographiques et ouvrages scientifiques	195



AVANT-PROPOS

L'huile d'olive riche en polyphénols

Les polyphénols naturels de l'huile d'olive sont des molécules très biodisponibles et hautement bioactifs, ce qui leur confèrent de multitudes bienfaits sur la santé humaine. Ces composés font partie de la famille des antioxydants. Ils permettent de lutter contre les radicaux libres aux effets délétères: agressions des cellules, modification de l'ADN, oxydation des lipides.

Ainsi, des études récentes ont montré que l'hydroxytyrosol de l'huile d'olive améliore la fonction mitochondriale qui prévient le vieillissement cellulaire et par conséquent le vieillissement du corps. Ceci nous ramène à confirmer que ce composé est un agent utile pour prévenir le vieillissement et les maladies liées à l'âge.

Les polyphénols de l'huile d'olive participent aussi à la protection et au traitement du cancer. Dans ce cadre, il a été démontré que l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine ont un effet anticancéreux sur le cancer du côlon, le cancer du sang, le cancer du sein,... Ces fameux composés agissent contre le cancer par plusieurs mécanismes antiprolifératifs et pro-apoptotiques.

Les bienfaits des composés phénoliques de l'huile d'olive sur le système cardiovasculaire ont été élucidés par plusieurs auteurs. En effet, les polyphénols de l'huile d'olive favorisent la réduction de la présence des molécules d'adhérence cellulaire, augmentent la disponibilité du monoxyde d'azote, suppriment l'agrégation plaquettaire, protègent les LDL contre l'oxydation pour retarder l'athérosclérose et réduisent les réaction inflammatoires.

Actuellement, d'autres vertus des polyphénols de l'huile d'olive sont reconnues, incluant ainsi leur effet antibactérien, le traitement et la prévention du diabète et de la maladie d'Alzheimer.

*«L'olivier, arbre rustique
et pluriséculaire, est un symbole
de sagesse, de puissance, de paix et de santé.»*

Pr Henri Joyeux

PRÉFACE DU P^R HENRI JOYEUX

Voilà le livre qui manquait pour démontrer de manière scientifique et compréhensible par tous l'intérêt de l'Huile d'Olive, et pas n'importe laquelle, pour notre SANTÉ.

Comprendre sa fabrication, sélectionner la meilleure et la consommer régulièrement en connaissant tous les atouts qu'elle apporte à notre corps.

Prévenir l'Alzheimer qui fait si peur, éviter le vieillissement prématuré de nos tissus et organes, prévenir les cancers, les maladies cardiaques de surcharge, les excès de cholestérol, les accidents vasculaires cérébraux... bref rester en bonne Santé pour le siècle qui nous est donné, c'est notre souhait le plus cher.

L'Huile d'Olive de cette zone rocailleuse et rude de l'Atlas marocain est un trésor de santé. Comparée à toutes les autres huiles du pourtour de la Méditerranée et bien au-delà, elle concentre des polyphénols peu connus : Tyrosol et Hydroxytyrosol à des taux jamais mesurés dans un aliment, 30 fois plus (240 mg/kg) que dans les huiles généralement consommées (8 mg/kg). Sa teneur en polyphénols est maximale au début de la véraison, quand l'olive prend sa couleur vert-rouge-violacée au coucher de soleil de l'Atlas.

Pourquoi cette huile d'Olive extra vierge «OLIVIE Plus» est-elle si riche ? La souffrance écologique de l'Olivier, lui fait donner le meilleur de lui-même pour se protéger et nous protéger : des anti-oxydants, anti-vieillessement, anti-athéromateux, anti-inflammatoires.

S'ajoutent de belles concentrations d'Acide Oléique, excellent transporteur du calcium végétal de nos aliments, olives, amandes, noix, noisettes, persil et de tous les fruits et légumes de saison.

Sans oublier la Vitamine E, celle de la fécondité, de la jeunesse qui joue un si bon rôle pour «huiler nos neurones» et rendre plus amoureux les uns des autres spermatozoïdes et ovules.

Ce livre a une grande valeur scientifique. Je félicite chaleureusement mes collègues de l'Université de Fès qui apportent en plus de leur expérience, de nombreuses preuves scientifiques, les meilleures de la littérature mondiale.

J'ai goûté cette huile dorée, elle accompagne tous les menus familiaux et amicaux et je vais la prescrire largement, sans ordonnance, mais avec insistance, dans mon métier de cancérologue.

«En effet l'huile d'olive a des effets anti-cancer spécifiques chez les femmes atteintes de cancer du sein¹ qui veulent éviter les récives, et très probablement (bien que ce ne soit pas encore démontré scientifiquement) chez les hommes atteints de cancer prostatique ou qui veulent l'éviter. Une étude *in vitro* sur les lignées de cellules de cancer du sein, a démontré en janvier 2005 que l'acide oléique, le principal acide gras mono-insaturé de l'huile d'olive, tend à normaliser la surexpression d'un gène du cancer, l'oncogène Her-2/neu, promoteur d'une forme grave (1 patiente sur 5) du cancer du sein. Des chercheurs de Chicago (*Javier Menendez & coll in Annals of Oncology janvier 2005*) ont donc trouvé un mécanisme moléculaire qui explique les effets protecteurs de l'huile d'olive contre le cancer du sein chez les femmes consommatrices. De plus l'acide oléique stimule l'activité de l'Herceptine qui est le traitement de choix qui cible le gène Her-2/neu. L'acide oléique réduit de 46 % l'oncogène et l'Herceptine de 48 %. Ensemble (acide oléique + Herceptine),

1 *Comment enrayer l'Epidémie des cancers du sein et des récives* - Pr Henri Joyeux et D^r Bérengère Arnal - Ed. FX de Guibert 2010.

on observe une synergie d'effet avec réduction de 70%. C'est donc l'effet *Herceptine like* de l'acide oléique et les polyphénols d'olive contre le cancer.»

Toutes ces données de science fondamentale concordent avec les résultats des études épidémiologiques qui ont montré que les habitudes alimentaires méditerranéennes ont des effets significatifs contre le cancer, les maladies cardio-vasculaires et même pour prévenir certains effets du vieillissement.

Pr Henri JOYEUX - Chirurgien Cancérologue

Spécialiste international de la Prévention
par la Nutrition des maladies de civilisation
Faculté de Médecine de Montpellier

INTRODUCTION DU P^R H. JOYEUX

1. L'huile la plus puissante pour votre santé

Chers amis de la santé,

Quand j'étais petit, avec mes frères et soeurs nous accompagnions certains dimanches notre père, originaire des Cévennes, près d'Uzès dans le Gard, pour récupérer l'huile d'olive destinée à la famille. Elle avait une belle couleur verte, et quand elle s'écoulait sur la salade ou les asperges jusqu'à la dernière goutte d'or fluide, il nous la faisait sentir et en régalaient son palais des saveurs. Il ne savait pas tous les bienfaits de l'huile d'olive pour la santé de chacun.

J'axerai mon propos sur ces trésors que sont les polyphénols découverts grâce aux progrès des techniques analytiques de dosage des différents composants d'une huile d'olive. Ils permettent de connaître et sélectionner les meilleures qualités en fonction des méthodes d'extraction, des modes de culture et de leur géographie. Nous ne sommes plus 3000 ans avant notre ère !

L'huile d'olive est d'une manière générale, la source principale de l'apport lipidique dans l'Alimentation méditerranéenne², associée au fromage de chèvres et/ou de brebis. En voici les preuves destinées aussi bien aux spécialistes qu'à vous tous qui voulaient savoir ce qu'il y a de bon et d'utile pour la santé dans l'huile d'olive.

J'ai tenu à voir moi-même des oliveraies dans une zone rocailleuse et rude de l'Atlas Marocain.

2 Je ne veux pas utiliser le mot « régime » qui est trop restrictif.

L'olivier doit souffrir pour donner le meilleur de lui-même. La chaleur et l'aridité extrêmes (52°C), le sol rocailleux qui empêche de prendre racine : ce sont les conditions optimales de panique et de souffrance pour l'olivier. À l'heure du coucher du soleil, après une journée torride, l'olive est son niveau maximal de stress et prend sa couleur vert-rouge-violacé. C'est là qu'elle se gorge de polyphénols, de puissants antioxydants pour votre corps.

C'est dans ces conditions qu'est produite l'huile « *Olivie Plus 30x* », une des meilleures huiles d'olive pour la santé. Vu ses qualités (et son prix), je la considère plutôt comme un élixir. Il ne s'agit pas d'une huile de bidon dont vous arroserez généreusement vos plats. Elle est produite dans des conditions très difficiles, donc les rendements sont faibles, mais la qualité est exceptionnelle. Cela explique son prix – *Olivie Plus 30x* n'est malheureusement pas à la portée de toutes les bourses.

J'admire le travail de son producteur. Il a d'ailleurs créé des gélules de cette huile sous forme concentrée: *Olivie Forte* et *Olivie Riche*. Je vais souvent citer ces trois produits en exemple dans cette lettre, d'autant qu'ils ont fait l'objet de nombreuses études. Mais je tiens à souligner que je ne reçois aucune commission et que je n'ai aucun accord avec le producteur. Ma priorité est de vous faire découvrir ce qu'il y a de meilleur pour votre santé. Et à ma connaissance, « *Olivie Plus 30x* » est la meilleure huile d'olive pour la santé.

Il s'agit d'une huile puissante en goût, à forte teneur en polyphénols dont les taux ont été comparés à ceux des huiles issues des pays du pourtour de la Méditerranée: l'Italie, l'Espagne, la Grèce, la France et la Tunisie.

L'huile d'olive est, d'une manière générale, la source principale de l'apport lipidique dans l'alimentation

méditerranéenne³, associée au fromage de chèvre et/ou de brebis. En voici les preuves destinées aussi bien aux spécialistes qu'à vous tous qui voulez savoir ce qu'il y a de bon et d'utile pour la santé dans l'huile d'olive.

Quelles sont les meilleures huiles d'olives ?

Quelle que soit son origine, l'huile d'olive est la reine des huiles végétales. Nous n'en consommons pas assez. Les Grecs encore aujourd'hui arrosent abondamment leurs aliments d'huile d'olive. Cette bonne habitude est encouragée par les études qui confirment la valeur du "régime crétois".

Il faut laisser tomber toutes les mixtures industrielles. Leur mode de fabrication fait qu'elles ne procurent pas les bienfaits pour la santé des huiles traditionnelles.

Les huiles ne doivent être ni raffinées ni chauffées et encore moins cuites. L'huile d'olive est la plus résistante à la chaleur, elle ne brûle pas avant 210°C et les autres huiles bien avant ce qui exclut les fritures, les cuissons à four très chaud, les poêles trop chauffées...

La composition générale des meilleures huiles végétales et de leurs feuilles

L'huile d'olive contient 56 à 84 % d'acide **oléique** et 3 à 21 % d'un acide gras essentiel, l'acide **linoléique**, qui est un acide gras oméga-6.

De plus, le rapport acide oléique/acide linoléique baisse avec la maturation des olives.

Pour une santé optimale, les oméga-6 de l'huile d'olive doivent être associés à des oméga-3.

3 Je ne veux pas utiliser le mot « régime » qui est trop restrictif.

Vous trouverez des oméga-3 dans **les poissons** ou de la **viande labellisée bleu-blanc-cœur**⁴, car les animaux sont parfaitement nourris et reçoivent des graines de lin qui apportent les oméga-3.

Les composés mineurs des huiles d'olive permettent de les différencier, leur donnant saveur, couleur, leur stabilité, et évitant leur détérioration.

L'huile d'olive contient du **squalène** et du **bêta carotène**, un précurseur de la vitamine A. Ensemble, ils donnent à l'huile d'olive sa teinte verte et jaune.

Elle est aussi riche en **vitamine E**. La vitamine E donne à l'huile ses pigments vert chlorophylle. L'huile *Olivie Plus 30x* contient jusqu'à 5 fois plus de vitamine E par rapport à une huile standard, soit 120 mg/kg. L'alpha-tocophérol, la vitamine E de l'huile d'olive, est un antioxydant qui protège le bon cholestérol (LDL). Enfin, l'huile d'olive est très riche en **polyphénols**.

Les polyphénols: qui sont-ils et où les trouve-t-on ?

On les appelle aussi « **biophénols** ». Ils sont les grands responsables de la stabilité de l'huile d'olive. Ils font partie des composés phénoliques parmi lesquels on distingue :

- Des polymères (tannins et anthocyanes qui ressemblent à ceux présents dans les vins rouges).
- Des monomères phénoliques dominés par l'*oleuropéine* (composé phénolique principal des feuilles d'olive).
- Des alcools phénoliques l'*Hydroxytyrosol*, le *Tyrosol*.

4 Bleu blanc cœur.

Hrncirik et Fritsche (2004)⁵ ont analysé 23 échantillons d'huile d'olive extra vierge provenant de divers pays (Italie, Espagne, Grèce et Tunisie). Les résultats ont révélé une grande variation de la concentration de polyphénols totaux dans l'huile.

En fait, la composition et la concentration des composés phénoliques dans l'huile d'olive sont fortement influencées par plusieurs facteurs agronomiques et technologiques, comme cultivar, la zone géographique et le climat, la saison de la récolte et de l'indice de maturité du fruit d'olive, un processus de production et l'irrigation.

Il est donc difficile d'exiger que la bouteille d'huile porte sur son étiquette mention de sa composition détaillée. Il est bon cependant de savoir tous les trésors qu'elle peut contenir.

- **L'Oleuropéine** (composé phénolique principal des feuilles d'olive) et ses dérivés sont les principaux composés phénoliques rencontrés dans toutes les huiles d'olive.

- Les composés **Tyrosol et Hydroxytyrosol** se trouvent sous forme libre ou liée à un autre acide dit "élénoïque" pour former l'*Oléocanthal* et l'*Oléopentandial* nommé parfois *Oléioceine*.

Ce dernier produit est de l'Hydroxytyrosol lié à l'acide élénoïque, il est aussi puissant que l'Oléocanthal.

Comme dit plus haut, j'ai eu l'occasion de visiter les oliveraies situées au sud marocain. Là les oliviers sont plantés dans un sol rocailleux, sans pollution, sans activité industrielle, où il n'y a presque pas de pluie. Ils subissent donc

5 Comparability and Reliability of Different Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. Hrncirik, K., & Fritsche, S. (2004). European Journal of Lipid Science and Technology, 106, 540-549.

des stress thermiques à une température qui dépasse les 50°C en été, ce qui explique bien les hautes concentrations de polyphénols dans cette huile.

Les racines n'ont pas d'espace où croître en raison des roches massives (calcaire et silex) à fleur de sol. L'olivier déclenche ainsi un mécanisme de survie, dont nous pouvons nous servir pour notre santé.

Il produit donc des quantités anormalement élevées d'antioxydants (polyphénols) pour se défendre. Il reste alors à en recueillir 100% naturellement à partir des feuilles de ces arbres, des jeunes branches, et des olives de ces arbres du désert.

Résultats des analyses internationales d'une huile super-concentrée

Réalisées dans les laboratoires labellisés internationaux, elles apportent les preuves chiffrées (voir tableau plus bas).

Les taux comparés d'*Hydroxytyrosol* dans 22 échantillons d'huiles d'olive classiques d'Italie, Espagne, Grèce et Tunisie apportent la preuve qu'*Olivie plus 30X* a jusqu'à 30 fois plus d'hydroxytyrosol que n'importe quelle huile au monde (233 mg/kg)

On a alors affaire à un véritable complément alimentaire pour des indications de Santé précises.

Tableau: Concentration des principaux composés phénoliques dans *Olivie Plus 30X* et dans une huile standard [4] en mg/kg.

Composé*	Olivie Plus 30x	Huile standard
Polyphénols totaux	2840	236
Hydroxytyrosol	233	13
Oléopentandial (dérivé de l'oleuropéine, Hydroxytyrosol lié)	1360	51
Tyrosol	78	13

*Les teneurs en polyphénols et dérivés peuvent varier selon les fluctuations normales des valeurs des produits d'origine naturelle.

Concentrés sous forme de gélules par des techniques physiques sans ajout de produit chimique ou de conservateurs, on obtient *Olivie Force* ou *Olivie Riche*. La dose de polyphénols est alors 2000 fois plus forte qu'une huile conventionnelle. Elle contient aussi les vitamines (A, B1, PP, C, D, E et K) et des minéraux.

- **L'Oleuropéine et ses dérivés dialdéhydiques**, appartiennent à la famille des flavonoïdes. L'Oleuropéine est extraite en plus de l'huile d'olive de la feuille de l'olivier.

- **L'Hydroxytyrosol** est présent dans l'huile d'olive standard au taux de 7 mg/kg; 1000 mg par litre dans les margines (qui représentent 50 % de l'eau obtenue lorsque l'olive est écrasée) et dans les feuilles d'olivier au taux de 219 mg/kg. Il est présent dans Olivie plus 30X à 233 mg/kg et dans Olivie Force ou Olivie Riche à 45 000 mg/kg ou 45 g/kg).

- **Le Tyrosol** est l'antioxydant phénolique naturel présent à la fois dans l'huile d'olive et dans les feuilles d'olivier. Il est présent aussi dans le vin blanc.

- **L'Oléopentandial** (nommé aussi **Oléiocéine**) est un composé très biodisponible, bien absorbé au niveau de l'intestin retrouvé dans la circulation sanguine. En fait, le fort caractère lipophile (qui aime les graisses) de l'Oléopentandial,

par rapport à sa molécule mère (l'*Oleuropéine*), suggère que ce composé est plus biodisponible pour l'absorption intestinale⁶. En outre, l'*Oléopentandial* a montré une bonne stabilité dans des conditions acides pendant la simulation gastrique⁷ *in vitro*, atteignant des concentrations sanguines considérables chez l'homme (allant de 1 à 18 µM).

L'activité anti-oxydante de l'*Oléopentandial* contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote a été prouvée *in vitro*, en utilisant différents modèles expérimentaux⁸.

Il est présent dans *Olivie plus 30X* à 1360 mg/kg.

• **L'*Oléocanthal*** composé phénolique très antioxydant est très proche du *Tyrosol*. Il donne à l'huile d'olive vierge extra, fraîchement pressée, son goût légèrement poivré (sensation de picotement dans la gorge).

Le devenir des polyphénols dans l'organisme et leur pouvoir antioxydant.

Après l'absorption digestive, surtout au niveau du grêle, 100% de l'*Hydroxytyrosol* et du *Tyrosol* apparaissent rapidement dans le sang. Ils se répartissent dans tous les tissus de l'organisme, y compris le cerveau, car capables de traverser la barrière hémato-méningée pour protéger les

6 Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. Paiva-Martins, F., Gordon, M. H., & Gameiro, P. (2003). *Chemistry and Physics of Lipids*, 124, 26–34.

7 *In vitro* activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., & De Castro, A. (2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 680–686.

8 A comparison of antioxydant activities of Oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacin - Czerwin'ska, M., Kiss, A. K., & Naruszewicz, M. (2012). *Food Chemistry*, 131, 940–947.

cellules cérébrales. Ils sont totalement éliminés à la 3ème heure.

Les taux éliminés, 30% dans les urines, dépendent de la quantité absorbée.

Le pouvoir antioxydant des polyphénols

Si les polyphénols ont un pouvoir antioxydant, ils peuvent jouer un rôle protecteur et même préventif du vieillissement, ils arrêtent la propagation de l'oxydation.

Le pouvoir antioxydant est scientifiquement évalué par l'ORAC qui signifie "*Oxygen Radical Absorbance Capacity*" soit la capacité d'absorption des radicaux libres oxygénés. On parle de piègeurs de radicaux libres.

Les substances anti-oxydantes les plus connues sont :

- les polyphénols du vin et de l'huile d'olive
- les Vitamines C et E
- le Glutathion qui serait le roi des antioxydants [9].

La comparaison du pouvoir antioxydant des polyphénols d'Olivie plus 30X, exprimé pour les spécialistes en *micromoles TE/g (micromoles troloxequivalents (TE) per 100 gr)* donne les résultats suivants pour des molécules présentes dans des aliments d'origine végétale de l'alimentation méditerranéenne :

- Hydroxytyrosol = 40.000
- Resvératrol = 20.000
- Noix = 13.000
- Oleuropéine = 11.000
- Epicatéchine du thé vert = 8.000
- Extrait de grappe de raisin = 6.000

- Prune fraîche = 6.000
- Vin rouge de Cabernet Sauvignon = 4.500
- Grenade fraîche = 4.500
- Fraise fraîche = 4.300
- Pomme Granny fraîche avec la peau = 3.800
- Vitamine C = 2.000
- Thé vert - feuilles infusées = 1.200

Toutes les études expérimentales utilisant les globules rouges, les cellules intestinales en culture qui restent exposées en particulier au risque oxydatif, donc au vieillissement prématuré, sont protégées par les polyphénols de l'huile d'olive et d'autant plus qu'elle est fortement concentrée en polyphénols.

Le rapport Oméga 3/Oméga 6 en acides gras essentiels

Pour apporter l'équilibre en acides gras essentiels, Oméga 3/Oméga 6, l'idéal est d'ajouter dans son alimentation une petite ration d'huiles riches en oméga 3.

Evidemment des huiles première pression à froid: Soja avec ses 8% d'Oméga 3, Colza la moins chère avec ses 9% d'Oméga 3 ou encore trop chères, la Noix avec ses 10% d'Oméga 3, la Nigelle avec ses 23% d'Oméga 3, la Cameline avec ses 45% d'Oméga 3, la Périlla avec ses 65% d'Oméga 3. Toujours accompagnées d'une grosse ration d'huile d'olive.

2. Polyphénols de l'huile d'olive, un trésor pour la santé

L'huile d'olive est réellement bénéfique pour la santé. Elle intervient dans un grand nombre de pathologies.

Les polyphénols contre le vieillissement, l'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires et l'hypercholestérolémie

Les mitochondries sont comparées aux poumons d'une cellule. Elles produisent de l'énergie en convertissant les éléments nutritifs qui lui sont apportés en ATP (Adénosine Tri Phosphate) qui permet le fonctionnement normal et l'entretien de la cellule. La perte de la fonction des mitochondries est synonyme de vieillissement cellulaire.

Pour mon collègue le Pr Benlemlih :

« Le vieillissement est associé à une biogénèse mitochondriale réduite et à une accumulation de dommages mitochondriaux ».

Fort heureusement l'*Hydroxytyrosol*, un antioxydant de l'huile d'olive, augmente la formation des mitochondries. Il améliore la fonction mitochondriale en activant les complexes de la chaîne respiratoire dans la cellule. Il devient ainsi un agent de prévention du vieillissement et des maladies liées à l'âge.

Chez les rats traités avec cet antioxydant, on induit l'expression de protéines liées à la longévité des cellules cardiaques [1] [2].

Un autre antioxydant de l'huile d'olive, l'oléocanthal, a un effet fortement anti-inflammatoire, protecteur des maladies cardiovasculaires, et même anti-Alzheimer, en réduisant les

plaques bêta-amyloïdes du cerveau (selon des chercheurs de l'université de Louisiane).

En effet, en 2011, Daccache et ses collègues [3] ont montré que « *l'oleuropéine et ses dérivés hydroxytyrosol, oléopentandial, étaient capables d'inhiber l'agrégation des protéines Tau in vitro.* » Cette agrégation des protéines Tau constitue l'étape clé en cause dans le développement de l'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives.

Les mêmes auteurs ont signalé que ces composés peuvent être liés à la réduction du risque de la maladie d'Alzheimer ou des démences. L'alimentation méditerranéenne, caractérisée par la forte consommation d'huile d'olive, peut fournir une base chimique pour le développement des inhibiteurs de l'agrégation de protéines Tau.

Au niveau vasculaire, les polyphénols réduisent la présence des molécules d'adhérence cellulaire aux lipoprotéines athérogènes (LDL et petites VLDL [4]), diminuent l'agrégation des plaquettes à l'origine de caillots [5] et réduisent les réactions inflammatoires (diminution de la protéine C réactive en particulier).

Le Pr Benlemlih rappelle fort justement dans son livre les travaux de Singh et al., 2007 [6] : l'extrait de feuilles d'olivier contenant 4,5 mg/ml d'oleuropéine comme molécule active, serait capable d'inhiber l'activation des plaquettes isolées des individus sains. Les auteurs suggèrent que les polyphénols d'olive agissent en synergie pour réduire l'activation des plaquettes sanguines, ce qui pourrait être utile pour la prévention et le traitement de l'hyperplaquettose (trop de plaquettes) et d'autres maladies cardiovasculaires pour éviter les thromboses.

De même, l'extrait de feuilles d'olivier nommé *Oleaeuropaea* est capable de réduire l'hypertension artérielle de rats rendus hypertendus. Nous avons pu le vérifier en prescrivant des

tisanes de feuilles d'olivier séchées (une cuillerée à soupe bien tassée dans un verre d'eau frémissante).

N'ayez pas peur d'arrêter vos statines: voici comment l'expliquer à votre médecin !

Contre les taux excessifs de cholestérol, nul besoin des hypocholestérolémiants classiques (statines), responsables de tant d'effets secondaires [7] (sauf si vous avez une hypercholestérolémie familiale).

En effet, une enzyme régule le taux de cholestérol dans le sang: c'est l'HMG-CoA réductase. Les polyphénols de l'huile d'olive inhibent cette enzyme et jouent ainsi un rôle important pour prévenir les maladies liées aux excès de cholestérol. Les chercheurs n'ont pas encore défini la dose de polyphénols nécessaire [8].

Ainsi les composés phénoliques du régime méditerranéen (riche en huile d'olive) empêchent les événements biochimiques mis en cause dans la maladie athérogène, notamment l'oxydation des LDL [9]. D'où le lien fort et reconnu entre l'alimentation méditerranéenne et la prévention de la maladie coronarienne.

Evidemment l'arrêt des statines n'a de sens que dans la mesure où vous changez vos habitudes alimentaires, coaché s'il le faut pas un ou une spécialiste, indépendant des lobbies pharmaceutiques ou des produits laitiers.

Les polyphénols pour protéger des infections – y compris chez les séropositifs du Sida, très sensibles aux moindres infections

Contre les infections opportunistes chez les patients atteints ou non du Sida, l'*hydroxytyrosol* (présent dans l'huile d'olive) a démontré une activité antibactérienne dans les infections intestinales et respiratoires.

L'*oleuropéine* et ses dérivés (présents dans l'huile d'olive) empêchent ou retardent la croissance d'un large spectre de bactéries et de champignons, y compris ceux pathogènes pour l'homme.

Dans ce cadre, Medina et al. [10] (2006) ont montré le pouvoir bactéricide de l'huile d'olive contre les bactéries nuisibles de la flore intestinale (*Clostridium perfringens* et *Escherichia coli*) par rapport à d'autres huiles végétales (tournesol, colza, soja, maïs...).

Ces auteurs ont rapporté aussi que les bactéries pathogènes d'origine alimentaire (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Yersinia sp.*, *Shigella sonnei*) ne survivaient pas après une heure d'incubation dans l'huile d'olive.

Oléocanthal et *oléopentandial*, *hydroxytyrosol* et *tyrosol*, sont les composés phénoliques donnant à l'huile d'olive son effet antibactérien. Dans une étude similaire [11], l'activité antibactérienne de l'*oleuropéine* et de ses dérivés *hydroxytyrosol* et *tyrosol* a été comparée à celle de deux désinfectants commerciaux (pour les spécialistes : *glutaraldéhyde* et *ortho-phthalaldéhyde*).

Les résultats ont montré que l'activité antibactérienne des composés phénoliques d'olive était supérieure à celle exercée par plusieurs polyphénols d'origine alimentaire (catéchine, épicatechine, eugénol, thymol, carvacrol...).

Étonnamment, ces agents antimicrobiens naturels ont été aussi actifs que les biocides synthétiques utilisés comme témoins contre *Pseudomonas fluorescens* (bactérie qui contamine nos fromages), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (bactérie des environnements hospitaliers, de haute résistance naturelle aux antibiotiques), et *Escherichia coli*.

Les polyphénols pour stimuler l'immunité : le Sida et les cancers

Contre le virus du Sida

Oleuropéine et *Hydroxytyrosol* inhibent in vitro les transmissions du VIH-1 d'une cellule à l'autre ce qui ralentit considérablement la multiplication virale.

Ils pourraient être utiles associés aux nombreux médicaments du HAART (*Traitement Antirétroviral Hautement Actif*) afin de maintenir un meilleur statut immunitaire. Nul doute, qu'à toutes les personnes atteintes ou susceptibles de l'être par le virus du sida, on peut prescrire l'huile d'olive fortement concentrée en polyphénols.

La dose la plus élevée doit être choisie à raison de 6 gélules, 2 par 2, matin, midi et soir d'*Olivie Riche/Force*.

Contre les cancers

De larges études épidémiologiques ont montré que les personnes qui ont des habitudes alimentaires méditerranéennes font moins de cancers (côlon-rectum, corps de l'utérus, prostate, sein...) que celles qui suivent les conseils diététiques des publicités à la télé, destinées à stimuler les consommateurs dans leurs achats plus que dans leur santé.

L'avantage est lié à la consommation de végétaux (fruits, légumes, légumineuses, poissons et fruits de mer et au verre de vin rouge, mais il y a en plus l'huile d'olive...), qui dépasse nettement les produits d'origine animale (viandes rouges, charcuterie, produits laitiers...).

Evidemment les chercheurs ont essayé de voir l'impact des produits spécifiques à la terre méditerranéenne. Après le vin rouge qui a permis de définir le French Paradox, ils ont recherché les effets de l'huile d'olive contre les cancers.

Les études ont d'abord été orientées chez le petit animal tel que le rat blanc dit "Wistar" et en utilisant des cultures de cellules humaines cancéreuses de colon, de leucémie ou de cancer du sein (MCF-7).

Ainsi l'*Hydroxytyrosol* d'olive a récemment reçu une attention particulière en raison de ses activités antioxydantes, antiprolifératives, pro-apoptotiques (provoquant la mort spontanée des cellules cancéreuses) et anti-inflammatoires, qui peuvent en particulier lutter contre toutes les aspects du cancer [12].

Les spécialistes, par les résultats des études expérimentales, suggèrent qu'en plus des leurs effets antioxydants et anti-inflammatoires, l'*hydroxytyrosol* et les autres polyphénols d'olive exercent des effets anticancéreux par l'activation des voies de signalisation moléculaire, conduisant à l'induction de la mort ou à l'arrêt de la croissance de plusieurs lignées de cellules tumorales in vitro [13].

Ainsi un régime alimentaire contenant 15% d'huile d'olive, par rapport à l'apport alimentaire journalier normal, réduirait nettement les lésions précancéreuses du sein et du colon chez le rat [14] [15]. La même quantité d'huile de Soja, de Maïs ou de Palme n'a pas le même effet protecteur. Même conclusion avec l'huile de Carthame dans des conditions expérimentales similaires [16].

In vitro, on observe avec l'*Oleuropéine* et l'*Hydroxytyrosol* un effet antiprolifératif par apoptose (mort des cellules cancéreuses) plus précoce, et une réduction de la formation des produits de l'oxydation responsables en partie de la cancérogénèse.

Une étude épidémiologique grecque chez 14 807 femmes [17] a aussi permis d'observer une réduction des risques de cancer du sein chez les femmes fortes consommatrices des aliments de la Méditerranée.

Avec un bémol cependant : les auteurs remarquent un biais important, à savoir la plus faible consommation d'hormones (pilule et traitements substitutifs de la ménopause) dans ce pays.

Les polyphénols contre les maladies auto-immunes: diabète, obésité, des rhumatismes à l'Alzheimer et maladies de la peau

L'*oleuropéine* s'est avérée être un antioxydant efficace doté de propriétés anti-inflammatoires.

Dans les cas de **diabète**, des études expérimentales utilisant des polyphénols à forte dose (20 mg/kg/jour) pendant 2 mois chez des rats diabétiques, ont montré une diminution de la glycémie de 55 % [18].

L'enquête menée sur 20 343 sujets dans la cohorte de l'EPIC (Prospective Européenne sur les relations cancer et nutrition) a démontré que se nourrir selon les habitudes méditerranéennes est inversement proportionnel à l'incidence de l'**hypertension artérielle** [19] et de ses conséquences.

Par comparaison, le régime de la modernité qui associe les acides gras des viandes rouges, le beurre, les 3 à 4 produits laitiers par jour et le pain hyper concentré en mauvais gluten, favorise les maladies de civilisation.

Nous sommes à un tournant pour notre Santé et notre Economie. Nous devons choisir : manger moins et mieux et notre portefeuille ne s'en portera que mieux. N'oubliez pas que les plats industriels les moins chers, préparés "discount", mauvais pour notre santé, reviennent plus chers que les fruits et légumes pour une famille.

En plus des atteintes cardiovasculaires très coûteuses en terme de santé – **infarctus et artérite** , il y a de plus en

plus de maladies rhumatologiques dites de longue durée (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante...).

Chez 90 patients, 27 atteints de **polyarthrite rhumatoïde**, randomisés (tirés au sort de manière aléatoire) en consommant ou non un traitement par à 6 mg d'Hydroxytyrosol par jour pendant 8 semaines soit 2 grandes cuillères d'*Olivie plus 30X* ou – avant chaque repas – 4 gélules de 500mg chacune d'*OlivieForce* ou *OlivieRiche* par jour. Cela correspondait à une dose quotidienne de 2,0 g d'extrait d'olivier *Olivie Riche/ Olivie Force*. Le groupe témoin a reçu les mêmes capsules mais remplies uniquement de maltodextrine.

Les résultats de cette première étude clinique randomisée sont statistiquement significatifs [20] tant au niveau des signes cliniques que des marqueurs de l'inflammation.

Annnonce spéciale de Jean-Marc Dupuis de Santé Nature Innovation :

L'art de se soigner par les plantes

Les infusions de carvi ou d'anis étoilé sont très efficaces contre le mal de ventre; l'huile essentielle de gaulthérie couchée remplace efficacement un anti-inflammatoire non-stéroïdien; l'ail et et les feuilles d'olivier modulent l'hypertension artérielle... Retrouvez tous les conseils pour vous soigner efficacement et naturellement grâce aux plantes ici.

Face au **syndrome hypermétabolique**, on a pu suivre 38 patients avec l'*Hydroxytyrosol* pendant 6 mois soit 2 cuillères d'*Olivie plus 30X* ou 3 capsules d'*Olivie force* par jour pendant 6 mois.

Les maladies de la peau telles lupus, sclérodémie, psoriasis, sont liées à des dysfonctionnements immunologiques menant à une inflammation chronique. On peut donc envisager l'utilisation des bio-extraits d'olive riches en polyphénols

puissants (Hydroxytyrosol et Oléopentandial) pour soulager les symptômes de ces maladies.

Vers le « Mediterranean paradox »: vin, huile d'olive et froment

En plus de toutes les vertus santé ci-dessus présentées, l'huile d'olive peut être appliquée sur la peau au niveau des zones psoriasiques (d'une moitié du corps afin de comparer avec l'autre côté) et en plus consommée à raison d'une cuillerée à soupe matin et soir dans les salades.

Si vous n'aimez pas l'huile d'olive, prenez trois gélules d'huile d'olive matin, midi, et soir pendant plusieurs mois. Ma préférence va pour Olivie force et Olivie riche [21].

Dans les autres maladies auto-immunes qui sont les trop fréquentes maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, sclérose en plaques et sclérose latérale amyotrophique...), il faut essayer le régime méditerranéen.

Les traitements conventionnels pour les maladies auto-immunes sont inefficaces, lourds, coûteux, et provoquent de nombreux effets secondaires. Par comparaison, le régime méditerranéen n'est pas risqué, il ne coûte presque rien, et vous pouvez commencer immédiatement.

Dans les pays méditerranéens, on associe naturellement l'huile d'olive à tous les repas. En combinant les antioxydants d'huile d'olive et ceux du vin (French Paradox) au quotidien, on obtient le « Mediterranean paradox » [22] – le paradoxe méditerranéen. Une alimentation malsaine en apparence (graisse et alcool) qui vous garde en bonne santé.

Le mariage vin à dose modérée et huile d'olive peut être reconnu comme patrimoine culturel de l'humanité au service de la santé.

Nous y ajouterons le pain fabriqué avec les semences de froment ancien, le meilleur pour la santé, qui fera l'objet du livre *Le Pain et le chirurgien* que je publie prochainement avec le boulanger de Cucugnan.

Toujours à votre service, pour votre santé,

Pr Henri JOYEUX - Chirurgien Cancérologue

Spécialiste international de la Prévention
par la Nutrition des maladies de civilisation
Faculté de Médecine de Montpellier

Sources:

[1] *Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, hydroxytyrosol – Mukherjee S. et al – Free radical Biology and Medicine 2009, 46: 573-578*

[2] *Use of hydroxytyrosol as anti-aging agent. Raederstorff D, Wang-schmidt Y, Wertz K (2010). Pub. No.: US 2010/0130621 A1.*

[3] *Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotelle P. Neurochemistry International. 2011, 58(6): 700-7.*

[4] *Les radicaux libres sont responsables de l'oxydation des LDL plasmatiques en oxLDL qui activent les réactions inflammatoires et les réactions chimiques favorisant les dépôts de plaques d'athérome sur les parois des artères.*

[5] *Effet identique à l'Aspirine.*

[6] *The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. Singh I, Mok M, Christensen AM, Turner AH, Hawley JA. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease. 2008, 18(2):127-32.*

[7] *Douleurs et faiblesses musculaires, problèmes hépatiques avec augmentation des Gamma GT ou, moins connus, des cataractes. Plus récemment on signale officiellement l'augmentation du risque de diabète et de troubles cognitifs (confusion, perte de mémoire).*

[8] *Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. Benkhalti F, Prost J, Paz E, Perez-Jimenez F, El Modafar C, El Boustani E. Nutrition Research. 2002, 22: 1067-1075.*

[9] Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. *Free Radical Biology and Medicine*.1996, 20: 933–956.

[10] Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. Medina E, De Castro A, Romero C, Brenes M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, 4954–4961.

[11] Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products. Medina E, Brenes M, Garcia A, et al. *Journal of Food Protection*. 2009, 72, 2611–2614.

[12] Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of in vitro studies. Casaburil, Puoci F, Chimento A, Siriani R, Ruggiero C, Avena P, Pezzi, V. *Mol. Nutr. Food Res*. 2013, 57, 71–83.

[13] Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. *Food Chem. Toxicol*.2011, 49, 179–184.

[14] Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L et al. *Int J Cancer*.1994, 58:774–780.

[15] Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. Corona G, Deiana M, Incani A et al. *BiochemBiophysRes Commun*. 2007, 362: 606–611.

[16] The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. Owen R. et al.: *European Journal of Cancer* 2000, 36, 1235-1247

[17] Conformity to traditional Mediterranean diet and breast cancer risk in the Greek EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) cohort – 2010 American Society for Nutrition – Antonia Trichopoulou, Christina Bamia, Pagona Lagiou, and Dimitrios Trichopoulos

[18] Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions* 180 (2009) 421–432.

[19] Mediterranean Diet and Incidence of and Mortality From Coronary Heart Disease and Stroke in Women – Teresa T. Fung, Kathryn M. Rexrode, Christos S. Mantzoros, JoAnn E. Manson, Walter C. Willett, Frank B. Hu – *Circulation*. 2009; 119: 1093-1100

27 Olive extract supplement decreases pain and improves daily activities in adults with osteoarthritis and decreases plasma homocysteine in those with rheumatoid arthritis – Catherine M. Bitler and al. *Nutrition Research* 27 (2007) 470–477

[20] Effet de l'extrait d'olivier, riche en polyphénols, OLIVIE RICHE / OLIVIE FORCE, sur l'inflammation et la douleur chez les patients souffrant d'arthrite

rhumatoïde: une étude clinique randomisée en double aveugle contre placebo d'une durée de 8 semaines- Benlemlih M. Ghanam Jamal – Dhar El Mahraz, P.O. Box 1796, Fès, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès, Maroc. Laboratoire de Biotechnologie de la Faculté des Sciences

[21] Vous les trouverez en France et en Europe chez NATURAMedicatrix et au Maroc chez Atlas Olive Oil

[22] 28 « L'Olivier et le chirurgien » en préparation et parution 2015 – Pr H. Joyeux et Pr M. Benlemlih



ANALYSE ET CERTIFICATIONS

Huile d'olive, naturellement riche en polyphénols.

Les analyses de l'huile d'olive extra vierge «OLIVIE Plus» produite par la compagnie ATLAS OLIVE OILS, ont montré qu'il s'agit d'une huile naturellement riche en polyphénols et plus particulièrement en hydroxytyrosol à une concentration de 216 mg/kg, et en tyrosol à une concentration de 186 mg/kg (fig. 1). Environ 30 fois plus riche qu'une huile d'olive extra vierge en hydroxytyrosol et en tyrosol. Les teneurs en polyphénols et dérivés peuvent varier selon les fluctuations normales des valeurs des produits d'origine naturelle. Notre huile olive naturellement riche en polyphénols Olivie Plus est certifiée Bio (fig.2).

Le tableau 1 montre les teneurs en hydroxytyrosol et en tyrosol des 22 échantillons d'huile d'olive vierge conventionnelle de quatre pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive *Hrneirik et Frische (2004)*.

Ci-joint le certificat d'analyse de l'huile délivré par un laboratoire italien de grande réputation. Les résultats de la figure 1 montrent clairement que *Olivie Plus* est l'huile d'olive extra vierge la plus saine au Monde. Elle regorge exceptionnellement de polyphénols (*Hydroxytyrosol et Tyrosol*), de plus, elle est douée d'une forte activité antioxydante.

Ces caractéristiques exceptionnelles et uniques de l'huile d'olive *Olivie Plus* proviennent d'oliviers plantés dans un désert de rocaille (fig. 3 et 4). Tout comme la vigne, il est bien connu que l'olivier a besoin de souffrir pour produire le meilleur de lui-même. Vu l'environnement très chaud (jusqu'à 50°C en été), le sol rocailleux où les racines ne peuvent se développer aisément, le manque d'eau, les oliviers se stressent. Il se produit un phénomène de panique dans les olives (instinct de survie) qui se traduit par une production élevée de polyphénols (anti-oxydants), et plus particulièrement, en Hydroxytyrosol et Tyrosol (auto-défense).

Chers lecteurs, pour vous convaincre de la qualité de notre huile, voici deux certificats intéressants.



CM EUROPA S.L.
know-how oleícola
 www.cmeuropa.com

Laboratorio Particular Autorizado por el Consejo de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía S.I.A. 100/AL Empresa Colaboradora del Ministerio de Medio Ambiente (Grupo 2). C.I.F. 9-23.355.902

INFORME DE RESULTADOS

Página 1 de 1

Fecha recepción: 18/04/2017 Fecha inicio análisis: 25/04/2017
 Muestra de : Aceite de oliva Fecha fin análisis: 02/05/2017
 Contenida en : Bote de plástico de 250ml cerrado con precinto plástico
 Etiquetado: OLIVE PLUS 30X LOT N° OTA2903/CP
 Remitida por: NATURAMEDICATRIX
 39 AVENUE DU CENTENAIRE B-4053 EMBOURG (BELGICA)
 N° de registro: O17/1824/4960

Procedimiento	Determinaciones realizadas	Resultados
CM-PE5/04/24	POLIFENOLES TOTALES (mg/Kg)	1028
CM-PE5/04/39	TIROSOL Y DERIVADOS (mg/Kg)	185,2
CM-PE5/04/39	HIDROXTIROSOL Y DERIVADOS (mg/Kg)	215,5

¹ La incertidumbre de la técnica está calculada y a disposición de los clientes que la solicitan.
 Resultados sin validez oficial
 Los resultados están referidos a la muestra analizada, C.M.EUROPA no se responsabiliza de la toma de muestra si no se indica lo contrario.
 Queda prohibida la reproducción total o parcial de este boletín sin el permiso explícito de CM EUROPA, S.L.

CM EUROPA S.L.
Laboratorio

CM EUROPA S.L.
Registros

CM EUROPA S.L.
Formación



Pedro J. Vilchez
 Responsable Técnico

Cruce Ctra. Fuensanta - La Comosa, s/n. | Polígono Industrial Cañedo de la Fuente | 23600 MARTOS (Jaén - ESPAÑA)
 Centralita 953 70 40 35 - Fax 953 70 30 20 | Móvil Comercial 629 55 51 91 | www.cmeuropa.com | cmeuropa@cmeuropa.com

Figure 1. Analyse de laboratoire de l'huile d'olive naturellement riche en polyphénols *Olivie Plus*.

Commentaires: vous y lisez l'hydroxytyrosol à la valeur 216, soit 30 x plus concentré que pour une huile d'olive classique.

M. 115 rev. 04



Organic Products Certificate

number
EUI66VCC

product certificate of organic operation according to
BAC Equivalent Organic Standard
(reg. 834/07 art. 33.3)

issued to

ATLAS OLIVE OILS

110 BD YACOB EL MANSOUR, CASABLANCA - 20370 MOROCCO (MA)

kind of firm
Farm Processor

control code
MA BIO 132 I66V

list of authorized products
category - name - qualification

10.41.2 EXTRA VIRGIN OLIVE OIL	organic
01.28.1 OLIVES	organic

Conditions to put products on the market:

- a) The "Transaction Document of organic products" (DTPB), which declares the conformity with the reference standard and ensures regular information towards Bioagricert, should always accompany the transactions between controlled operators. If the DTPB is issued after the transaction, the declaration of conformity shall be reported on the sales documents.
- b) Prepacked products can be put on the market only after Bioagricert approves the label and after they are identified with a control code.

period of validity for all products

from - 09/12/2017 to 09/12/2018

Certification Committee

ALESSANDRO LOMBARDI



La passione per la qualità certificata
 A passion for quality certified
 Le passion pour la qualité certifiée
 認証された品質への情熱
 認定された品質への情熱
 認定された品質への情熱



Bioagricert S.r.l
www.bioagricert.org
Via dei Macabreccia, 8 - 40033
Casalecchio di Reno (Bo) Italy
info@bioagricert.org
Organismo di Controllo ai sensi
del D.M. 28/07/2002 n° 91622

This certificate has been issued on the basis of art. 29, paragraph 1 of EU Reg. 834/07 and art. 68 of EU Reg. 809/08
The certificates and the transactions can be checked via web on www.bioagricert.org and www.trasparenza-check.com as indicated on the sites.
The operator is responsible for putting products on the market and for the conformity statements.

Pag. 1/1

Figure 2. Certificat Bio européen de l'huile d'olive naturellement riche en polyphénols *Olivie Plus*.

Commentaires: depuis 2015, Atlas Olive Oils, premier producteur d'olive bio certifiée par les organismes marocains, a aussi son attestation bio validée par les certificats européens.

Maroc	OPA	216	186
Tunisie	Moy	13,0	13,1
	22	10,9	6,3
	21	7,6	7,8
Grèce	20	11,2	15
	19	20,5	19,5
	18	18,9	11,9
	17	15,5	13,0
	16	6,6	10,5
	15	11,9	22,8
	14	1,4	10,8
	13	12,9	10,2
	12	14,7	9,1
	11	5,5	7,5
	10	9,2	7,8
	9	19,4	16,4
Espagne	8	14,6	6,3
	7	7,2	12,7
	6	18,9	6,1
	5	10,1	7,5
	4	8,7	17,1
	3	16,3	15,8
	2	10,0	9,0
Italie	1	7,4	8,2
		HT	T

Tableau 1. Comparaison du taux (mg/kg) de l'hydroxytyrosol (HT) et du tyrosol (T) entre 22 échantillons d'huile d'olive des pays méditerranéens et celui de notre huile « OLIVIE Plus ».

ILLUSTRATIONS

Les plantations d'Olivie



Figure 3. Désert de rocaille, Maroc.



Figure 4. Oliveraie au milieu du désert de rocaille au Maroc.

Atlas Olive Oils vous propose en plus d'Olivie Plus 30X Bio, 2 produits différents, l'un sous forme de gélules, l'autre sous forme de perles. Ces 2 produits s'appellent respectivement Olivie Riche et Olivie Perles d'Oliviers du Désert (Tableau 2).

- **Olivie Riche** (nommé Olivie Force au Maroc) est la traduction d'Olivie Plus 30X Bio sous forme gélules. C'est un complément alimentaire obtenu naturellement à partir de feuilles d'oliviers, d'olives et de branches d'olivier par extraction physique, sans additifs et sans utilisation de solvants. Il est 1300 fois plus riche en polyphénol par rapport aux huiles d'olive traditionnelles et 45 fois plus concentré en hydroxytyrosol par rapport à Olivie Plus 30X Bio. Plus de 90% de ses composants sont issus de l'agriculture biologique.
- **Olivie Perles d'Oliviers du Désert bio** est 62 fois plus riche en hydroxytyrosol qu'Olivie Plus 30x Bio et 1900 fois plus riche en hydroxytyrosol par rapport à une huile d'olive classique. La structure en perles est le résultat d'un savoir-faire spécifique et de différentes techniques de fabrication naturelles et secrètes qui concentrent les polyphénols de l'olive jusqu'à l'obtention d'une pâte épaisse. In fine, cette technique rarissime permet de concentrer les composants bénéfiques de l'huile d'olive, de ses olives, de ses jeunes bourgeons et ses feuilles, dans des perles fortement dosées en polyphénols.



Tableau 2. Comparatif des produits Olivie

	Huile d'olive traditionnelle	Olivie Plus 30x Bio	Olivie Riche / Force	Olivie Perles d'Oliviers du Désert
Allegations et bienfaits pour la santé	—	Protection des lipides contre le stress oxydant ¹		
Lieu de culture des Oliviers	—	Cholestérolémie normale ²		Wlémie normale ²
	Espagne, Italie, Grèce	Oliviers plantés au sein d'un désert de rocailles niché au pied de l'Atlas marocain à El-Borrouj, au Maroc.		
Polyphénols totaux* dont:	253 mg/kg 1,2 mg/5g (= 1 c. à café)	1 028 mg/kg 5,14 mg/5g (= 1 c. à café)	139 700 mg/kg 139,7 mg/g (= 2 gélules)	55 000 mg/kg 275 mg/5 g (= 1 c. à café)
Hydroxytyrosol*	± 0,035 mg/5 g = 7 mg/L	± 1,08 mg/5 g (= 1 c. à café) ± 30 fois plus riche par rapport à une huile d'olive traditionnelle.	± 45 mg/g (= 2 gélules) 2 gélules = 7 L d'une huile d'olive traditionnelle. ± 42x plus riche par rapport à Olivie Plus 30x Bio.	± 67 mg/5 g 1 c. à café = 9 à 10 L d'une huile d'olive traditionnelle. ± 62x plus riche par rapport à Olivie Plus 30x Bio
Tyrosol*		185,2 mg/kg = 0,93 mg/5 g	A analyser	16 mg/5 g
Oléaceine*		A analyser	Voir oléocanthal**	7 mg/5 g
Oleuropéine	Faible teneur	A analyser	45 mg/g	A analyser
Oléocanthal*		A analyser	34 mg/g	Voir oléaceine**
Portion et durée	La portion à consommer pour obtenir la même quantité de polyphénols que les produits Olivie devrait être très élevée, et donc la durée de consommation moins longue.	50 cuillerées	50 portions (2 gélules)	68 cuillerées
Posologie conseillée		1 c. à café à 1 c. à soupe/jour	1 à 6 gélules/jour	1 c. à café à 2 c. à soupe/jour

1) Les polyphénols de nos Olivie contribuent à protéger les lipides sanguins contre le stress oxydant. L'allégation ne peut être utilisée que pour de l'huile d'olive contenant au moins 5 mg d'hydroxytyrosol et ses dérivés (comme le complexe oleuropeïne et le tyrosol) pour 20 g d'huile d'olive.

→ Nous dépassons largement le dosage de polyphénols nécessaires pour avoir l'effet en protection cardiovasculaire !

2) Le remplacement des graisses saturées dans l'alimentation quotidienne par les graisses insaturées d'Olivie permet de favoriser une cholestérolémie normale.

* Les teneurs en polyphénols et dérivés peuvent varier selon les fluctuations normales des valeurs des produits d'origine naturelle.

** L'oléocanthal et l'oléaceine sont des formes conjuguées de l'hydroxytyrosol et du tyrosol qui diffèrent uniquement par un groupe hydroxyl (-OH). L'oléaceine possède seulement un groupe OH en plus par rapport à l'oléocanthal.

● ● ● 1^{RE} PARTIE |

Généralités sur l'olivier
et l'huile d'olive

CHAPITRE 1

L'Olive, un fruit grassement pourvu de nutriment santé

1. Origine

L'olivier, arbre spécifique du bassin méditerranéen, a été depuis la nuit des temps considéré comme symbole de la sagesse, de la paix, de la richesse et de la gloire. Cet arbre parfaitement adapté au climat tempéré, aux sols rocheux et calcaires, ne nécessite pas d'apport de fertilisants. Originaire de la Syrie, l'Asie Mineure, l'Éthiopie, l'Égypte ou l'Inde. La Crète, le Péloponèse, les régions côtières de la Grèce, les îles de l'Égée orientale, tels que Lesbos, Samos et Thasos, et les îles Ioniennes possèdent tous des oliveraies. De même, l'olivier est largement répandu à Chypre, les côtes de la Turquie, la Syrie, Liban, Palestine, le sud de l'Espagne, la France et l'Italie. 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 Algérie du sud, Australie, Japon, dans certaines régions de la Chine (*Ryan et Robards, 1998*) et en Argentine (*COI, 2010*).

2. Historique

La culture des oliviers, ainsi que la production et l'utilisation d'huile d'olive ont été des pratiques bien connues et établies dans la région méditerranéenne il y a plus de 7000 années (*Tsagaraki et al., 2004*).

L'histoire ne nous renseigne pas sur l'existence de l'utilisation des produits de l'olivier par les habitants de

la mer Egée. Néanmoins, il semble possible qu'au moins depuis l'époque néolithique, à savoir depuis 8000 A.J., le fruit oléastre a été occasionnellement cueilli avec d'autres fruits sauvages comestibles pour compléter l'alimentation quotidienne. La palynologie, une science relativement nouvelle qui étudie les grains de pollen, a révélé la présence de pollen d'oléastre vers la fin de l'âge néolithique, environ 3200-3100 A.J. en Kopais, Thessalie et en Crète.

Les principes de la culture de l'olivier ont été apparemment découverts et formulés un certain temps plus tard, à un moment donné dans le troisième millénaire A.J, au début de l'âge du bronze. Les Crétois étaient en contact avec les civilisations de la Méditerranée orientale et l'Afrique du Nord, où l'olivier a déjà été domestiqué. Ce contact a abouti à la diffusion de la connaissance de l'oléiculture en Crète.

Les archéologues suggèrent que les premières cultures d'olivier se sont répandues à l'Age du Bronze. Au cours de cette période, la gestion des populations d'olive, l'élagage intentionnel et sélectif ont été probablement réalisés par l'homme pour rajeunir l'olivier, afin de favoriser la production de fleurs et de fruits.

3. Caractéristiques de l'olivier et de son fruit, l'olive

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen, de 6 à 8 m de hauteur, à tronc tortueux et à écorce grisâtre et crevassée. Les feuilles sont blanches argentées sur la face inférieure, vertes grisâtres sur la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces et lancéolées. Les fleurs, petites et blanches, à quatre pétales, sont réunies en grappes dressées.

L'olivier est le nom commun d'environ 35 espèces d'arbustes et d'arbres du genre *Olea*. Le nom est particulièrement utilisé pour l'espèce *Olea europaea*. L'origine botanique de

cet arbre et le début de sa culture ont été un sujet de litige (Anon, 1983; Loukas et Krimbas, 1983; Blazquez, 1996).

Des 35 espèces connues du genre *Olea*, *O. Chrysophylla*, trouvée en Asie et en Afrique est considéré comme l'ancêtre de l'olivier. Cependant, une autre théorie existe et selon laquelle l'ancêtre est l'olivier méditerranéen sauvage, *Olea oléastre* (Loukas et Krimbas, 1983). D'autres considèrent *Olea oléastre* comme intermédiaire dans le développement de l'olivier sauvage *Olea chrysophylla* à *Olea europaea* (Blazquez, 1996; Lavee, 1996).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dialypetales</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Oleaceae</i>
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europaea L</i>
Sous-espèces	<i>O.europaea subsp.europaea var sylvestris</i> <i>O.europaea subsp.europaea var. europaea</i>

Tableau 3. Situation botanique de l'espèce *Olea europaea L.*

L'olive est une drupe de forme ovale constituée d'un péricarpe et d'un endocarpe. Elle pèse de 2 à 12 g, bien que certaines variétés puissent peser jusqu'à 20g. Le péricarpe comprend deux parties: l'épicarpe (la peau) et le mésocarpe (la pulpe) qui représente environ 65-83 % du poids total.

L'endocarpe (noyau) représente 13 % à 30 % du poids total. L'épicarpe est couvert de cire et passe du vert clair au noir quand le fruit mûrit.

La composition chimique moyenne de l'olive est la suivante (fig. 5): l'eau, 50 %; huiles 22 %; polyphénols 1,5 %; protéines 1,5 %; sucres 18 %; cellulose 5,5 %; minéraux (cendres) 1,5 %. D'autres constituants importants sont les pectines, les acides organiques, les pigments et les glycosides de phénols.

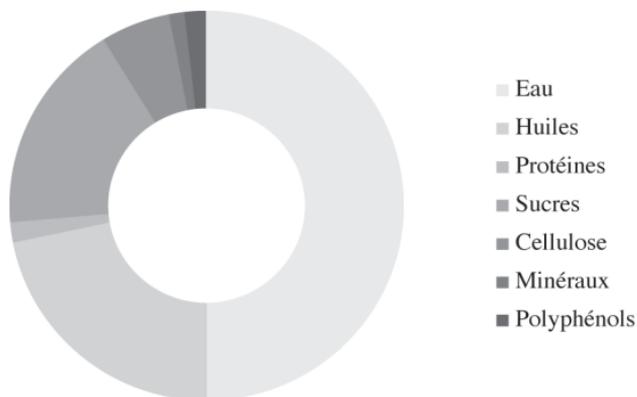


Figure 5. Composition chimique du fruit, l'olive.

3.1 Stades de maturation

L'augmentation du poids du fruit est remarquable au cours des différentes phases jusqu'en octobre ou mi-novembre. Ensuite, le poids du fruit commence à diminuer, essentiellement en raison de la perte d'humidité. Par conséquent, une augmentation de la teneur en huile est observée, généralement, à partir du mois d'octobre jusqu'au mois de décembre. L'accumulation de l'huile débute fin juillet à début d'août. Au cours de l'automne et de l'hiver, le fruit devient noir et la teneur en huile atteint son maximum. L'huile est principalement concentrée dans le péricarpe (96-98 %).

La première étape de maturation (fig. 6), fin mai/juin-août, est connue sous le nom du stade « Vert » pendant lequel la taille du fruit augmente considérablement. Ensuite, la couleur des fruits vire au rouge-violacé, puis au noir. C'est le stade de la véraison qui survient à la mi-octobre. La teneur en polyphénols de l'olive est maximale au début de la véraison quand l'olive présente une couleur vert-rouge violacée.

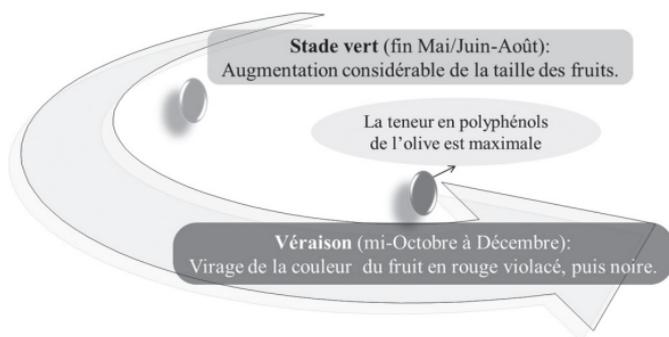


Figure 6. Stades de maturation de l'olive.

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 culturelles. 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 ses collègues (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 %) (fig. 7).

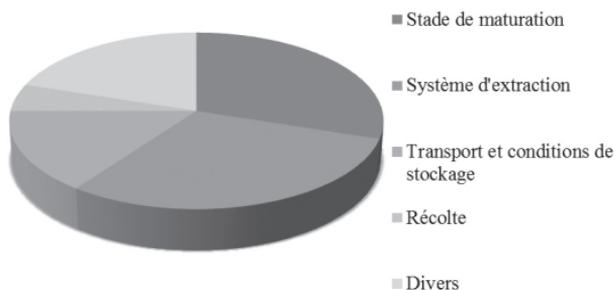


Figure 7. Différents facteurs influençant la qualité de l'huile d'olive.

Diverses méthodes ont été proposées pour déterminer le stade de maturité des olives. Parmi celles-ci, on cite la détermination du ratio d'absorbance de la pâte d'olive en spectrophotométrie dans la région visible à deux différentes longueurs d'onde (665 nm et 525 nm). Le Conseil Oléicole International (1984) a proposé une technique simple basée sur l'évaluation de la couleur de 100 olives extraites, au hasard, à partir d'1 kg de l'échantillon. Pour calculer l'indice de maturation, la formule suivante est utilisée :

$$\text{Maturation} = \frac{(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + \dots (7 \times n_7)}{100}$$

Où $n_0, n_1, n_2, \dots, n_7$, sont le nombre d'olives appartenant à chacune des huit catégories suivantes (fig. 8) :

- 0 = Olives dont la peau est d'une couleur profonde ou vert foncé.
- 1 = Olives dont la peau est de couleur jaune ou jaune-vert.
- 2 = Olives dont la peau est de couleur jaunâtre avec des taches rougeâtres.
- 3 = Olives dont la peau est rougeâtre ou de couleur violet clair.
- 4 = Olives dont la peau est noire et la chair est encore complètement verte.

- 5 = Olives dont la peau est noire et la chair de couleur vert-violet.
- 6 = Olives dont la peau est noire et la chair est d'un violet presque tout au long du noyau.
- 7 = Olives dont la peau est noire et la chair est complètement noire.

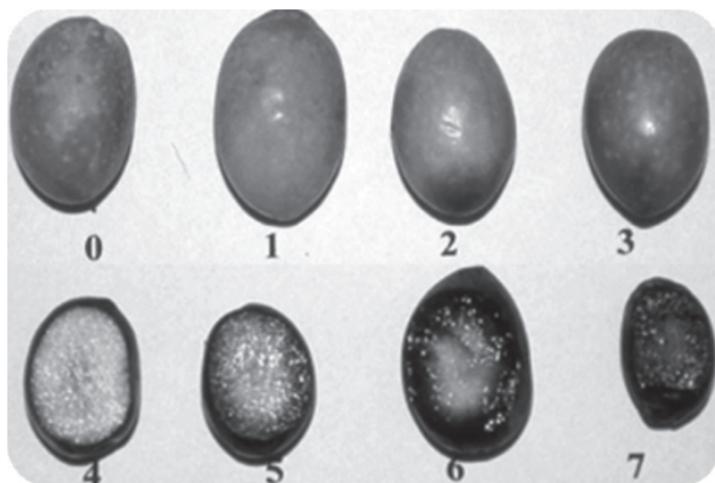


Figure 8. Les indices de maturation du fruit d'olive.

Selon cette approche, la meilleure période de récolte de l'olive correspond à la valeur de l'indice de maturation de 5. Cet indice a une valeur relative et son utilisation ne peut être généralisée puisque sa valeur peut être affectée par plusieurs facteurs tels la variété d'olive, la zone de culture et les conditions climatiques. Ainsi, l'indice de maturation peut être calculé dans les différents pays producteurs, en corrélant la valeur de maturation des olives provenant de certaines zones à la qualité de l'huile qui est produite et aux taux de composés phénoliques. En règle générale, la teneur maximale en polyphénols des fruits d'olive est atteinte au début de la véraison. Par conséquent, la décision de produire des olives plus douces avec une teneur plus élevée en huile

ou une huile plus piquante, est fortement dépendante de période de la récolte qui est le facteur le plus déterminant de la composition et de la qualité sensorielle.



CHAPITRE 2

Du fruit d'olive à l'huile d'olive

L'huile d'olive, pur jus de fruit, est saine et conseillée par les nutritionnistes. Sachez comment elle est fabriquée pour mieux la choisir !

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*).

1. Principe de l'extraction

L'objectif idéal de toute méthode d'extraction consiste à produire la plus grande quantité d'huile possible sans altération de sa qualité d'origine. Toutefois, si la qualité ne doit pas être modifiée, il est nécessaire d'utiliser uniquement des méthodes mécaniques ou physiques pour extraire l'huile, en évitant les réactions chimiques et enzymatiques qui pourraient changer sa composition naturelle. Le schéma

de l'extraction récemment mis en œuvre comprend quatre opérations principales :

1. Nettoyage des fruits (défoliation, lavage des olives);
2. Préparation de la pâte (broyage, malaxage);
3. Séparation de la phase solide (grignons) et liquide (huile et eau de végétation);
4. Séparation des phases liquides (huile / eau de végétation).

1.1 Nettoyage des fruits

Le nettoyage comporte deux opérations: l'effeuillage et le lavage. Les défoliateurs aspirent les feuilles, les brindilles et les saletés à travers un flux d'air puissant généré par un ventilateur d'extraction. Après quoi, les olives sont lavées par un courant d'eau.

1.2 Broyage

Cette opération est destinée à broyer les cellules de l'olive et à libérer les gouttelettes d'huile contenues dans la vacuole. Du point de vue pratique, il est impossible de broyer toutes les cellules, et par conséquent, d'extraire toute l'huile qu'elles contiennent. D'autre part, les gouttelettes sont entourées d'une pseudo-membrane amphotère qui tend à maintenir l'huile dans un état d'émulsion, dont la stabilité dépend de la taille des gouttelettes: plus elles sont petites, plus elles sont stables. En outre, une petite quantité d'huile reste pris dans le système colloïdal formé par les pectines dans la pâte.

1.3 Malaxage

L'huile doit être extraite par des moyens mécaniques et doit être libérée à partir des tissus de telle sorte que les

gouttelettes peuvent fusionner en gouttes plus grosses jusqu'à ce qu'elles forment ce qu'on appelle les « poches ».

Le malaxage est fondamental pour augmenter le rendement de l'extraction. Il est conçu pour renforcer l'effet d'écrasement et d'uniformiser la pâte. Son premier objectif est de briser l'émulsion huile/eau de sorte que les gouttelettes d'huile se rassemblent pour former des gouttes plus grosses.

Di-Giovacchino (1989, 1996) a étudié le pourcentage de taille des gouttes d'huile dans la pâte broyée. Après broyage, seulement 45 % des gouttes ont présenté un diamètre de plus de 30 microns, qui est la taille minimale pour la séparation de l'huile en système continu, alors que ce pourcentage s'élève à 80 % après malaxage, avec une augmentation concomitante du nombre de gouttes de grand diamètre (fig. 9a et 9b).

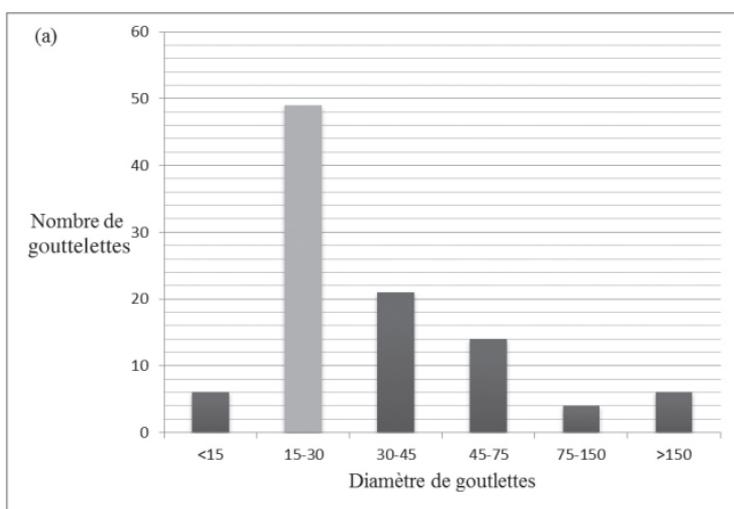


Figure 9a. Pourcentages des tailles des gouttes d'huile dans la pâte, après broyage (a). (*Di Giovacchino et al., 2002*).

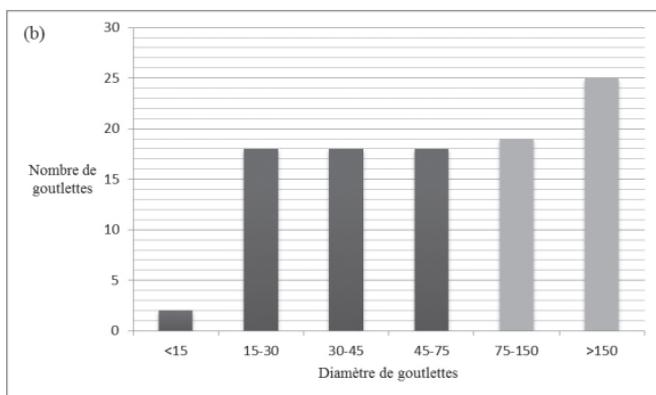


Figure 9b. Pourcentages des tailles des gouttes d’huile dans la pâte, après malaxage (b) (*Di Giovacchino et al., 2002*).

1.4 Séparation de la phase liquide et solide

Le broyage et le malaxage aboutissent à la formation d’une pâte qui contient de la matière solide et des fluides. La matière solide appelée **grignon** est constituée de débris de noyaux, d’épiderme, de parois cellulaires...etc., alors que la partie fluide est composée d’huile et d’eau de végétation appelée **marginé**.

La séparation des grignons du mélange huile/eaux de végétation fait appel à des systèmes de pression, de centrifugation et de percolation (*Caputo et al., 2003*). Au cours de ces étapes, différents appareils fonctionnant selon les principes des forces physiques sont utilisés.

Système à presse

Ce sont des systèmes classiques par pression à l’aide de broyeurs. Le broyage des olives suivi du malaxage se font sous des meules. Une pâte est obtenue au bout d’une demi-heure environ. Elle est composée de grignon et d’un moût

contenant l'huile et les margines. La séparation des deux phases solide-liquide se fait par simple pression, alors que l'huile est séparée des margines par décantation naturelle.

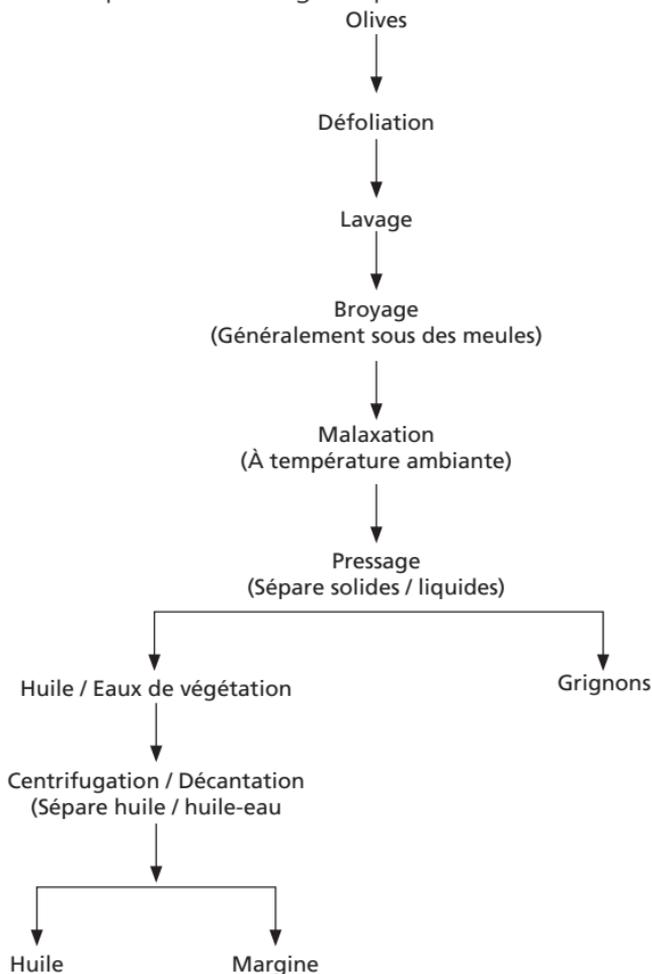


Figure 10. Extraction de l'huile d'olive par le système de presse traditionnel.

Aujourd'hui, l'extraction par pression (fig. 10) est effectuée en super-presses hydrauliques avec une pression allant jusqu'à 400 atm. Le système super-presse fonctionne

en mode simple avec une augmentation progressive de la pression jusqu'à sa valeur maximale obtenue après 45-60 min et qui est maintenue pendant 10-20 min. Après le pressage, une petite quantité d'eau est utilisée pour rincer le matériel et transférer l'huile vers les bassins de clarification. En moyenne, le rendement de transformation obtenu s'élève à 86-90 % et l'humidité des grignons à environ 28 %.

Centrifugation

Cette méthode est basée sur la séparation des différents constituants d'un mélange en fonction de leur densité.

Si seulement la force gravitationnelle est appliquée, la vitesse de séparation peut être extrêmement lente, toutefois, si le mélange est soumis à une force de gravitation artificielle, la vitesse de séparation peut être augmentée. Cela se fait avec des machines tournantes dont la vitesse et l'efficacité de séparation sont directement proportionnelles à la vitesse angulaire au rayon de rotation, ainsi que de la différence de la densité des liquides qui doivent être séparés.

Les machines utilisées sont des centrifugeuses horizontales qui opèrent à une vitesse angulaire jusqu'à 3000 fois plus grande que l'accélération gravitationnelle naturelle.

La centrifugation en continu (fig. 11) comprend les étapes suivantes : effeuillage et lavage, broyage des olives, malaxage de la pâte d'olive, centrifugation avec ou sans addition d'eau pour le système à deux phases et à trois phases, respectivement.

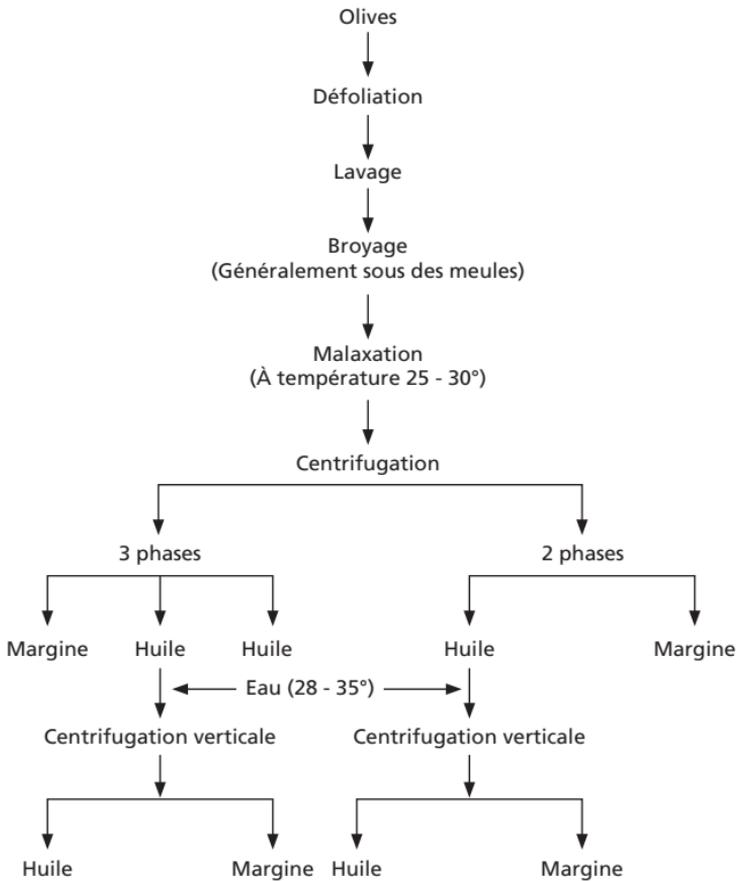


Figure 11. Extraction de l'huile d'olive par le système de centrifugation.



CHAPITRE 3

Conditions de stockage de l'huile d'olive

L'huile d'olive peut être stockée pendant plusieurs mois. Durant son stockage, l'huile d'olive peut subir des changements organoleptiques caractérisés par l'augmentation de l'acidité (due à l'action des lipases) et le développement des réactions de rancissement. Pour cela, un ensemble de précautions doivent être mis en place pour le stockage de l'huile d'olive :

- réservoirs ou tambours pour le stockage devraient être construits en matière inerte et imperméable à l'huile,
- l'huile doit être abritée de l'air, de la lumière, et de la fluctuation de la température,
- l'huile doit être conservée à l'intérieur de la chambre de stockage. Si le stockage a lieu à l'extérieur, les réservoirs doivent être revêtus d'un revêtement extérieur pour éviter les changements extrêmes de température,
- l'huile doit être stockée à une température entre 12-18°C, évitant à la fois le chauffage et le gel. Sinon, l'huile devient blanchâtre, relativement solide, avec un dépôt formé par la cristallisation partielle des triglycérides et des acides gras saturés au cours de l'hiver (à une température inférieure à 10°C).

Les températures supérieures à 22-25°C doivent également être évitées car elles accélèrent les modifications biochimiques et les phénomènes d'oxydation qui peuvent conduire au rancissement de l'huile d'olive (*Sacchi, 2007*).



●●● 2^E PARTIE

Composition et propriétés
chimiques de l'huile d'olive

CHAPITRE 1

L'huile d'olive, source d'antioxydants et de bons acides gras

La composition chimique de l'huile d'olive contient des éléments majeurs et mineurs (fig. 12). L'huile d'olive possède une composition nutritionnelle équilibrée en acides gras et en triglycérides (98 % du poids total). L'abondance de l'acide oléique, un acide gras mono-insaturé, est la caractéristique qui définit l'huile d'olive en dehors des autres huiles végétales. L'acide oléique (C18:1 n-9) représente 56 à 84 % des acides gras de l'huile d'olive (*Rossell, 2001*), tandis que l'acide linoléique (C18:2 n-6) qui est un acide gras polyinsaturé essentiel pour l'alimentation humaine, représente 3 à 21 % (*Tiscornia et al., 1982; Visioli et al., 1998*). Les composants mineurs, représentent environ 2 % du poids total de l'huile, notamment, plus de 230 composés chimiques, tels que les alcools aliphatiques et triterpéniques, les stérols, les hydrocarbures, les composés volatils et les polyphénols (*Servili et al., 2002*).

Néanmoins, c'est la présence de composés phénoliques et d'autres antioxydants particuliers qui confèrent à l'huile d'olive une haute stabilité contre l'oxydation avec une couleur et une saveur unique la distinguant des autres huiles. Les principaux antioxydants de l'huile d'olive sont les carotènes et les composés phénoliques, y compris, les phénols lipophiles et hydrophiles (*Boskou, 1996*). Les tocophérols (phénols lipophiles) peuvent être retrouvés dans les huiles d'autres légumes, tandis que certains phénols hydrophiles tel l'hydroxytyrosol de l'huile d'olive ne sont généralement pas présents dans les autres huiles et graisses (*Boskou, 1996; Shahidi, 1997*).

■ Triglycérides & Acides gras libres ■ Composés mineurs

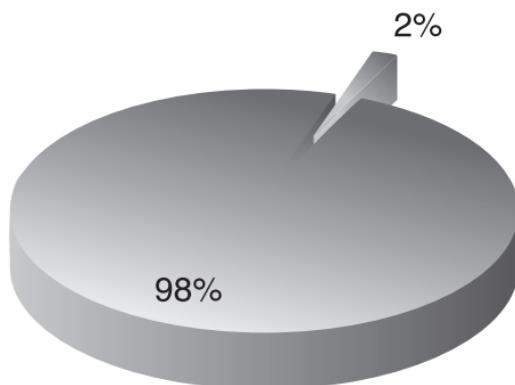


Figure 12. Composition chimique de l'huile d'olive.

Constituants	Huile d'olive extra vierge*	Huile d'olive vierge**	Huile d'olive raffinée***
Fraction glycérique			
Acides gras (g/100g)			
16:0 acide palmitique	6.6	8.6	9.1
16:1n-7 acide palmitoléique	0.4	1.1	0.6
18:0 acide stéarique	2.8	1.9	3.4
18:1n-9 acide oléique	83.1	78.7	78.6
18:2n-6 acide linoléique	5.1	8.3	6.2
18:3n-3 acide α -linoléique	0.6	—	0.4

Tableau 4. Principaux constituants de l'huile d'olive (Huang *et al.*, 2008).

Constituants	Huile d'olive extra vierge*	Huile d'olive vierge**	Huile d'olive raffinée***
18:3n acide γ -linoléique	0.4	—	0.5
Fraction non glycérique (mg/kg)			
Alcools aliphatiques			
C ₁₈ - C ₃₀ alcools	≤200	≤200	≤200
Tri-terpène alcools	500 -3,000	500 -3,000	500 -3,000
Total stérols	1,260.8	687.4	1,366.6
Cholestérol	1.9	2.8	2.0
Δ^3 -Avenasterol	91.5	35.1	82.7
B-Sitostérol	1,124.4	640.9	1,268.8
Sitostérol	7.3	2.3	1.1
Stigmastérol	8.2	6.4	12.0
Protéines ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.76	1.76	1.76
Esters non glycéridés	100 250	100 250	100 250
Cires	≤250	≤250	≤350
Hydrocarbures			
Squalène	4,277	ND	2,598
β -carotène	0.33– 4.0	ND	ND
Polyphénols	236	164	11
• Lipophiles			

Tableau 4. Principaux constituants de l'huile d'olive (Huang *et al.*, 2008).

Constituants	Huile d'olive extra vierge*	Huile d'olive vierge**	Huile d'olive raffinée***
α-tocophérols	300	ND	200
Tocotrienols	ND	ND	None
• Hydrophiles	40-1,000	40-1,000	None
Hydroxytyrosol Tyrosol	Principaux représentants des composés phénoliques de l'huile d'olive avec une concentration moyenne de 8mg/kg		

Tableau 4. Principaux constituants de l'huile d'olive (Huang *et al.*, 2008).

***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.

1. Acides gras, triacylglycérols, et glycérides partiels

Les acides gras présents dans l'huile d'olive sont : l'acide palmitique (C16: 0), l'acide palmitoléique (C16: 1), l'acide stéarique (C18: 0), l'acide oléique (C18: 1), l'acide linoléique (C18: 2), l'acide linoléique (C18: 3), l'acide myristique (C14: 0). Les acides heptadécanoïque et éicosanoïque se trouvent en quantités infimes. *Scano et al.*, (1999), ont détecté des traces d'acides 11-cis-vaccénique et éicosénoïque en analysant une fraction de l'huile d'olive par RMN-¹³C (Résonance Magnétique Nucléaire).

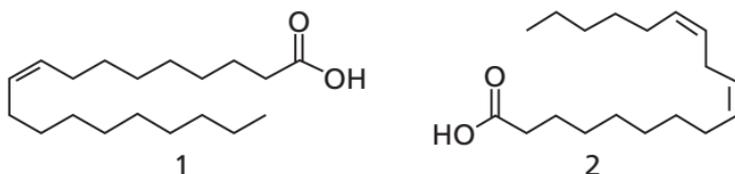


Figure 13. Structure des acides gras majeurs de l'huile d'olive, (1) acide oléique, (2) acide linoléique (*Amanda et al.*, 2010).

La teneur en acides gras de l'huile d'olive varie en fonction de la zone de production, la latitude, le climat, la variété et le stade de maturation du fruit. *Baccouri et al.* (2008) ont prouvé que le ratio acide oléique/acide linoléique montre une tendance à baisser avec la maturité des olives. En outre, les huiles grecques, italiennes et espagnoles sont pauvres en acides linoléique et palmitique. De plus, elles présentent un pourcentage élevé en acide oléique. Les huiles marocaines et tunisiennes sont riches en acides linoléique et palmitique et plus faibles en acide oléique.

Sur la base de l'analyse des échantillons provenant de divers pays, les huiles d'olive peuvent être classées en deux types :

- huile avec une faible teneur en acides linoléique et palmitique et riche en acide oléique,
- huile avec une teneur élevée en acide linoléique et palmitique avec une faible teneur en acide oléique.

La composition en acides gras de l'huile dépend de la maturité de l'olive triturée. *Ninni (1999)*, a signalé que l'acide oléique se forme en premier dans le fruit et qu'il existe une forte relation antagoniste entre les acides oléique, palmitique, palmitoléique et l'acide linoléique.

2. Les polyphénols de l'huile d'olive, antioxydants très puissants

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 (*Uccella, 2001*).

Le nombre des 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 (*Psomadjiou et al., 2003*). La présence de phénols hydrophiles dans l'huile a été mise en évidence il y a plus de 40 ans par *Cantarelli et Montedoro (1961; 1969)*.

2.1 Les monomères phénoliques

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-pinorésinol, 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, pinorésinol, 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, 2000; Owen et al., 2000; García et al., 2001; Mateos et al., 2001; Boskou, 2002*).

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 ses collaborateurs (2001) ont trouvé une nouvelle classe de phénols: hydroxyle-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 de la vanilline). Une telle réaction se produit également dans la nature et l'acide oléique joue le rôle du catalyseur.

L'hydroxytyrosol, présent dans les fruits d'olive, 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 (fig. 14). Ce processus hydrolytique, qui améliore également la quantité de composés carbonylés, favorise la formation de dérivés isochromane.

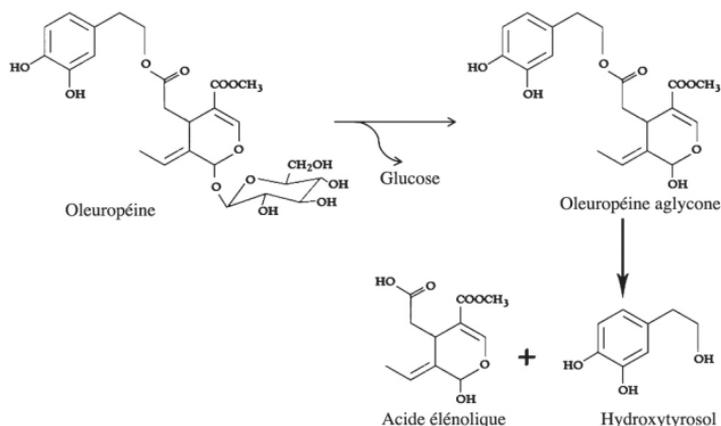


Figure 14. Origine de l'hydroxytyrosol (*Granados-Principal et al., 2010*).

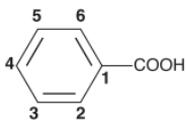
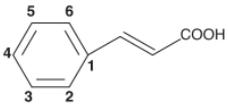
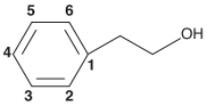
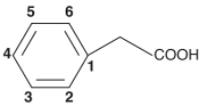
Composé	Substituants (PM)	Structure
Acide benzoïque et ces dérivés		
Acide 3-Hydroxy-benzoïque	3-OH (138)	
Acide <i>p</i> -Hydroxy-benzoïque	4-OH (138)	
3,4-Dihydroxy-benzoïque	3,4-OH (154)	
Acide gentisique	2,5-OH (154)	
Acide vanillique	3-OCH ₃ , 4-OH (168)	
Acide gallique	3,4,5-OH (170)	
Acide syringique	3,5-OCH ₃ , 4-OH (198)	
Acide cinnamique et ces dérivés		
acide <i>o</i> -Coumarique	2-OH (164)	
acide <i>p</i> -Coumarique	4-OH (164)	
Acide Caféique	3,4-OH (180)	
Acide Féruilique	3-OCH ₃ , 4-OH (194)	
Acide Sinapique	3,5-OCH ₃ , 4-OH (224)	
Alcools phénoliques		
Tyrosol [(<i>p</i> -hydroxyphényle) éthanol] ou <i>p</i> -HPEA	4-OH (138)	
Hydroxytyrosol [(3,4-dihydroxyphényle) éthanol] or 3,4-DHPEA	3,4-OH (154)	
Autres acides phénoliques et leurs dérivés		
acide <i>p</i> -Hydroxyphényle-acétique	4-OH (152)	
acide 3,4-Dihydroxyphényle-acétique	3,4-OH (168)	
acide 4-Hydroxy-3-méthoxyphénylacétique	3-OCH ₃ , 4-OH (182)	

Tableau 5. Les composés phénoliques dans l'huile d'olive vierge : nom de composés, la structure chimique générale et le poids moléculaire (PM : g.mol⁻¹), (Bendini et al., 2007).

Composé	Substituants (PM)	Structure
acide 3-(3,4-Dihydroxy- phényle) propénoïque Formes dialdéhyde de sécoiridoïdes Forme décarboxyméthyle d'aglycone d'oleuropéine (3,4-DHPEA-EDA) Forme décarboxyméthyle d'aglycone de ligstroside (p-HPEA-EDA)	(182) R1-OH (304) R1-H (320)	
Sécoiridoïdes aglycones		
Oleuropéine aglycone ou 3,4-DHPEA-EA Ligstroside aglycone ou p-HPEA-EA F Forme aldéhydique de l'oleuropéine aglycone Forme aldéhydique de ligstroside aglycone	 R ₁ -OH (378) R ₁ -H (362) R ₁ -OH (378) R ₁ -H (362)	
Flavonols		
(+)-Taxifoline	(304)	
Flavones		
Apigénine Lutéoline	R ₁ -OH, R ₂ -H (270) R ₁ -OH, R ₂ -OH (286)	
Les lignanes		
(+)-Pinorésinol (+)-1-Acétoxypinorésinol (+)-1-Hydroxypinorésinol	R-H (358) R-OCOCH ₃ (416) R-OH (374)	

Tableau 5. Les composés phénoliques dans l'huile d'olive vierge : nom de composés, la structure chimique générale et le poids moléculaire (PM : g.mol⁻¹), (Bendini et al., 2007).

Composé	Substituants (PM)	Structure
Hydroxyisochromanes		
1-Phényl-6,7-dihydroxyisochromane R	$R_1, R_2\text{-OH}, R\text{-H}$ (242)	
1-(3'-Methoxy-4'-hydroxy)phényle 6,7-dihydroxyisochromane	$R_1\text{-OH}, R_2\text{-OCH}_3$ (288)	

Tableau 5. Les composés phénoliques dans l'huile d'olive vierge : nom de composés, la structure chimique générale et le poids moléculaire (PM : g.mol⁻¹), (Bendini et al., 2007).

L'identification de l'oléocanthal et d'autres composés phénoliques a récemment eu lieu (Fig. 15) (Bianco et al., 2005; Beauchamp et al., 2005). Il reste à vérifier si ces composés sont présents dans les huiles spécifiques (extraites à partir de cultivars spécifiques) ou sont inhérentes aux huiles d'olive de bonne qualité. Beauchamp et ses collaborateurs (2005), affirment que l'oléocanthal, un composé qui a la même activité pharmacologique que l'ibuprofène[®], médicament anti-inflammatoire, se trouve uniquement dans l'huile d'olive extra vierge fraîchement pressée et sa présence est liée à la sensation de picotement dans la gorge.

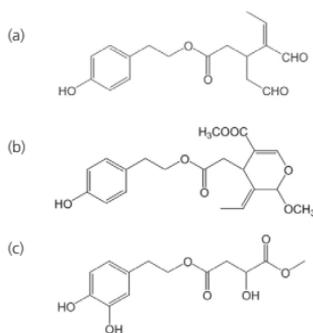


Figure 15. Composés phénoliques récemment identifiés dans l'huile d'olive: (a) oléocanthal, (b) acétate de méthyle de l'aglycone de ligstroside et (c) β -ester de méthyle hydroxytyrosol malate.

3. Tocophérols

La recherche sur la présence et les taux de tocophérols dans les huiles d'olive vierges a montré que parmi les huit "E-vitamères" connus, l' α -homologue comprend 90 % de la teneur en tocophérol total. L' α -tocophérol se trouve sous forme libre. Les taux enregistrés font apparaître une large gamme de milligrammes d' α -tocophérol par kg d'huile, qui dépend des cultivars et des facteurs liés aux technologies utilisées. L'introduction de bonnes pratiques de fabrication et de programmes de contrôle de qualité pour tous les types d'huile d'olive comestibles a eu un impact positif sur les taux de tocophérol. Les taux actuellement constatés sont beaucoup plus élevés que la valeur moyenne de 100 mg / kg affectée à l'huile d'olive dans le passé (*Gunstone et al., 1994; Belitz et al., 2004*).

Les niveaux d' α -tocophérol peuvent être liés à la quantité élevée de pigments de chlorophylle et à son activité concomitante contre les radicaux oxygénés (*Grammes et Eskins, 1972*). La concentration en tocophérol semble être réduite dans les fruits mûrs. Les données sur l'influence du système d'extraction varient (*Psomiadou et Tsimidou, 1998; Beltran et al., 2005*). Le raffinage ou l'hydrogénation entraîne une perte de tocophérols (*Andrikopoulos et al., 1989; Rabascall et Riera, 1987*).

4. Hydrocarbures

Deux hydrocarbures sont présents en quantités importantes dans l'huile d'olive, le squalène et le β -carotène. Le squalène (2,6,10,15,19,23 hexaméthyl-2-,6,10,14,18,22 tétracosahexane) est le métabolite précédant la formation du noyau des stérols. Sa présence est considérée comme partiellement responsable des effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé et de son action chimio-préventive contre certains cancers (*Rao et al., 1998, Smith et al., 1998*). Il est le constituant majeur de la fraction insaponifiable de

l'huile d'olive et représente plus de 90 % des hydrocarbures (Perrin, 1992; Lanzón et al., 1994). Sa concentration varie de 200 à 7500 mg par kg d'huile (Perrin, 1992). Même des concentrations plus élevées jusqu'à 12000 mg / kg ont été également signalés (Lanzón et al., 1994). Cette quantité dépend du cultivar (De Leonardis et al., 1998; Manzi et al., 1998), de la méthode d'extraction de l'huile (Nergiz et Ünal, 1990), de plus, elle est considérablement réduite au cours du processus de raffinage (Mariani et al., 1992; Lanzón et al., 1994). La variation des concentrations peut être partiellement due aux différentes méthodes d'analyse utilisées (Nenadis et Tsimidou, 2002). La fraction d'hydrocarbures d'huile d'olive vierge contient aussi des diterpènes et des triterpènes, des polyoléfines isoprenoidal, et des n-paraffines (Lanzon et al., 1994).

5. Pigments

La couleur de l'huile d'olive est le résultat des teintes vertes et jaunes en raison de la présence de chlorophylles et de caroténoïdes, respectivement. Elle est influencée par le cultivar d'olive, l'indice de maturation, la zone de production, le système d'extraction et les conditions de stockage. Par conséquent, la couleur est considérée comme un indice de qualité malheureusement, des méthodes standardisées pour sa mesure n'existent pas à ce jour.

Les chlorophylles perdent leurs ions magnésium et se transforment en phéophytines qui sont des pigments verts olives jaunâtres. Parmi ces derniers, la phéophytines α (Phéo α) est prédominante (Mínguez-Mosquera et al., 1990; Mínguez-Mosquera et al., 1991; Rahmani et Csallany, 1991; Gandul-Rojas et Mínguez-Mosquera, 1996; Psomiadou et Tsimidou, 2001).



CHAPITRE 2

Analyse et quantification des polyphénols de l'huile d'olive

La teneur en polyphénols est significativement liée à la qualité de l'huile d'olive vierge et leur contribution à la stabilité oxydative de l'huile est largement acceptée. Les conditions agronomiques et technologiques de la production de l'huile d'olive affectent fortement la qualité et la quantité des composés phénoliques hydrophiles. Pour ces raisons, l'identification et la quantification de ces composants sont d'un grand intérêt. De nombreuses procédures d'analyse orientée vers la détermination du profil complet phénoliques ont été proposées.

La méthode colorimétrique universellement appliquée pour la détermination des phénols dans l'extrait eau-méthanol est basée sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats sont généralement exprimés en équivalents de l'acide caféique (mg acide caféique / kg d'huile), bien que d'autres phénols peuvent également être utilisés comme standards, à savoir: l'acide gallique et l'acide tannique (*Tsimidou, 1999*). Les résultats peuvent varier, en fonction de la norme utilisée et la concentration relative des différents composés (*Singleton et al., 1999; Hrnčirik et Fritsche, 2004*). Cependant, la méthode colorimétrique classique est largement appliquée pour la quantification des phénols totaux polaires, car elle fournit une bonne indication sur la stabilité de l'huile (*Gutfinger, 1981; Aparicio et al., 1999; Blekas et al., 2002; Psomiadou et al., 2003*).

En général, la procédure d'analyse pour la détermination des différents composés phénoliques dans l'huile d'olive comporte trois étapes principales: l'extraction à partir de l'huile, la séparation analytique et la quantification. L'ensemble des techniques d'extraction à base d'ELL (Extraction Liquide-Liquide) ou d'EPS (Extraction en Phase Solide) ont été utilisées pour isoler la fraction phénolique polaire de l'huile d'olive. Les techniques d'analyse sont basées sur des méthodes spectrophotométriques, telles que la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et l'électrophorèse capillaire (CE). Toutefois, la CE a récemment été appliquée à l'analyse des composés phénoliques de l'huile d'olive, et ainsi, elle a ouvert de grands horizons, surtout en raison de sa haute résolution. La technique a été optimisée par la réduction du volume de l'échantillon et de la durée d'analyse (*Carrasco-Pancorbo et al., 2005*).



● ● ● 3^E PARTIE

Effets de l'huile d'olive
sur la santé

CHAPITRE 1

Les bienfaits de l'huile d'olive sont essentiellement attribués à ses polyphénols

L'huile d'olive est riche en antioxydants, comme les polyphénols, et en particulier, l'hydroxytyrosol et le tyrosol. Ils permettent de prévenir et de traiter les maladies cardio-vasculaires, les cancers, le diabète, les maladies neurodégénératives, l'inflammation et le vieillissement. Ils sont antimicrobiens et jouent aussi un rôle important dans le renforcement du système immunitaire et la protection de certains tissus et organes contre les dommages oxydatifs: cerveau, foie, globules sanguins, muscles et artères.

L'intérêt pour le régime méditerranéen (RM) a augmenté à travers le monde au cours de la dernière décennie, même chez les nutritionnistes en dehors du bassin méditerranéen. Ceci est largement dû au fait que le RM a été associé à une plus grande longévité, une meilleure qualité de vie et à une réduction de l'incidence des maladies cardiovasculaires, du cancer et du déclin cognitif lié à l'âge (*Trichopoulou et al., 2003; Trichopoulou et al., 2005*), en dépit d'être un modèle alimentaire riche en graisses, contrairement aux régimes recommandés pendant plusieurs décennies par de nombreux experts en nutrition dans d'autres zones géographiques.

Cependant, la source principale de la matière grasse dans le RM (fig. 16) est dérivée d'un seul composant alimentaire, à savoir l'huile d'olive, ce qui signifie que l'alimentation est pauvre en graisses saturées et riche en acides gras mono et

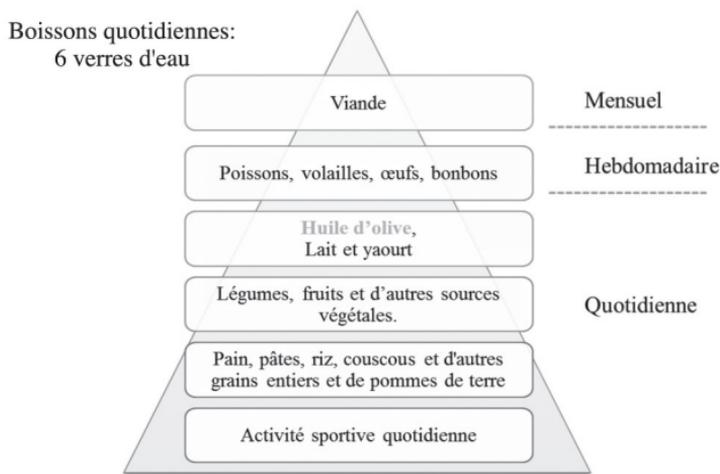


Figure 16. Principaux constituants de l'alimentation méditerranéenne.

polyinsaturés, en particulier, en acide oléique. Au cours de ces dernières années, grâce à des technologies modernes, d'autres types d'huiles avec une composition en matières grasses similaires sont devenues disponibles pour la nutrition humaine. Il s'agit, notamment, des huiles obtenues à partir de certains types de semences, dont certaines variétés sont riches en acide oléique, comme le tournesol, le soja et le colza oléique. Cette situation a généré un nouveau concept de RM, selon lequel l'acide oléique ne provient pas nécessairement de l'huile d'olive, mais plutôt à partir d'autres types d'huiles.

Le régime méditerranéen a été couplé à une faible consommation de viande, source d'acides gras saturés, et à une richesse en acides gras monoinsaturés d'origine végétale. Les recherches ont souligné l'importance des aliments végétaux (y compris les glucides et les fibres non digestibles) et de l'utilisation régulière d'huile d'olive.

En ce qui concerne le système cardio-vasculaire, les propriétés protectrices de l'huile d'olive ont été, jusqu'à une

date récente, exclusivement reportées à sa teneur élevée en acide gras monoinsaturés (AGMI), principalement l'acide oléique. En effet, la supplémentation en AGMI conduit à une résistance accrue des LDL à l'oxydation (*Bonanome et al., 1992*), entraînant ainsi la baisse de l'un des facteurs de risque de maladie coronarienne (*Witztum et Steinberg, 2001*). À titre d'exemple, la FDA (Food and Drug Administration, USA) a autorisé une allégation de santé qualifiée pour les AGMI de l'huile d'olive et un risque réduit de maladie coronarienne (*FDA, P04-100, 2004*).

Cependant, plusieurs observations plaident contre l'hypothèse de l'acide oléique comme le facteur exclusif responsable de la baisse de taux des maladies cardiovasculaires dans la région méditerranéenne. Par exemple, les effets des AGMI sur les lipides et les lipoprotéines circulantes n'ont pas été entièrement clarifiés, alors que les principaux effets des AGMI sur le cholestérol sérique sont généralement considérés comme indirects (*Belkner et al., 1993; Hegsted et al., 1993; Gardner et Kraemer, 1995*). Certaines études (*Mensink et al., 2003*) ont prouvé l'effet hypocholestérolémiant direct, bien que modeste, des AGMI seuls quand ils remplacent les hydrates de carbone comme source d'énergie. En outre, les AGMI augmentent le taux des lipoprotéines de haute densité (HDL) plus que les acides gras polyinsaturés (AGPI) lorsque ces deux classes d'acides gras remplacent les glucides dans le régime alimentaire (*Mensink et al., 2003*).

Cependant, les bienfaits de la consommation de l'huile d'olive sont au-delà d'une simple réduction du cholestérol et des lipoprotéines de faible densité. Les effets biologiques et cliniques les plus importants liés à l'alimentation riche en AGMI (notamment l'acide oléique) sur le métabolisme des lipoprotéines, les dommages oxydatifs, l'inflammation, la dysfonction endothéliale, la pression artérielle, la thrombose, et le métabolisme des glucides ont été étudiés par plusieurs auteurs (*Covas, 2009; Huang et al., 2008*).

Toutefois, l'acide oléique est l'un des acides gras prédominants dans les aliments d'origine animale largement consommés, tels que la volaille et le porc. Ainsi, contrairement à la croyance commune, le pourcentage d'acide oléique dans l'alimentation méditerranéenne n'est que légèrement supérieur à celui des autres types d'alimentation occidentaux, par exemple, en Amérique du Nord (*Dougherty et al., 1987; Katan, 1995*). Il est donc peu probable que l'acide oléique soit exclusivement responsable des propriétés bénéfiques de l'huile d'olive. Enfin, il est également intéressant de noter que plusieurs huiles de graines obtenues par sélection génétique, disponibles dans le commerce, comme le tournesol, le soja et les huiles de colza sont aujourd'hui riches en acides gras monoinsaturés mais dépourvues de composés phénoliques. Ces huiles non pas le même effet que celui de l'huile d'olive sur la réduction du cholestérol et des lipoprotéines de faible densité (*Owen et al., 2000; Gunstone, 2004*).

Si l'acide oléique a été doté d'importants effets cardioprotecteurs, à faible incidence de maladies cardiovasculaires et de grande longévité, ceci serait observé même à l'extérieur du bassin méditerranéen où la consommation de l'huile d'olive est bien faible.

Ce chapitre passe en revue les éléments de preuve qui indiquent comment les composants phénoliques de l'huile d'olive extra vierge jouent un rôle dans la protection et le traitement des maladies cardiovasculaires, du cancer, ainsi que d'autres pathologies dans la région méditerranéenne.



CHAPITRE 2

Les polyphénols de l'huile d'olive sont très biodisponibles et bioactifs

On entend par **biodisponibilité** d'une substance, la proportion de celle-ci parvenant à la circulation générale après une administration orale ainsi que sa métabolisation, sa distribution et son élimination. Ainsi, il est important de connaître non seulement la quantité journalière ingérée de polyphénols, mais également leur biodisponibilité, puisque leur qualité nutritionnelle et leurs effets systémiques dépendront de leur absorption au niveau du tractus digestif.

1. Absorption des composés phénoliques

Les composés phénoliques de l'huile d'olive ne sont pas toxiques et leur absorption dépend de la dose administrée. Ces composés sont très biodisponibles en tant que composants naturels de l'huile d'olive.

Bai *et al.* (1998) ont signalé que l'administration orale de l'hydroxytyrosol à des rats a entraîné son apparition rapide dans le sang, avec des concentrations maximales obtenues dans les **5-10 min** qui suivent. L'hydroxytyrosol est complètement éliminé et/ou métabolisé après 180 min de l'administration.

Visioli et ses collaborateurs (2000) ont étudié l'absorption des composés phénoliques de l'huile d'olive chez l'homme. Six hommes volontaires (âgés de 27 à 33 ans) ont reçu 50 ml de quatre échantillons d'huile d'olive riche en hydroxytyrosol (*Olivie Plus*). Après 24 h, les urines ont été analysées et les

résultats ont montré que le rapport tyrosol/hydroxytyrosol dans l'urine est similaire à celui présent dans l'huile (~ 1,7). D'après les résultats de ces auteurs, le taux de l'excrétion urinaire de tyrosol et d'hydroxytyrosol dépend de la dose administrée. Les données suggèrent que des composés phénoliques simples tels que le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont absorbés après administration et sont excrétés sous forme de glucuronides conjugués. Dans une autre étude, l'analyse d'urine a révélé la présence de deux autres métabolites de l'hydroxytyrosol, l'acide homovanillique (4-hydroxy-3-méthoxy acide phénylacétique) et l'homovanillyl (*Caruso et al., 2001*).

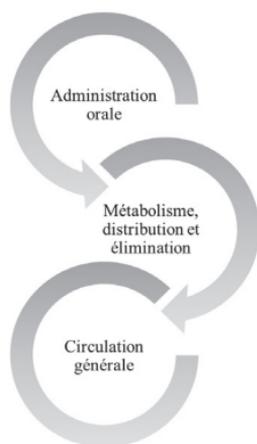


Figure 17.
Biodisponibilité
d'une substance
chimique.

Dans une autre étude de biodisponibilité, Tuck *et al.* (2001) ont examiné l'absorption et l'élimination d'hydroxytyrosol et du tyrosol radiomarqués, chez des rats Sprague-Dawley mâles. Après injection intraveineuse (dans une solution saline) et administration orale (dans l'huile d'olive et dans une solution aqueuse), pour les deux composés, la voie intraveineuse et l'administration par voie orale dans un support huileux ont entraîné une élimination significativement plus importante dans les urines après 24 h, que lorsque ces composés ont été administrés oralement dans une solution aqueuse. Pour

le tyrosol et l'hydroxytyrosol, il n'y avait aucune différence significative quant à la quantité éliminée dans l'urine après injection intraveineuse et administration orale dans une solution huileuse. L'analyse des échantillons d'urine a révélé la présence de l'hydroxytyrosol et de cinq autres métabolites. L'estimation de la biodisponibilité orale de l'hydroxytyrosol, lorsqu'il est administré dans une solution d'huile d'olive et dans une solution aqueuse était respectivement, de 99 % et 75 %. (fig. 18a), tandis que l'estimation de la biodisponibilité du tyrosol était de 98 % et 71 % (fig. 18b), respectivement.

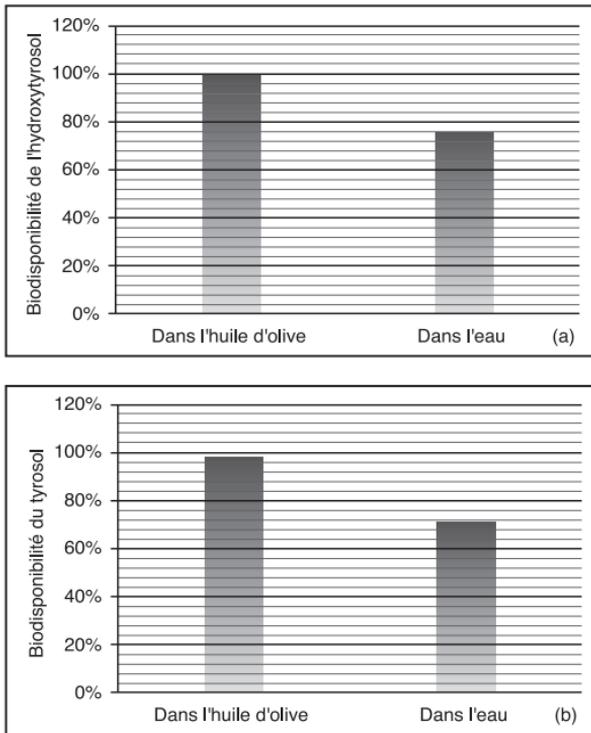


Figure 18. Biodisponibilité d'hydroxytyrosol (a) et de tyrosol (b) en fonction du support de transport.

En 2003, les mêmes auteurs *Visioli et al.*, ont confirmé leurs résultats sur l'Homme. Ils ont comparé l'excrétion de l'hydroxytyrosol chez l'Homme, lorsqu'il est consommé comme composante naturelle de l'huile d'olive extra vierge et lorsqu'il est ajouté à l'huile d'olive raffinée et le yogourt. L'excrétion de l'hydroxytyrosol était beaucoup plus élevée après son administration comme une composante naturelle d'huile d'olive (44,2 % d'hydroxytyrosol) que par son administration dans l'huile d'olive raffinée (23 % d'hydroxytyrosol) ou dans du yogourt (5,8 % d'hydroxytyrosol) (fig. 19). Le taux élevé de l'excrétion témoigne du degré élevé de l'absorption de l'hydroxytyrosol.

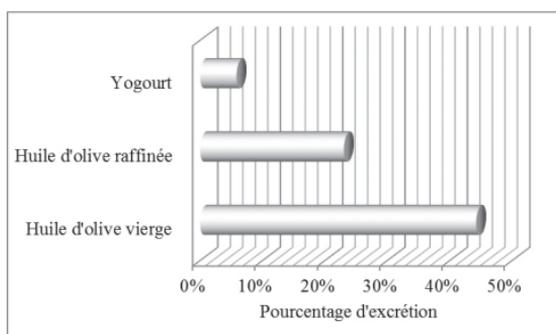


Figure 19. Excrétion urinaire de l'hydroxytyrosol en fonction du support de transport.

Dans une autre étude, huit volontaires sains ont avalé 100 g d'huile d'olive extra vierge, les échantillons de sang ont été collectés à différents moments après l'ingestion. Les chercheurs ont conclu que les composés phénoliques de l'huile d'olive ont été absorbés au niveau de l'intestin, toutefois, au travers d'une voie indépendante de la formation des chylomicrons (lipoprotéines qui se forment en période de digestion, responsables du transport des lipides de l'intestin grêle vers les tissus adipeux périphériques où ils sont retraités). Ces composés peuvent exercer un effet antioxydant important *in vivo*, probablement en phase post-prandiale (*Bonanome et al., 2000*).

Dans une autre étude sur l'absorption supplémentaire des polyphénols de l'huile d'olive vierge chez les sujets avec iléostomie, *Vissers et al.* (2001) ont signalé que ces composés sont essentiellement absorbés au niveau de l'intestin grêle. L'absorption a été confirmée par l'excrétion du tyrosol et de l'hydroxytyrosol dans l'urine. Il a été estimé que l'absorption apparente des composés phénoliques s'élevait au moins à 55-66 % de la dose ingérée. Dans une étude quantitative, *Ruiz-Gutierrez et al.*, (2000) ont signalé que le taux d'hydroxytyrosol dans le sang est estimé à 5 % après son administration au bout de 5 min.

Manna et al. (2000) ont étudié les mécanismes moléculaires du transport intestinal de l'hydroxytyrosol, en utilisant les cellules Caco-2 Monocouche différenciées comme modèle de l'épithélium intestinal humain. Les données cinétiques suggèrent que le transport du [¹⁴C]-hydroxytyrosol se fait par un mécanisme de diffusion passive et est bidirectionnelle. La valeur du coefficient de la perméabilité apparente calculée suggère que l'hydroxytyrosol est 100 % absorbé au niveau intestinal. Ces données fournissent la preuve que l'hydroxytyrosol est hautement biodisponible.

2. Métabolisme

Après l'administration intraveineuse du [¹⁴C]-hydroxytyrosol à des rats, moins de 8 % de la radioactivité administrée a été présente dans le sang 5 min après l'injection (6 % lié au plasma et 2 % à la fraction de cellules). Seulement 0,1 % de la dose administrée correspondait à de l'hydroxytyrosol détectable dans le sang 5 h après l'administration. Environ 90 % de la radioactivité administrée ont été dosés dans les urines durant les 5 heures suivantes, tandis qu'environ 5 % dans les selles et le contenu gastro-intestinal. Le [¹⁴C]-hydroxytyrosol a été enzymatiquement converti en quatre dérivés oxydés et/ou méthylés. Une fraction significative de la radioactivité totale a été associée à des formes sulfo-conjuguées, ce qui a également représenté les principaux

produits de l'excrétion urinaire. Sur base de ces résultats, plusieurs auteurs (fig. 20) ont proposé une voie métabolique de l'administration exogène de l'hydroxytyrosol impliquant la catéchol-o-méthyltransférase, l'alcool déshydrogénase et l'aldéhyde déshydrogénase et la phénolsulfotransférase (D'Angelo *et al.*, 2001).

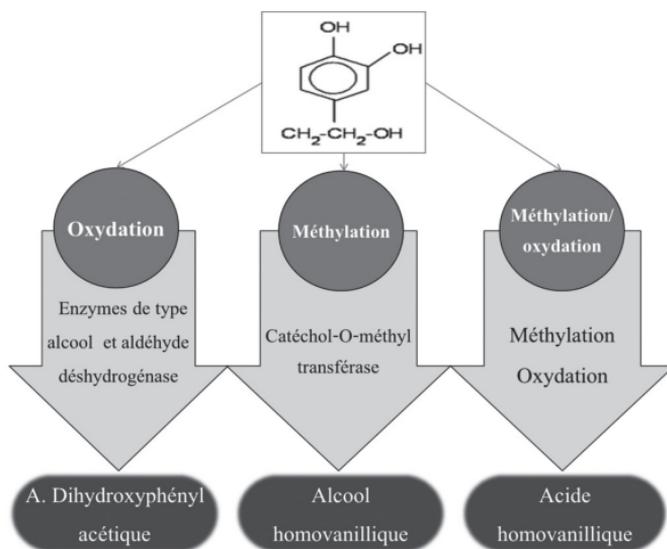


Figure 20. Principales voies métaboliques de l'hydroxytyrosol chez l'Homme proposées par D'Angelo *et al.*, (2001).

Trois groupes de rats Sprague-Dawley mâles ont été gavés de 1,5 ou 10 mg / kg d'extrait de margines, fournissant 41,4; 207 et 414 µg/kg d'hydroxytyrosol, respectivement. L'hydroxytyrosol a été absorbé et excrété dans les urines, principalement sous forme de glucuronide conjugué. Environ 25 % de la dose totale d'hydroxytyrosol administrée ont été retrouvés dans les urines (forme libre et conjugué au glucuronide).

Caruso *et al.* (2001) ont examiné la voie métabolique de l'hydroxytyrosol après ingestion d'huile d'olive vierge (50

ml, contenant 7 à 23 mg d'hydroxytyrosol total) à six sujets volontaires sains de sexe masculin. Les résultats suggèrent que le métabolisme de l'hydroxytyrosol nécessite l'enzyme catéchol-o-méthyltransférase.

En résumé, plusieurs chercheurs ont prouvé la grande biodisponibilité de d'hydroxytyrosol chez l'Homme après l'administration orale de l'huile d'olive. Ces études ont démontré la présence d'hydroxytyrosol dans le sang et l'urine. Il est à noter que, l'oleuropéine, qui est également présent dans l'huile d'olive, peut être absorbé et hydrolysé en hydroxytyrosol.

3. Excrétion

Visioli *et al.* (2003) ont étudié l'excrétion urinaire de l'hydroxytyrosol libre et conjugué chez les rats et l'Homme après administration d'huile d'olive. Les résultats de cette étude indiquent qu'après 24 heures de son administration dans l'huile, l'Homme excrète 31 % d'hydroxytyrosol, tandis que les rats excrètent seulement 5 %.

Dans une étude subséquente, Miro-Casas *et al.* (2003b) ont rapporté une augmentation de la concentration d'hydroxytyrosol suite à l'ingestion d'une dose unique (50 ml) et à la consommation à court terme (25 ml / jour pendant une semaine) d'huile d'olive vierge pour sept sujets en bonne santé. Miro-Casas *et al.* (2003a) ont également signalé une augmentation de la concentration de l'hydroxytyrosol et du 3-O-méthyl-hydroxytyrosol dans le plasma suite à l'ingestion d'huile d'olive vierge (25 ml) chez l'Homme, atteignant des concentrations maximales après 32 et 53 min, respectivement. L'estimation de la demi-vie d'élimination de l'hydroxytyrosol était de 2,43 h, tandis que la concentration maximale était de 26 µg/l. Sur la base des résultats de cette étude, environ 98 % de l'hydroxytyrosol semblent être présents dans le plasma et l'urine sous forme conjuguée, principalement, aux

glucuronides, suggérant un premier passage intestin/foie du métabolisme de l'hydroxytyrosol ingéré.

Dans une enquête de suivi sur les échantillons d'urine de l'étude d'absorption, Tuck *et al.* (2002) ont identifié trois métabolites d'hydroxytyrosol par spectroscopie de masse (MS/MS en tandem) à savoir, le conjugué monosulfate, le conjugué 3-O-glucuronide et l'acide 4-hydroxy-3-méthoxyphénylacétique (acide homovanillique). Tuck et Hayball (2002) ont signalé que l'hydroxytyrosol est excrété par les reins sous forme libre et aussi conjugué aux composés suivants: glucuroconide, sulfate, acide homovanillique, l'alcool homovanillyl, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et le 3,4-dihydroxyphénylacétaldehyde.



CHAPITRE 3

Pouvoir antioxydant des polyphénols de l'huile d'olive

L'homéostasie au niveau cellulaire et, surtout, au niveau de l'organisme, correspond à l'équilibre entre la formation des espèces oxygénées et azotées hautement réactives et l'action des antioxydants qui maintiennent des taux acceptables de ces substances et minimisent leurs réactions non spécifiques avec les biomolécules (acides nucléiques, protéines, acides gras etc.) (fig. 21) conduisant éventuellement à l'apparition de maladies dégénératives (par exemple, l'athérosclérose, le cancer, le diabète, l'arthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires), (*Pérez-Jiménez, 2006*).

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule. L'oxygène est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbites externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en $O_2^{\cdot-}$ puis en H_2O_2 . Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species: ROS), radical hydroxyle (OH \cdot).

L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène (fig. 22: anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

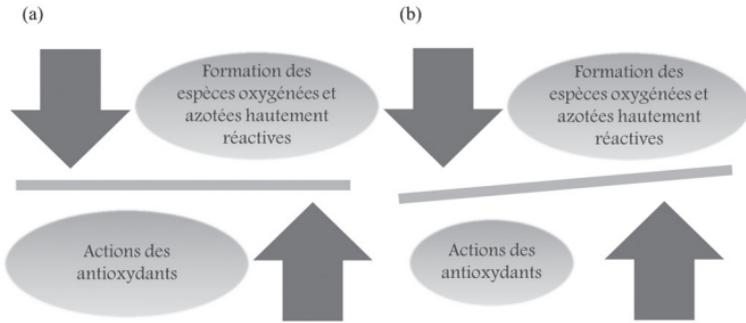


Figure 21. Équilibre entre la formation et l'élimination des espèces oxygénées et azotées hautement réactives, (a) cas normal et (b) en cas de stress oxydatif.

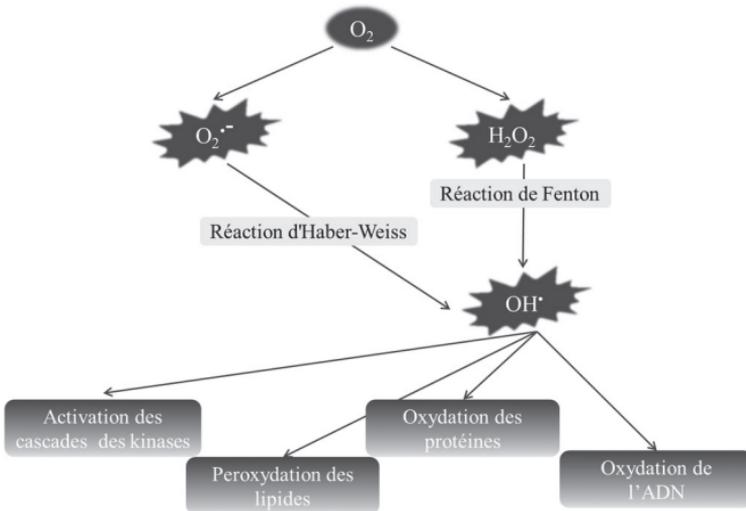


Figure 22. Schéma de différentes formes de ROS (Gutteridge et Halliwell, 1992).

L'anion superoxyde est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet $O_2^{\cdot-}$ entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 n'est pas un radical libre au sens propre, mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production.

Selon la réaction de Fenton, l' H_2O_2 se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), en un ion OH^- et un radical hydroxyle :



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde qui régénère Fe^{3+} en Fe^{2+} selon la réaction d'Haber-Weiss :



Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène, d'anion superoxyde et de fer permet la production de radical hydroxyle. L' OH^\cdot , avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L' OH^\cdot apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS (*Gutteridge et Halliwell, 1993*).

Un antioxydant peut être défini comme étant toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à ceux d'un

substrat oxydable, retarde considérablement ou empêche l'oxydation de ce substrat (Halliwell et al., 1999).

1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (fig. 23) (le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS.

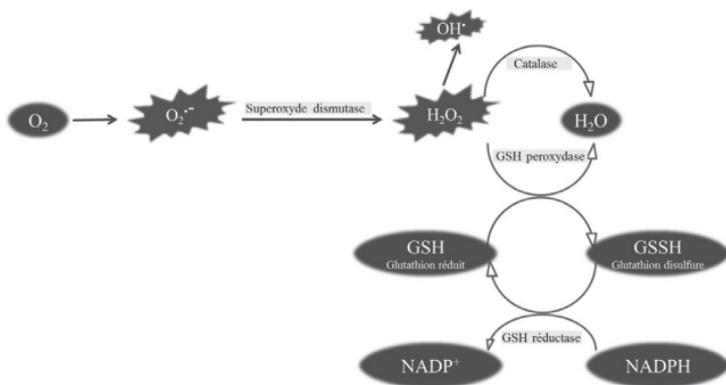


Figure 23. Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.

2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Chélateurs biologiques des métaux : empêchent la participation des ions métalliques transitoires dans la formation du radical hydroxyle et d'autres substances hautement réactives.

Molécules qui arrêtent la propagation de l'oxydation : cette classe de molécules agit quand une réaction d'oxydation est démarrée en dépit de la présence de ces systèmes biologiques antioxydants. C'est une vaste catégorie de molécules jouant un rôle crucial dans le processus de lutte contre les espèces hautement réactives. Cette classe

comprend diverses substances hydrophiles et hydrophobes à faible ou à haut poids moléculaire, à savoir :

- les polyphénols (huile d'olive),
- les tocophérols, vitamine E (huile d'olive),
- les caroténoïdes (huile d'olive),
- l'acide ascorbique (vitamine C),
- le glutathion,
- certains acides aminés (tels que la cystéine, méthionine, ou la tyrosine),
- l'acide urique.

Les principaux modes d'action de cette classe d'antioxydants est de réagir avec les radicaux libres pour former des radicaux moins réactifs incapables de réagir avec les biomolécules, ou pour réparer chimiquement une cible endommagée. Par conséquent, cette classe de composés est souvent nommée « piègeurs de radicaux libres ».

L'huile d'olive contient bien plus de substances protectrices à grand effet antioxydant que le vin rouge, le thé vert et la vitamine C. Les radicaux libres sont piégés d'une façon efficace par les polyphénols de l'huile d'olive ce qui explique leur grand pouvoir antioxydant.

Les antioxydants exogènes ont une double fonction; ils empêchent l'oxydation des aliments, en particulier, les lipides et en même temps augmentent le taux d'antioxydants endogènes ce qui correspond à une protection contre les maladies dégénératives. Les antioxydants diététiques les plus importants sont certaines vitamines (acide ascorbique, les tocophérols, carotènes) et les composés phénoliques, qui sont présents dans divers aliments d'origine végétale caractéristiques de l'alimentation méditerranéenne, comme l'huile d'olive (Edwin et al., 2011).

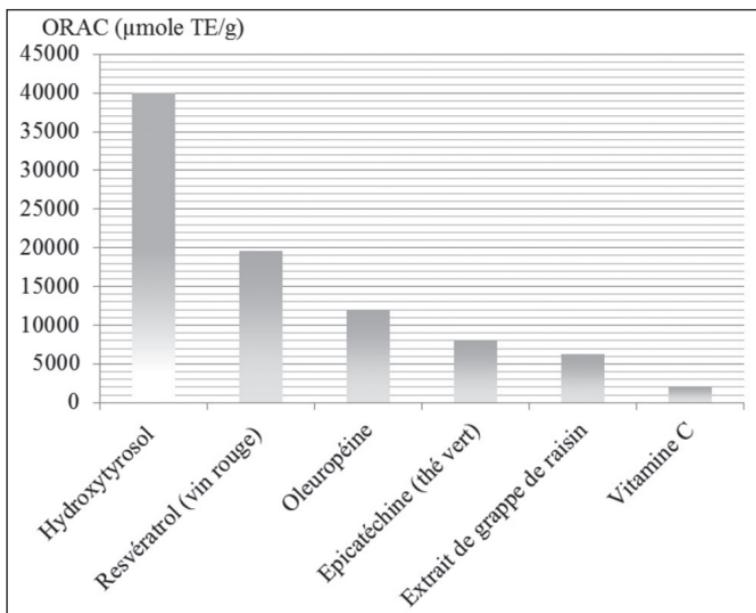


Figure 24. Pouvoir antioxydant de l'hydroxytyrosol (composé phénolique majeur de l'huile d'olive) par rapport à d'autres antioxydants. ORAC: Capacité d'Absorber les Radicaux Oxygénés.

3. Les polyphénols de l'huile d'olive, composés à fort pouvoir antioxydant

Les composés phénoliques peuvent agir comme des antioxydants de différentes manières. Dans les systèmes utilisant l'oxydation des métaux de transition tels que le cuivre et le fer, ils peuvent chélater ces ions métalliques, qui sont des initiateurs des réactions de Fenton pouvant générer de fortes concentrations de radical hydroxyle (*Halliwell & Gutterige, 1990; Halliwell et al., 1995*). Toutefois, l'activité antioxydante la plus importante est liée à la capacité anti-radicalaire, en brisant la chaîne des réactions déclenchées par les radicaux libres. La propriété antioxydante des polyphénols est associée à leur capacité à former des liaisons hydrogène

intramoléculaires entre le groupe hydroxyle et les radicaux phénoxyliques (*Visioli & Galli., 1998b*). Des études similaires sur les flavonoïdes ont déjà montré que le degré de l'activité antioxydante est corrélée au nombre de groupes hydroxyles (*Rice-Evans et al., 1996; Cao et al., 1997*). Le nombre de groupes hydroxyles et leurs positions sur le cycle aromatique sont déterminants pour l'activité des flavonoïdes et des polyphénols. L'étude des structures de résonance formées au cours des processus d'oxydation a permis de révéler que les composés ortho et para substitués sont plus stables que les méta substitués (*Finotti et Di Majo, 2003*). En particulier, la substitution ortho-diphénolique favorise une haute capacité antioxydante, tandis qu'une seule substitution hydroxyle, comme pour le tyrosol, ne confère pas une forte activité, tant que le tyrosol ne protège pas les lipoprotéines de faible densité (LDL) des dommages oxydatifs induits chimiquement.

Bien que l'huile d'olive contienne une concentration relativement faible en α -tocophérol, elle est connue pour être très résistante à la dégradation oxydative. Ceci est dû, au moins en partie, à la teneur relativement faible en acides gras polyinsaturés, mais surtout, à **la forte teneur en composés phénoliques**. L'activité antioxydante des composés phénoliques de l'huile d'olive, et en particulier, de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropéine, a été étudiée dans de nombreux modèles expérimentaux avec utilisation de métaux de transition; l'oxydation des LDL induite chimiquement; la formation des ROS, par exemple le radical superoxyde, le radical trichlorométhylperoxylique et l'acide hypochloreux (*Aeschbach et al., 1994; Salami et al., 1995; Visioli et al., 1995a, 1998; Aruoma et al., 1998*). En estimant l'activité antioxydante de ces composés polyphénoliques sur la base de leur capacité à inhiber la formation des peroxydes, il a été démontré que l'acide caféique, l'hydroxytyrosol et l'acide protocatéchique ont une plus grande activité antiradicalaire (*Papadopoulos & Boskou, 1991*). L'activité antioxydante de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol a également été

démontrée sur des modèles cellulaires et *in vivo* sur des animaux (Manna et al., 1997; Speroni et al., 1998).

Keceli et Gordon (2001), ont comparé l'activité antioxydante de l' α -tocophérol et des composés phénoliques extraits à partir d'olives et d'huile d'olive au fil du temps. Il a été démontré que dans les premières 15 minutes, l'activité de l' α -tocophérol a été plus élevée, mais elle chute rapidement. L'extrait d'olives et d'huile d'olive continuent à réduire plus lentement la concentration des radicaux; après les 60 minutes de la réaction, les extraits d'olive et d'huile d'olive ont été beaucoup plus actifs que l' α -tocophérol. Cette activité s'étend jusqu'au 6^e jour.

Les effets de l'activité antioxydante des polyphénols de l'huile d'olive sur l'intégrité et la fonction des cellules ont été étudiés sur les érythrocytes et les cellules intestinales (Caco-2). La capacité des polyphénols à prévenir les dommages dans ces cellules a été vérifiée lors de leur exposition à un stress oxydatif, en présence du H_2O_2 . Les érythrocytes humains ont été choisis parce qu'ils sont les cellules les plus exposés au risque oxydatif, puisque leur rôle spécifique est de transporter l'oxygène. La cible principale du H_2O_2 est l'hémoglobine, qui est oxydée en méthémoglobine. L'oxydation spontanée de l'hémoglobine produit des radicaux d'anion superoxyde qui causent la dismutation du H_2O_2 (fig. 25). En présence d'ions métalliques réduits, en particulier le Fer, ces composés forment un radical hydroxyle hautement réactif qui peut endommager la membrane cellulaire causant ainsi l'hémolyse des cellules (Sadrzadeh et al., 1984; Van Dyke & Saltman, 1996). Dans les conditions physiologiques normales, les ROS sont rapidement éliminés par les deux systèmes enzymatiques et non enzymatiques. Toutefois, si la production des ROS est excessive ou si la défense antioxydante est affaiblie, de graves dommages oxydatifs peuvent se produire, à la fois

au niveau de la membrane plasmique et du cytosol, ce qui conduit finalement à l'hémolyse.

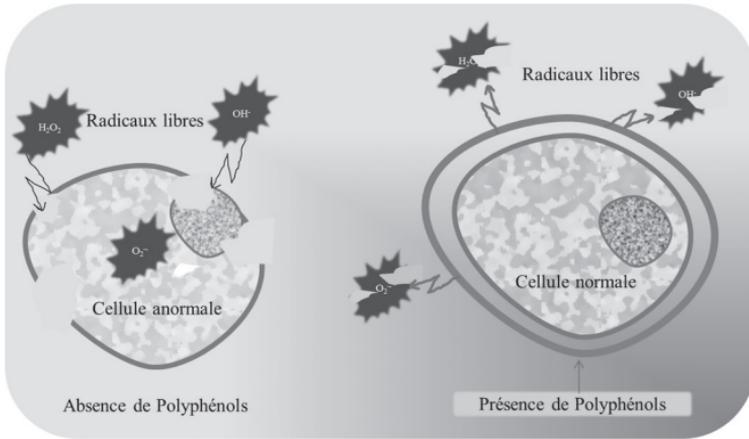


Figure 25. Schéma explicatif de l'effet protecteur des polyphénols de l'huile d'olive contre les radicaux libres.

Les érythrocytes prétraités par les composés phénoliques extraits de l'huile d'olive extra vierge résistent à l'oxydation des lipides et à l'hémolyse après un stress oxydatif induit par H_2O_2 . L'hydroxytyrosol empêche l'altération du transport des acides aminés par H_2O_2 dans les érythrocytes intacts (Manna *et al.*, 1999). De la même façon dans les cellules de tumeur intestinale (Caco-2) traitées avec H_2O_2 , prétraitement avec polyphénols, l'huile d'olive exerce un effet antioxydant puissant. La préincubation des cellules Caco-2 avec hydroxytyrosol empêche totalement les altérations induites par H_2O_2 (Manna *et al.*, 1999).

CHAPITRE 4

L'huile d'olive riche en polyphénols, son effet contre le vieillissement

Hydroxytyrosol, puissant composé phénolique de l'huile d'olive, augmente la production de mitochondries. Le nombre élevé de mitochondries dans la cellule est un indicateur de la jeunesse du corps et de la bonne santé.

Le vieillissement est un processus physiologique complexe par lequel les fonctions de plusieurs organes du système se détériorent (*Sung et al., 2005*). Plusieurs auteurs ont montré que les changements et les dommages liés à l'âge sont directement liés au stress oxydatif et aux réactions inflammatoires déclenchées par les radicaux libres qui sont des espèces chimiques hautement réactives (*Sung et al., 2005*).

Ces dommages sont plus remarquables au niveau des mitochondries, organites omniprésents dans les cellules, siège de réactions d'oxydoréduction produisant de l'énergie en convertissant les éléments nutritifs en adénosine triphosphate (ATP), molécule qui est utilisée pour le fonctionnement normal et l'entretien des cellules. Les mitochondries sont également impliquées dans la régulation de la survie cellulaire. Récemment, il a été suggéré que la perte de la fonction mitochondriale non seulement contribue à des maladies, mais joue également un rôle important dans le processus de vieillissement (*Raederstorff et al., 2010*).

Une diminution du nombre de mitochondries dans certains organes et une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale sont souvent associée au processus de vieillissement et est considéré comme un facteur majeur du vieillissement (*Hao et al., 2010*). Des sujets sains âgés de 65 à 75 années présentent des signes de modification des propriétés de mitochondries caractérisés par une perte de l'activité enzymatique oxydative mitochondriale et le contenu des tissus (*Raederstorff et al., 2010*). En outre, les tissus provenant d'animaux âgés montrent des changements dans la structure mitochondriale associée à une faible production d'énergie. Ainsi, le vieillissement est associé à une biogénèse mitochondriale réduite et une accumulation de dommages mitochondriaux.

1. Effet positif de l'hydroxytyrosol sur la biogénèse mitochondriale

La biogénèse mitochondriale se réfère à des processus de croissance, d'amplification et d'entretien sain de la mitochondrie. C'est un processus complexe impliquant à la fois des acteurs nucléaire et mitochondrial. L'ADN mitochondrial code pour un petit nombre de protéines, qui sont traduites sur les ribosomes des mitochondries. La plupart de ces protéines sont les sous-unités hydrophobes de la chaîne respiratoire, qui est localisée dans la membrane mitochondriale interne. Or, la plupart des protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire et traduites sur les ribosomes cytosoliques puis transportées vers les mitochondries. Ces protéines comprennent des protéines de structure, des enzymes ou des sous-unités d'enzymes, des composants de la réplication, la transcription, la traduction et les protéines chaperones.

Le PGC-1 α (peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α) est un facteur de régulation co-transcriptionnelle du métabolisme énergétique cellulaire

qui est impliqué dans la biogenèse mitochondriale, et par conséquent, le contrôle de la fonction mitochondriale. La diminution de PGC-1 α dans les tissus vieillissants est un facteur clé dans la dysfonction mitochondriale qui peut être prévenue par une élévation du PGC-1 α conduisant à une augmentation de la biogenèse mitochondriale.

Raederstorff et ses collaborateurs ont prouvé que l'hydroxytyrosol améliore la fonction mitochondriale grâce à l'activation des complexes de chaîne respiratoire mitochondriale et l'augmentation de la biogenèse mitochondriale en induisant l'expression du facteur PGC-1 α . Dans le même sens, Hao et ses collègues (2010) ont montré qu'une concentration de 0.1 à 10 $\mu\text{mol/l}$ d'hydroxytyrosol a stimulé l'expression du facteur PGC-1 α et ses cibles en aval, ce qui conduit à une augmentation de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et du nombre de mitochondries dans les adipocytes 3T3-L1.

Ainsi, une amélioration de la fonction mitochondriale pourrait prévenir le vieillissement cellulaire, et par conséquent, le vieillissement du corps (fig. 26). En conclusion, l'hydroxytyrosol peut être considéré comme un agent utile pour prévenir le vieillissement et les maladies liées à l'âge.

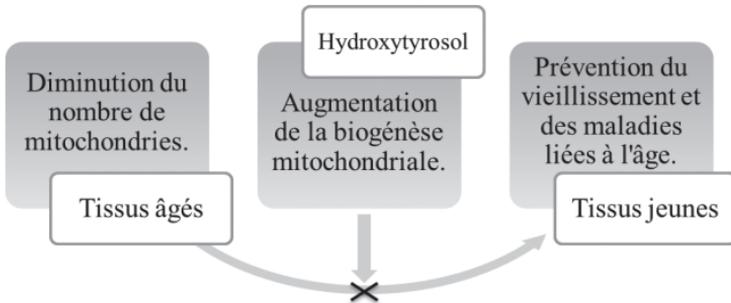


Figure 26. Effet antivieillesse de l'hydroxytyrosol.

2. Effet antiviellissement des polyphénols de l'huile d'olive sur les cellules cardiaques

Mukherjee et ses collaborateurs (2009), ont étudié la capacité de l'hydroxytyrosol et du tyrosol, ainsi que d'autres sources de polyphénols, à induire l'expression des protéines liées à la longévité des cellules cardiaques. Les cellules cardiaques, des rats traités par **2,5 mg/kg/j** de tyrosol et d'hydroxytyrosol pendant 14 jours, ont été isolées dans le but d'étudier leur teneur en protéines.

Les résultats ont prouvé la capacité du tyrosol et de l'hydroxytyrosol à induire plusieurs protéines liées à la longévité (antiviellissement) des cellules cardiaques, y compris PBEF, SirTs, et FoxOs.



CHAPITRE 5

L'hydroxytyrosol et l'oleuropéine contre le SIDA

L'oleuropéine et l'hydroxytyrosol sont des agents utiles pour inhiber la fusion et l'intégration du VIH dans les cellules humaines.

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: (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 de Traitement Antirétroviral Hautement Actif (HAART) (Hammer, 2005; Cohen, 2002), a considérablement réduit la morbi-mortalité causée par le VIH-1, en transformant le VIH/SIDA en 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** (Olivie

Plus) riches 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 ralentit considérablement la multiplication virale.

Des études *in vitro* indiquent que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol réagissent avec la partie hydrophobe conservée sur la surface de la centrale trimérique superhélice du complexe de fusion gp41 du VIH, le groupe de six hélicoïdales (6HB) et le domaine catalytique du site actif de l'intégrase. Par conséquent, ces deux composés ont un effet inhibiteur dose-dépendant sur la formation du complexe de fusion du VIH-1 avec la cellule hôte, avec une EC_{50} (concentration nécessaire pour atteindre 50 % de l'effet) de l'ordre de 58-66 nM, sans toxicité détectable (Lee-Huang et al., 2007).



CHAPITRE 6

L'Hydroxytyrosol et les polyphénols de l'huile d'olive, puissants anticancéreux

Hydroxytyrosol et polyphénols de l'huile d'olive sont de puissants protecteurs contre le cancer. Ces composés naturels sont aussi d'excellentes substances dans la prévention et le traitement du cancer.

1. Généralités

L'incidence du cancer dans les pays méditerranéens est plus faible que dans le reste des pays européens et les États-Unis (Keys et al., 1981). Des études épidémiologiques ont montré un faible taux du cancer du gros intestin, du sein, de l'endomètre et de la prostate dans le bassin méditerranéen. La principale raison pour cela, en dehors de possibles facteurs génétiques, est attribuée aux pratiques alimentaires. L'alimentation méditerranéenne traditionnelle se caractérise par une consommation élevée d'aliments d'origine végétale, une consommation relativement faible de viande rouge et une forte consommation d'huile d'olive et ses produits. Il y a un certain nombre d'études qui se sont intéressées aux effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé. Ces études ont rapporté que les lipides d'huile d'olive sont préventifs contre le cancer en comparaison aux autres formes de lipides ajoutés, en raison de leur teneur élevée en acides gras monoinsaturés (Owen et al., 2000a, b; Visioli et Galli, 2001). Une alimentation contenant 15 % d'huile d'olive pourrait réduire considérablement les lésions pré-cancéreuses du sein

et du côlon chez le rat (*Martin-Moreno et al., 1994; Corona et al., 2007; Paula et al., 2007*). Cependant, la même quantité d'huile de soja n'a pas eu un tel effet protecteur comme on s'y attendait (*La Vecchia et al., 1998*). En outre, l'incidence du cancer du sein était de 70 % moindre pour un groupe de rats nourris à l'huile d'olive par comparaison à un autre groupe ayant consommé l'huile de carthame sous les mêmes conditions expérimentales (*Owen et al., 2000a, b*). Ces données suggèrent que l'effet préventif de l'huile d'olive contre le cancer n'est pas seulement attribuable à la teneur en "bonnes" matières grasses.

2. Hydroxytyrosol/Oleuropéine, polyphénols à forts effets anticancéreux

Les composés mineurs de l'huile d'olive peuvent participer à la protection contre le cancer, tel est le cas des composés phénoliques de l'huile d'olive. Dans ce cadre, il a été démontré que l'hydroxytyrosol a un effet anticancéreux sur un adénocarcinome du côlon humain (cellules HT-29) et la leucémie promyélocytaire (cellules HL-60) (*Fabiani et al., 2002, 2006*), alors que l'oleuropéine inhibe la croissance des cellules (*Hamdi et Hamdi et 2005*):

- LN-18, peu différenciés du glioblastome (tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive);
- TF-1a, érythroleucémie;
- 786-O, l'adénocarcinome rénal;
- RPMI-7951, mélanome malin de la métastase du ganglion lymphatique de la peau;
- LoVo d'adénocarcinome colorectal.

Des propriétés anticancéreuses de l'oleuropéine et d'hydroxytyrosol ont été bien confirmées *in vitro* sur des lignées cellulaires différentes par plusieurs auteurs.

Le Centre National de Recherche Scientifique de Paris, en coordination avec la Faculté de Pharmacie de l'université Paris Sud, ont mené une étude clinique dirigée par le professeur Thierry CRESTEIL ainsi que le professeur Benlemlih. Cette étude en cours de publication dans une revue internationale a montré également qu'un extrait d'olivier riche en polyphénols (Olivie Riche) avait une activité cytotoxique puissante contre les cellules cancéreuses humaines *via* l'activation de voies nécrotiques et/ou apoptotiques. De plus, cet extrait réduit significativement ($p < 0,05$) les ROS produits dans les cellules exposées au stress oxydant. A côté de cela, l'extrait d'olivier a démontré une forte activité anti-angiogénique, qui était corrélée à une diminution significative ($p < 0,05$) de l'expression du VEGF, de l'angiopoïétine et de HIF1 α .

L'élimination des ROS, l'activation de l'apoptose et/ou de la nécrose et l'inhibition de l'angiogénèse font d'OLIVIE RICHE un excellent agent pour prévenir les maladies cancéreuses.

De plus, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent la possible corrélation entre la consommation de produits de l'olivier et l'incidence du cancer du sein.

3. Effet efficace de l'Hydroxytyrosol et l'Oleuropéine sur le traitement et la prévention du cancer du sein

Han *et al.*, 2009 ont étudié l'effet anti-prolifératif et apoptotique *in vitro* de l'oleuropéine et d'hydroxytyrosol (200 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivement pendant 12h de culture) sur les cellules MCF-7 du cancer du sein, les résultats (fig. 27) ont montré que ces deux produits :

- diminuent la viabilité des cellules en induisant l'apoptose des cellules MCF-7,
- inhibent la prolifération des cellules MCF-7.

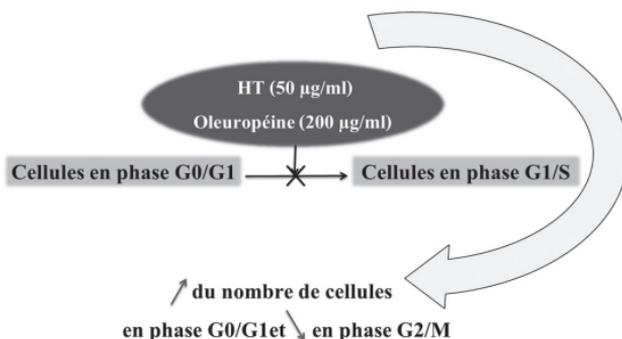


Figure 27. Effet anti-prolifératif de l'hydroxytyrosol sur les cellules MCF-7 du cancer du sein.

De plus, une étude a montré que l'hydroxytyrosol glycosylé induisait une régression tumorale *in vivo*. Des souris porteuses de tumeurs spontanées ont reçu par voie orale une administration d'oleuropéine. Certaines souris présentent des tumeurs multiples (représentée par la souris A), tandis que d'autres portaient une masse tumorale unique (représentée par la souris B). Après 9 à 12 jours de traitement, les tumeurs avaient complètement régressé (fig.28) (Hamdi et Castellon, 2005).

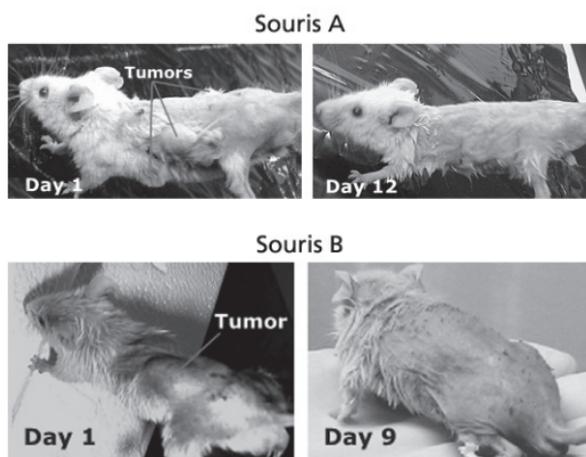


Figure 28. Régression des tumeurs chez les rats traités par l'hydroxytyrosol (Hamdi et Castellon, 2005).

De nombreux aliments d'origine végétale contiennent des substances possédant des propriétés anticancéreuses (*Huang et al., 1994; Johnson et al., 1994; Pezzuto, 1997*), la plupart d'entre elles sont actives comme antioxydants (*Aruoma, 1994*). Depuis la découverte de l'implication des ROS dans la genèse des tumeurs, l'étude de l'activité antitumorale des composés phénoliques de l'huile d'olive s'est avérée primordiale.

Les peroxy-nitrites (ONOO^-) sont des composés très réactifs, capables d'induire la peroxydation des lipides, l'oxydation de la méthionine et la lésion de l'ADN par désamination et nitration (*Yermilov et al., 1995*). Les peroxy-nitrites sont formés par la réaction entre le monoxyde d'azote (NO) et l'anion superoxyde. La désamination de la guanine et de l'adénine casse la chaîne de l'ADN, ce qui mène alors à l'apparition de mutations (*de Rojas-Walker et al., 1995*); l'oxydation de l'ADN est également potentiellement mutagène (*Newcomb & Loeb, 1998*). *In vitro*, la présence d'hydroxytyrosol réduit les effets biochimiques des peroxy-nitrites, tels que la désamination de l'adénine et de la guanine dans certaines lignées cellulaires (*Deiana et al., 1999*).

En plus de cette action, les extraits d'huile d'olive vierge montrent une action inhibitrice sur l'activité de la xanthine oxydase, avec une réduction conséquente de la formation du superoxyde (*Owen et al., 2000a*). Un apport adéquat d'huile d'olive a donc une double action: il donne une protection contre les effets des radicaux oxygénés et réduit l'activité de la xanthine oxydase, une enzyme potentiellement impliquée dans la cancérogenèse (*Tanaka et al.*).

Bernini et ses collègues (2011) ont synthétisé un nouvel ester d'hydroxytyrosol et d'acide α -lipoïque avec un rendement satisfaisant par des procédures simples et originales. L'activité antiproliférative de ce produit à base d'hydroxytyrosol a été évaluée sur l'adénocarcinome colorectal humain, lignée cellulaire HT-29. Le composé a montré une activité inhibitrice

de la croissance cellulaire significativement plus puissante que les composés parents naturels correspondants, très probablement, due à l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Ces données suggèrent que le nouvel ester peut exercer une activité antitumorale plus efficace que l'hydroxytyrosol et l'acide α -lipoïque.

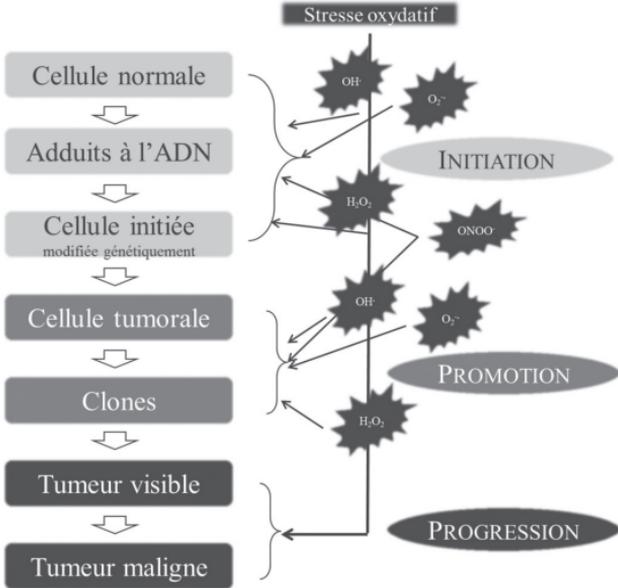


Figure 29. Effet du stress oxydatif sur les trois étapes de la carcinogénèse.

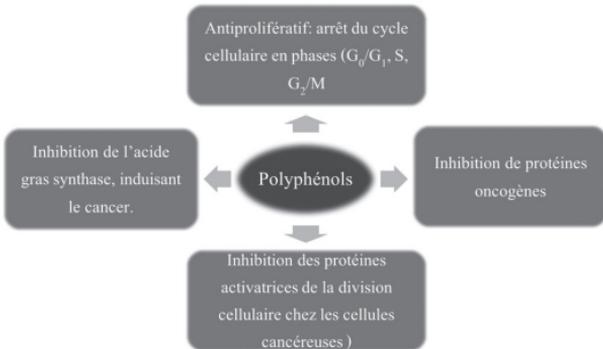


Figure 30. Autres effets anticancéreux des polyphénols.

CHAPITRE 7

Etude in vitro

L'Oléocanthal induit rapidement et sélectivement la mort des cellules cancéreuses par perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP)

Par Onica LeGendre^{ab}, P.A.S. Breslin^{cd} et David A. Foster^a. O LeGendre^{ab}, P A S Breslin^{cd} & D A Foster^a*

^a Department of Biological Sciences, Hunter College of the City University of New York.

^b Department of Natural Sciences, LaGuardia Community College of the City University of New York, Long Island City, New York

^c Rutgers University Department of Nutritional Sciences, New Brunswick New Jersey

^d Monell Chemical Senses Center, Philadelphia Pennsylvania

Publié par Molecular & Cellular Oncology - Editeur: Taylor & Francis le 23 janvier 2015.

Tout récemment, des scientifiques étasuniens de l'Université Rutgers et du Hunter College de la City University of New York ont publié leurs recherches sur l'**effet anti-cancer** d'un composant particulier de l'huile d'olive: l'**oléocanthal** (en février 2015, dans le périodique Molecular & Cellular Oncology). Dans cette étude, ils concluent que l'oléocanthal pénètre à l'intérieur des cellules cancéreuses et y détruit les lysosomes, plus gros et plus fragiles dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines. Ainsi, la cellule

«malade» finit par mourir. Par contre, les cellules saines, elles, demeurent intactes.

L'autre surprise intéressante pour ces chercheurs a constitué la rapidité avec laquelle cette molécule a tué les cellules cancéreuses: en à peine 30 minutes! Alors que plusieurs heures sont nécessaires en général!

Vous trouverez ci-dessous l'intégralité de cette étude.

1. Résumé

L'Oleocanthal (OC), un composant phénolique de l'EVOO (huile d'olive extra vierge), a été impliqué dans les bénéfices santé associés aux régimes riches en EVOO. Nous avons étudié l'effet de l'OC sur les lignées de cellules cancéreuses humaines en culture. Etonnamment, l'OC a induit la mort cellulaire dans toutes les cellules cancéreuses étudiées – dès 30 minutes après le traitement en absence de sérum. Le traitement à l'OC de cellules non transformées a supprimé la prolifération mais n'a pas provoqué la mort cellulaire. L'OC a induit la mort cellulaire nécrotique et apoptotique primaires par l'induction de la LMP (perméabilisation de la membrane lysosomale). Nous apportons la preuve que l'OC favorise la LMP en inhibant l'activité de l'ASM (acide sphingomyélnase) ce qui déstabilise l'interaction entre les protéines nécessaires à la stabilité de la membrane lysosomale. Les données présentées ici indiquent que les cellules cancéreuses, dont la membrane lysosomale est fragile comparée à celle des cellules non cancéreuses, sont sensibles à la mort cellulaire induite par un agent lysosomotropique. C'est pourquoi, viser à la stabilité de la membrane lysosomale représente une nouvelle approche pour induire la mort de cellules cancéreuses.

2. Introduction

L'EVOO, composant central du régime méditerranéen, contient beaucoup d'antioxydants phénoliques qui sont de puissants inhibiteurs des espèces d'oxygène réactives et est associée à une réduction du risque de plusieurs types de cancers humains (Giacosa *et al*, 2013). On a démontré que les secoridoïdes phénoliques de l'EVOO diminuaient la viabilité des cellules du cancer du sein surexprimant le HER2 en induisant la mort apoptotique de la cellule (Menendez *et al*, 2007). (-)-Oleocanthal (OC), une forme di-aldéhydique de ligostride aglycone isolée à partir de l'EVOO, possède un large éventail d'effets biologiques - c'est un puissant antioxydant, un agent anti-inflammatoire non stéroïdien qui inhibe la COX-1 et la COX-2; un neuroprotecteur qui modifie la structure et la fonction des neurotoxines, β -amyloïde et Tau, associé à un effet affaiblissant la maladie d'Alzheimer; un inhibiteur de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaires des cancers du sein et de la prostate chez les humains par inhibition c-Met; un inhibiteur du AMPK dans les cellules cancéreuses du colon; et un inhibiteur de la protéine -1a inflammatoire macrophage dans de nombreux myélomes. (Beauchamp *et al*, 2005; Busnena *et al*, 2013; Elnagar *et al*, 2011; Monti *et al*, 2012; Scotece *et al*, 2013; Pitt *et al*, 2009).

Pour étudier les effets anti-cancer de l'OC, nous avons examiné son impact sur la viabilité et la survivance des cellules cancéreuses et non-cancéreuses. Il est intéressant de noter que l'OC provoque rapidement (endéans les 30 min.) la perte de viabilité des cellules cancéreuses en fonction de la dose. Si on supprime le sérum, l'OC favorise la mort cellulaire nécrotique primaire des cellules cancéreuses ce qui corrèle avec des niveaux élevés de ERK1/2 phosphorylée en l'absence de l'expression de caspase-3 clivée. En présence de sérum, on a observé une combinaison d'apoptose et de nécrose secondaire. Il est intéressant de noter que l'OC induit un arrêt réversible du cycle cellulaire des cellules non cancéreuses qui maintient leur viabilité. Nos découvertes

indiquent que la déstabilisation de la membrane lysosomale menant à l'induction de la LMP favorise la mort des cellules cancéreuses obtenue par médiation de l'OC. La LMP induite par l'OC est obtenue par l'inhibition de l'activité de l'ASM qui peut être déréprimée par la régulation à la hausse du Hsp70 ou le traitement dual avec des lipides anioniques. Ces données fournissent la preuve que la source de l'activité anti-cancer de l'EVOO est due, en partie, à la capacité de l'OC à rompre les membranes lysosomales dans les cellules cancéreuses entraînant la mort cellulaire via la nécrose et/ou l'apoptose. Important : les cellules non-cancéreuses restent en vie grâce à l'intégrité de leurs membranes lysosomales.

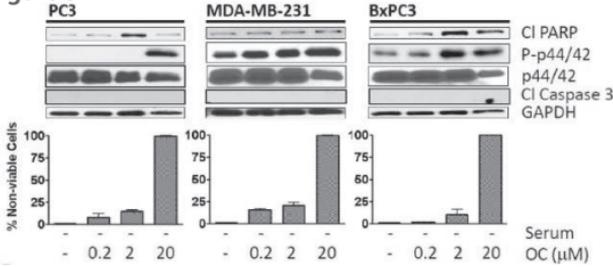
3. Résultats

L'oléocanthal induit la perte de viabilité des cellules cancéreuses, mais l'arrêt réversible du cycle cellulaire dans les cellules non-cancéreuses.

On a montré précédemment que l'OC inhibe la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires dans les cellules des cancers du sein et de la prostate par inhibition de la phosphorylation du c-Met (*Elnagar et al, 2011*). On a montré aussi que l'OC inhibe la prolifération cellulaire dans les cellules du myélome multiple par induction de l'apoptose et inhibition de l'expression de la protéine 1- α inflammatoire macrophage (*Scotece et al, 2013*). Pour mieux explorer le mécanisme par lequel l'OC induit la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses, nous avons étudié l'effet de l'OC sur la viabilité de la cellule dans les cellules cancéreuses PC3 (prostate), MDA-MB-231 (sein) et BxPC3 (pancréas).

Sous retrait du sérum, 20 μ M OC induit rapidement une perte d'adhésion cellulaire endéans les 30 min. après le traitement ainsi que 100% de cellules non viables dans toutes les lignées de cellules cancéreuses après 24 heures de traitement (**fig. 31A**).

Figure 31A



Il est intéressant de noter que l'OC augmente les niveaux de p44/42 phosphorilés mais n'augmente pas significativement les niveaux de polymérase poly-ADP-ribose clivée (PARP) – un indicateur de la mort apoptotique – en l'absence de sérum. On a montré précédemment que l'activation ERK est un médiateur critique du dysfonctionnement mitochondrial et de la mort cellulaire nécrotique de cellules épithéliales du rein après traitement avec des agents oxydants (*Zhuang et al, 2008*). Il est important de noter que l'OC n'a pas induit l'expression de caspase-3 clivée en l'absence de sérum. La caspase-3, un effecteur nécessaire aux caractéristiques morphologiques et biochimiques associées à l'apoptose, est clivée pendant les voies de signalisation de la mort cellulaire apoptotique à la fois intrinsèque et extrinsèque (*Salvesen et al, 2002; Ghavami et al, 2009*). L'absence de l'expression de la caspase-3 clivée lors du traitement à l'OC en absence de sérum indique que les cellules cancéreuses se sont passées de la machinerie apoptotique entraînant la mort cellulaire. Le traitement à l' OC a aussi eu pour résultat la perte totale de l'activité mitochondriale à des concentrations micro-molaires basses en l'absence de sérum comme mesuré dans le test MTT (données non communiquées). Prises ensemble, la perte rapide de viabilité provoquée par l'OC et l'absence de PARP et du clivage de la caspase-3 laissent supposer que l'OC induit la mort cellulaire nécrotique primaire en l'absence de sérum pour toutes les cellules cancéreuses.

Mais, en présence de sérum, le traitement à l'OC fait monter le niveau de PARP clivée et clive la caspase-3 ce qui corrèle avec un nombre accru de cellules non viables dans toutes les cellules cancéreuses examinées (**fig. 31B**). L'OC n'a pas eu d'effet significatif sur le niveau de P-p44/42 en présence de sérum là où les niveaux de départ de P-p44/42 tendaient à être élevés (**fig. 31B**) et n'a que partiellement inhibé l'activité mitochondriale (données non communiquées) ce qui corrèle avec la perte de viabilité de la cellule observée dans les **fig. 31B**. En présence de sérum, l'OC induit donc la mort cellulaire par activation de mécanismes apoptotiques. Globalement, ces données indiquent que l'OC induit rapidement la mort de cellules cancéreuses robustes via différents mécanismes en fonction de la présence ou de l'absence de sérum.

Figure 31B

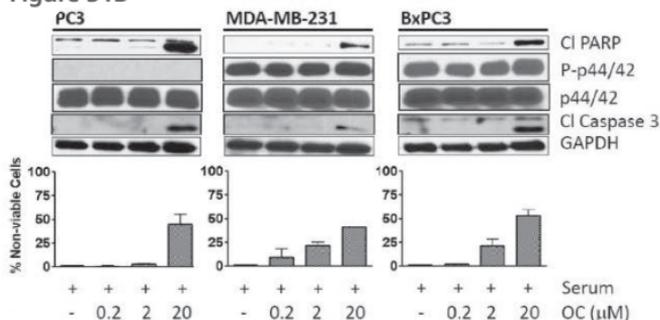
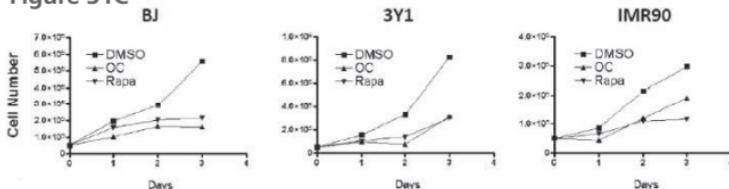


Figure 31C

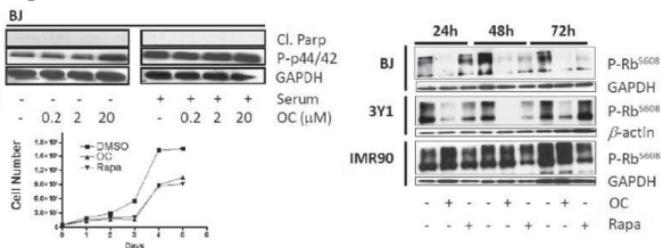


Nous avons énormément besoin de thérapies ciblées contre le cancer qui soient toxiques pour les tumeurs et non toxiques pour les tissus non cancéreux, mais il n'y en a guère. Vu que les données des **fig. 31A** et **31B** prouvent que l'OC induit significativement la mort cellulaire des cellules cancéreuses,

nous avons étudié l'effet de l'OC sur les fibroblastes BJ humains non cancéreux, les fibroblastes du rat 3Y1 et les fibroblastes du poumon humain IMR90. Comme le montre la **fig. 31C**, l'OC inhibe la prolifération cellulaire dans les 3 cellules non cancéreuses examinées, comme déterminé par le nombre de cellules après 72 heures de traitement. On a utilisé la Rapamycine comme contrôle positif pour sa capacité à induire l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (*Law et al, 2002*). Il est important de noter que l'OC n'a pas induit de clivage PARP en présence ou absence de sérum et que la prolifération cellulaire a été rétablie après 72 heures de traitement à l'OC dans les cellules BJ (**fig. 31D**, panneau gauche supérieur et inférieur).

La phosphorylation du Rb est une étape critique pour passer de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (*Ho et al, 2002*). Une sous-phosphorylation du Rb inhibe l'activité E2F par séquestration donc en inhibant la progression du cycle cellulaire (*Goodrich et al, 1991; Helin et al, 1993*). On dit que la phosphorylation Rb à Ser608 est nécessaire pour diminuer l'affinité de liaison du E2F au Rb (*Schmitz et al, 2006*). C'est pourquoi nous avons examiné l'effet de l'OC sur les niveaux de phospho-Rb à Ser608 dans les cellules non cancéreuses. Comme le montre la **fig. 31D** (panneau de droite), le traitement à l'OC des cellules non cancéreuses BJ et 3Y1 (fibroblaste embryonnaire du rat) a eu pour résultat une diminution des niveaux de phospho-Rb à Ser608 après 24 heures, qui a continué pendant 72 heures en présence de sérum. Les cellules IMR90 n'ont pas montré de diminution significative de phosphorylation de Rb à Ser608 – reflétant probablement l'arrêt du cycle cellulaire à l'extérieur de G1 (*Kalan et al, 2013*). Ces données font supposer que le traitement à l'OC n'induit pas la mort cellulaire dans les cellules non cancéreuses mais induit plutôt de façon réversible l'arrêt du cycle cellulaire par suppression de la phosphorylation du Rb ce qui sert à protéger les cellules saines contre les effets négatifs du traitement à l'OC.

Figure 31D



L'oléocanthal induit de façon différente la mort cellulaire en fonction de l'absence et de la présence de sérum dans les cellules cancéreuses.

Les modifications morphologiques et biochimiques associées à la mort cellulaire apoptotique ont lieu entre 6 à 12 heures après l'événement traumatique entraînant la formation de corps apoptotiques entre 24-48 heures (*Furuya et al, 1994*). La vitesse avec laquelle l'OC induit l'arrondissement de la cellule et la perte d'adhérence du substrat en l'absence de sérum (observé endéans les 30 min. après traitement) fait penser à une forme non-apoptotique de mort cellulaire. Comme on l'a vu dans la **fig. 31A**, 20μM d'OC induit une phosphorylation élevée de ERK1/2 – qui a été associée à la mort cellulaire nécrotique (*Zhuang et al, 2008*) - en l'absence de PARP clivé et d'expression de capsase-3 clivée. C'est pourquoi nous avons étudié la méthode par laquelle l'OC induit la mort cellulaire en l'absence de sérum en utilisant un kit de test spécifique de la mort cellulaire qui fait la distinction entre apoptose et nécrose. Un dosage plus faible d'OC (10μM) a été utilisé pour diminuer le taux d'arrondissement de la cellule pour pouvoir déterminer la méthode spécifique de mort cellulaire. Comme montré dans la **fig. 31A**, le traitement à l'OC induit un nombre significatif de cellules nécrotiques après 24 heures de traitement. Le nombre élevé de cellules nécrotiques observées explique la forte perte de viabilité cellulaire en l'absence de caspase -3 clivée et l'augmentation limitée en PARP clivées observée

dans la **fig. 31A** ce qui confirme davantage la mort cellulaire via une voie de signalisation nécrotique primaire. Alors qu'on n'observe pas de clivage PARP en l'absence de sérum, à cause de l'activation de la voie de signalisation de mort cellulaire nécrotique primaire, on a observé une augmentation du PARP clivé et des niveaux de caspase-3 lors d'un traitement à l'OC en présence de sérum, ce qui a donné plus de cellules apoptotiques que nécrotiques (**fig. 31B**). Les voies de signalisation qui régulent la mort cellulaire participe à la fois à la nécrose et à l'apoptose ; il est donc possible d'avoir une mort cellulaire apoptotique et nécrotique secondaire dans la même population cellulaire (*Proskuryakov et al, 2003; Fink et al, 2005*). Collectivement, les **fig. 31A et B** suggèrent que l'OC induit la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses via des mécanismes à la fois apoptotique et nécrotique en fonction de la présence et de l'absence de sérum.

L'oléocanthal régule à la baisse l'activité de l'acide sphingomyélnase pour induire la membrane lysosomale et la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses ce qui est annulé par les lipides anioniques.

Quand elle est provoquée par une blessure grave qu'elle soit extracellulaire ou intracellulaire, la nécrose primaire peut être identifiée par la perméabilisation rapide de la membrane plasmatique (*Proskuryakov et al, 2003*). Il y a peu, on a impliqué les lysosomes dans la mort cellulaire à cause de la libération d'enzymes hydrolytiques lysosomales dans le cytosol entraînant la mort cellulaire apoptotique (via la perméabilisation de la membrane mitochondriale extérieure (MOMP) et l'activation de la caspase) ou nécrotique (via acidification cytosolique) (*Boya et al, 2008*). Pour déterminer si la LMP sert de médiateur pour la mort cellulaire induite par l'OC, nous avons étudié l'intégrité de la membrane lysosomale après traitement à l'OC en utilisant de l'acridine orange. L'acridine orange est un fluorochrome lysosomotropique métachromatique qui émet une fluorescence rouge si elle est

très concentrée dans des lysosomes intacts (*Antunes et al, 2001*). L'OC a significativement réduit la fluorescence rouge tant en absence qu'en présence de sérum indiquant que la mort cellulaire induite par l'OC est favorisée par l'induction de la LMP dans toutes les lignées de cellules cancéreuses (**fig. 31A**). Cependant l'OC n'a pas réduit la fluorescence rouge en l'absence ou la présence de sérum dans les cellules BJ indiquant que l'OC n'induit pas la LMP dans ces cellules non cancéreuses (**fig. 31A**, panneau inférieur).

L'intégrité de la membrane lysosomale est régulée par l'activité de l'ASM, une lipase lysosomale responsable de l'hydrolyse de la sphingomyéline (SM) en céramide (*Kirkegaard et al, 2010*). Petersen *et al.* ont montré que la siramesine, un médicament cationique amphiphilique, induit la LMP en inhibant l'activité de l'ASM (*Petersen et al, 2013*). C'est pourquoi nous avons étudié l'effet de l'OC sur l'activité de l'ASM. Comme montré dans la **fig. 31B** (graphe de gauche), sous retrait du sérum, l'activité de l'ASM était inhibée jusqu'à 40% après un traitement avec 10 μ M d'OC pendant 4 heures. En présence de sérum, 10 μ M d'OC induisait un maximum de 10% d'inhibition de l'activité de l'ASM (**fig. 31B**, panneau de droite). Le niveau par lequel l'activité de l'ASM est inhibé corrèle avec la voie de signalisation spécifique de mort cellulaire qui est activée en fonction du traitement à l'OC et du degré de LMP. La LMP massive ou complète libère rapidement des protéases des lysosomes et on a montré qu'elle induisait la mort cellulaire nécrotique alors qu'une LMP partielle ou sélective libère des protéases des lysosomes d'une façon qui active la mort cellulaire apoptotique programmée (*Kroemer et al, 2005; Guicciardi et al, 2004*). Ces découvertes révèlent une corrélation entre la mort cellulaire nécrotique ou apoptotique induite par l'OC et le niveau de l'activité de l'ASM.

L'activité de l'ASM est régulée par sa capacité à se lier au bis (monoacylglycerol) phosphate (BMP), un lipide anionique essentiel comme cofacteur pour le métabolisme de la

sphingomyéline lysosomale (Kolter et al, 2010). On a montré que le Hsp70 se lie avec une grande affinité et spécificité au BMP, favorisant ainsi la stabilité du complexe BMPASM qui inhibe à son tour la LMP et favorise la survivance de la cellule (Kirkegaard et al, 2010). C'est pourquoi nous nous sommes demandé si le Hsp70 inhiberait la LMP induite par l'OC. On a montré que la céruléine, inhibiteur de la synthèse des acides gras, régulait à la hausse l'expression du Hsp70 grâce à la capacité du Hsp70 d'interagir directement avec les acides gras (Dridi et al, 2013). Sous retrait de sérum, la surexpression du Hsp70 due à la céruléine inhibe partiellement la LMP induite par l'OC dans les cellules cancéreuses PC3 (**fig. 31C**). On a montré que les lipides cationiques ou les médicaments cationiques amphiphiliques déstabilisent la membrane lysosomale en inhibant l'hydrolyse de la SM via une régulation à la baisse de l'activité de l'ASM (Petersen et al, 2013; Wattiaux et al, 1997). Mais on a montré que les lipides anioniques amphiphiliques ou les acides gras libres favorisent l'activité ASM (Jenkins et al, 2009; Oninla et al, 2014; Linke et al, 2001). C'est pourquoi nous avons étudié l'effet d'un mélange de lipides anioniques sur le LMP induite par l'OC. Comme montré dans le **fig. 31D** (panneau de gauche), le traitement aux lipides anioniques inhibait la LMP induite par l'OC en absence de sérum dans les cellules PC3. L'inhibition de la LMP induite par l'OC corrélait aussi avec une augmentation de la viabilité cellulaire mesurée par le pourcentage des cellules attachées (**fig. 31D** panneau de droite). Un traitement double de lipides et OC n'a pas entraîné la mort cellulaire comme observé par le manque de cellules flottantes après 24 à 72 heures de traitement à l'OC seul – la diminution du nombre de cellules est due à la diminution de la prolifération cellulaire. Ces données indiquent que le maintien ou la stimulation de l'activité ASM – via l'addition de lipides anioniques – augmente la stabilité de la membrane lysosomale prévenant ainsi la mort cellulaire induite par la LMP dans les cellules cancéreuses. Ensemble, les données des **fig. 31A, B, C** indiquent que dans les

cellules cancéreuses l'OC inhibe l'activité ASM qui entraîne une LMP complète ou partielle, ayant pour résultat la mort cellulaire nécrotique ou apoptotique en absence ou présence de sérum respectivement.

4. Discussion

Les données rassemblées ici démontrent que l'OC induit la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses via la régulation à la baisse de l'activité de l'ASM entraînant la LMP alors qu'elle arrête les cellules non cancéreuses de façon réversible. Dans les cellules non cancéreuses, l'OC induit l'arrêt du cycle cellulaire G1 via inhibition de la phosphorylation Rb à Ser608 empêchant la progression du cycle cellulaire vers la phase S (*Flemington et al, 1993; Nylandsted et al, 2004*). Il est important de noter que les cellules non cancéreuses arrêtées par l'OC recommencent à proliférer après 72 heures de traitement à l'OC.

Par opposition à l'arrêt du cycle cellulaire observé dans les cellules non cancéreuses, les cellules cancéreuses ont rapidement subi soit la mort cellulaire nécrotique primaire corrélant avec une augmentation de la phosphorylation ERK1/2 en l'absence de caspase-3 clivée et de PARP sous retrait de sérum ou la mort cellulaire apoptotique qui dépend de la caspase-3 en présence de sérum via induction de la LMP. Pendant le développement des cellules cancéreuses, les lysosomes subissent des transformations morphologiques qui entraînent une augmentation de leur taille et une plus forte activité de la cathepsine que dans les cellules normales (*Nylandsted et al, 2004*). L'augmentation de la taille des lysosomes rend les cellules sensibles au traitement par agents anticancer (*Mohamed et al, 2006*). La LMP provoque une libération de cathepsines (protéases lysosomales) dans le cytosol entraînant la dégradation des protéines cellulaires (*Boya et al, 2008*). Par conséquent, le nombre et la proportion des enzymes lysosomales libérées dans le cytosol servent de

médiateur à l'activation des voies de signalisation nécrotique et apoptotique. Nous avons montré ici que le degré de la suppression de l'activité de l'ASM due à l'OC corrèle avec l'activation de voies de signalisation de la mort cellulaire spécifique.

Alors que la fragilité de la membrane lysosomale augmente la prédisposition d'une cellule cancéreuse à la LMP, les cellules cancéreuses ont surmonté cette vulnérabilité en surexprimant le Hsp70, un régulateur du complexe multi-protéines et du transport des protéines à travers les membranes cellulaires (*Garrido et al, 2006*). Le Hsp70 se trouve sur la membrane lysosomale et la protège de la LMP en favorisant l'activité ASM et en stabilisant l'interaction entre ASM et BMP. C'est pourquoi, les cellules cancéreuses qui surexpriment le Hsp70 favorisent la survivance cellulaire en augmentant l'intégrité lysosomale pour prévenir la LMP (*Nylandsted et al, 2004; Garrido et al, 2006*). Cette étude affirme qu'une expression croissante du Hsp70 utilisant la céruléine, un inhibiteur de la synthèse des acides gras, supprime la LMP induite par l'OC dans les cellules PC3 grâce à la stabilité accrue de la membrane lysosomale (*Dridi et al, 2013*). Alors que les lipides cationiques déstabilisent le membrane lysosomale en régulant l'interaction entre l'ASM et la membrane lysosomale, on a montré que les lipides anioniques tels le BMP et le phosphatidylinositol (PI) activaient l'activité ASM comme mesurée par l'augmentation de l'hydrolyse de la SM (*Wattiaux et al, 1997; Oninla et al, 2014; Linke et al, 2001*). Nous avons aussi fourni la preuve que les acides gras anioniques libres sont capables de stabiliser la membrane lysosomale et de prévenir la LMP. Nos découvertes font penser que la mort des cellules cancéreuses causée par l'OC est due à sa capacité d'agir comme agent lysosomotropique et facilite la LMP complète en absence de sérum et partielle en sa présence – ce qui a un rapport avec le taux d'inhibition de l'activité ASM.

Il y a peu, on a découvert que l'OC empêche la croissance de la tumeur dans un modèle orthotopique de cancer du sein chez les souris nudes athymiques (*Akl et al, 2014*). Cette étude présentait des données impliquant la suppression de c-Met comme conséquence critique du traitement à l'OC. Dans cette étude, on ne sait pas si c'est la LMP ou la PARP clivée observée qui est impliquée dans la mort cellulaire. Cependant cette étude démontre que l'OC a les mêmes effets que dans l'étude présente dans un modèle animal montrant de faibles effets de l'OC sur des cellules normales ce qui renforce le potentiel de l'OC comme agent thérapeutique dans le cancer du sein et dans d'autres cancers.

Notre étude fournit un mécanisme par lequel l'OC induit sélectivement et rapidement la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses sans être cytotoxique pour les cellules non-cancéreuses. Des composés qui induisent la déstabilisation de la membrane lysosomale, tel l'OC, représentent une méthode viable pour tirer profit de la vulnérabilité des lysosomes hypertrophiés des cellules cancéreuses. Cette étude fait penser que l'activité chimio-préventive de l'EVOO est due à la capacité de ses composés phénoliques bioactifs, particulièrement l'OC, d'induire la mort cellulaire en pénétrant le lysosome et en inhibant l'activité ASM, ce qui induit la LMP. C'est pourquoi la capacité de l'OC à induire la LMP dans les cellules cancéreuses mais pas dans les cellules normales représente une nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter beaucoup de cancers où les lysosomes sont plus grands et apparemment plus sensibles aux agents lysosomotropiques.



CHAPITRE 8

Effet protecteur des polyphénols de l'huile d'olive sur le système cardiovasculaire

L'huile d'olive riche en polyphénols permet la prévention et le traitement des maladies cardio-vasculaires. En effet, les polyphénols de l'huile d'olive favorisent la réduction de la présence des molécules d'adhérence cellulaire, augmentent la disponibilité du monoxyde d'azote, suppriment l'agrégation plaquettaire, stimulent les antioxydants endogènes des LDL pour retarder l'artériosclérose et réduisent les réactions inflammatoires.

1. Généralités

Les maladies non transmissibles seront responsables de plus de trois quarts de tous les décès en 2030 (Ortega, 2006). Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de morbi-mortalité dans le monde, avec un nombre de décès qui va augmenter de 17,1 millions en 2004 à 23,4 millions en 2030 (Ortega, 2006). La cardiopathie ischémique a été classée comme la première cause mondiale de mortalité en 2004 et, malheureusement, en 2030 dans les pays industrialisés (Ortega, 2006). Ainsi, l'incidence de la mortalité par la cardiopathie ischémique est également en croissance rapide dans les pays moins développés. L'infarctus aigu du myocarde constitue une manifestation catastrophique de la cardiopathie ischémique et l'athérosclérose coronarienne. Des taux élevés, inacceptables, de mortalité à cause de

l'infarctus aigu du myocarde existent encore dans de nombreux pays développés.

Cependant, une faible incidence de ces maladies, étonnamment, est observée dans plusieurs pays du sud européen comme la France, l'Espagne, la Grèce, l'Italie et le Portugal, en comparaison aux pays nordiques ou aux États-Unis (fig. 32b). Ce contraste contribue partiellement à expliquer la hausse de l'espérance de vie dans les régions méditerranéennes. L'alimentation méditerranéenne a été désignée comme étant le principal facteur responsable de cet avantage (*Menotti et al., 1997; Perez-Jimenez et al., 1999*). Une des caractéristiques les plus importantes est la présence abondante d'huile d'olive comme principale graisse culinaire dans ces pays (fig. 32a).

Cependant, une variété de facteurs intervient pour la détermination des taux de mortalité causés par les maladies cardiovasculaires, y compris les différents régimes alimentaires régionaux, la qualité des soins de santé et le statut socio-économique. Il est généralement établi que le régime finlandais, basé sur les acides gras des viandes rouges, le beurre et le pain, favorise les maladies cardiovasculaires en comparaison à l'alimentation méditerranéenne. D'autres facteurs, y compris les déterminants génétiques, les gestions différentes de stress, la nature des activités quotidiennes, ainsi que l'environnement peuvent contribuer à ces disparités de santé observées.

Les pays méditerranéens, producteurs et consommateurs d'huile d'olive sont significativement moins touchés par les maladies cardiovasculaires que ceux qui ne consomment pas cette huile, à l'exception du Japon. Les japonais ont une alimentation riche en polyphénols.

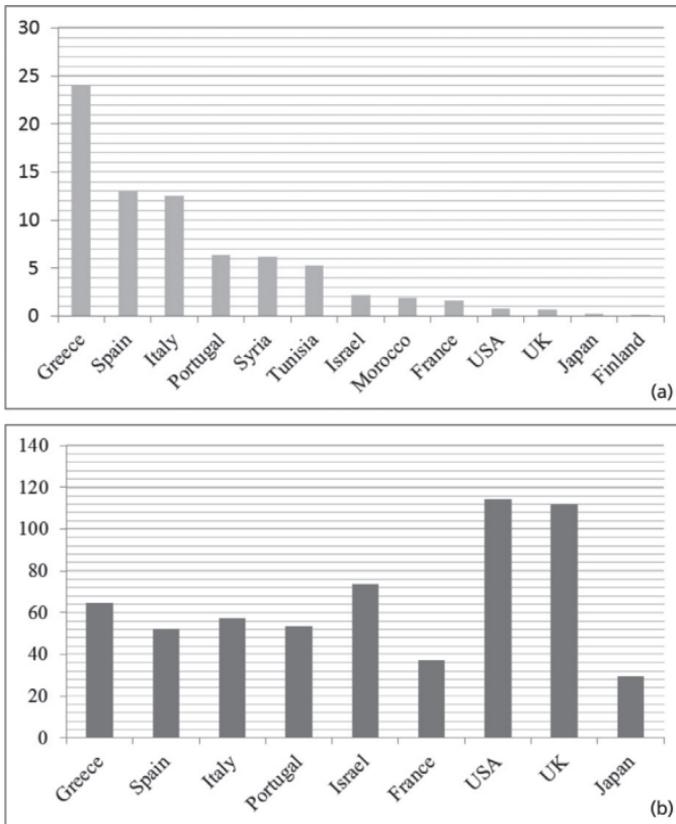


Figure 32. (a) la consommation par habitant d'huile d'olive dans certains pays (Conseil Oléicole International). (b) Le taux de mortalité par maladies cardiovasculaires selon l'Organisation Mondiale de la Santé (maladies cardio-vasculaires Infobase) (Huang et al., 2008).

Les polyphénols s'opposent à la chaîne de réactions initiée et soutenue par les radicaux libres. Cela empêche les dommages sur l'ADN, la formation d'hydroperoxyde et la peroxydation lipidique (Visioli et Galli, 1998; Katiyar et Mukhtar, 1996). En outre, les antioxydants exogènes augmentent la concentration d'antioxydants présents dans le corps et protègent contre les maladies dégénératives

(Visioli *et al.*, 1995). Les flavonoïdes contribuent à épargner les taux de base de α -carotène, urate (sels d'acide urique) et des vitamines C et E (Sumpio *et al.*, 2006). Les composés phénoliques favorisent la réduction de la présence des molécules d'adhérence cellulaire, augmentent la disponibilité du monoxyde d'azote (NO), suppriment l'agrégation plaquettaire, stimulent les composés phénoliques des LDL pour retarder l'athérosclérose et réduisent les réactions inflammatoires (Perez-Jimenez, 2005).

2. Composés phénoliques et prévention de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire de la paroi artérielle qui résulte d'une agression initiale de l'endothélium vasculaire par une multitude d'agents dont principalement les lipoprotéines athérogènes (LDL, petites-VLDL) et la fumée de tabac. Selon la classification de l'« American Heart Association » les plaques d'athérome peuvent présenter cinq phases successives d'évolution, identifiées d'un point de vue histopathologique par six types de plaque. Les deux premiers correspondent à l'absorption des LDL oxydées (Ox-LDL) par les macrophages sous-endothéliaux et à la formation de cellules spumeuses (type I), dont l'accumulation constitue les stries lipidiques (type II). La mort des cellules spumeuses (macrophage gonflé de gouttelettes de graisse, LDL) soit par apoptose, soit par nécrose, provoque le dépôt de cholestérol dans l'intima artériel, d'abord de façon diffuse (type III), puis sous forme de collections pour constituer un corps lipidique (type IV). L'inflammation générée par les Ox-LDL, ainsi que par l'activation des macrophages, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses qui libèrent des cytokines et/ou des facteurs de croissance, permet aux cellules musculaires lisses de la média de migrer vers l'intima, de s'y multiplier et de synthétiser une chape de protéines fibreuses qui recouvre le corps lipidique. Cette plaque augmente dès lors significativement de volume. Lorsque ce dernier dépasse

les capacités de remodelage de la paroi artérielle, la plaque fait saillie de la paroi artérielle vers la lumière du vaisseau où elle réalise une sténose (type V) (Duriez, 2004).

Les radicaux libres sont responsables de l'oxydation des LDL plasmatiques en oxLDL athérogène qui déclenchent une multitude de réponses inflammatoires et de réactions biochimiques aboutissant au dépôt de plaques d'athérome sur les parois artérielles (fig. 33) (Sumpio et al., 2006). Les LDL plasmatiques ne sont athérogènes qu'après modification oxydative (Brown et Goldstein, 1983; Parthasarathy, 1991; Edwin, 2011). Certaines études ont montré que le stress oxydatif provoque l'apparition de l'athérosclérose en induisant la peroxydation lipidique (Halliwell, 1997). De ce point de vue, les antioxydants qui empêchent la peroxydation des lipides peuvent avoir un rôle important dans la prévention de l'oxydation et la modification des LDL.

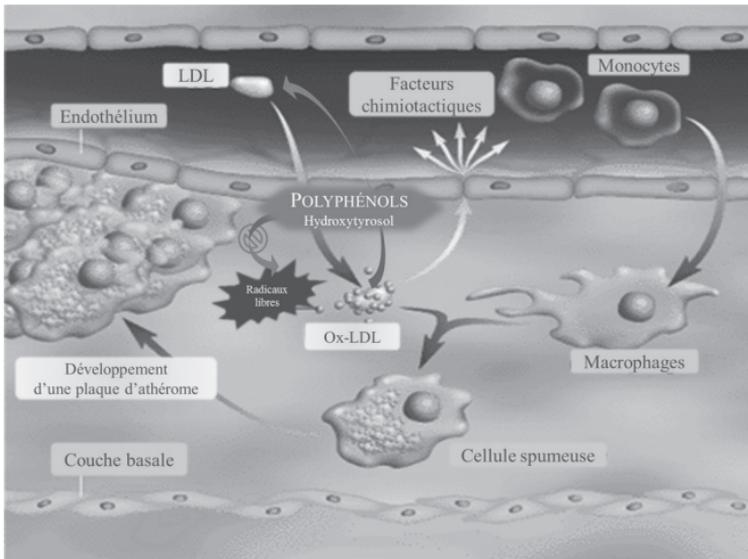


Figure 33. Les composés phénoliques empêchent l'oxydation des LDL qui aboutit à la formation de plaques d'athérome.

Les LDL du plasma humain contiennent une variété d'antioxydants capables d'inhiber leur peroxydation, comme l' α -tocophérol, ubiquinol-10, β -carotène, le lycopène et d'autres hydroxy-caroténoïdes. L' α -tocophérol est l'antioxydant le plus abondant dans les LDL (*Princen et al., 1992; Abbey et al., 1993; Reaven et al., 1993; Jialal et al., 1995; Hung et al., 2008*). Toutefois, il a été démontré que d'autres antioxydants, exogènes, sont en mesure de protéger les LDL contre l'oxydation (*Cominacini et al., 1991; Esterbauer et al., 1992*). Sur la base des études épidémiologiques antérieures soulignant la corrélation directe entre l'alimentation méditerranéenne et une incidence plus faible des maladies cardiovasculaires (*Hertog et al., 1993; Ruiz-Canela, 2011*), diverses études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré que les composés phénoliques d'huile d'olive extra vierge jouent un rôle important dans la prévention de l'oxydation des LDL aboutissant à l'athérosclérose (*Visioli et al., 1995a; Rice-Evans et al., 1996; Cao et al., 1997; Masella et al., 1999*). Dans un échantillon de LDL, l'oxydation de la vitamine E induite par CuSO_4 a été empêchée par l'addition de l'hydroxytyrosol ou les composés secondaires de l'oleuropéine; cet effet a été corrélé linéairement avec la concentration d'hydroxytyrosol. L'addition de composés phénoliques aux LDL entraîne une réduction significative de la formation de peroxydes lipidiques. Pour les LDL non traités par les composés phénoliques, ces peroxydes de lipide sont formés en même temps que la réduction des taux de la vitamine E. Cet appauvrissement de la vitamine E par les LDL se produit avant la peroxydation lipidique massive. Or, les composés phénoliques retardent le début du processus d'oxydation et préservent les antioxydants endogènes (*Visioli et al., 1995a, 2000a*).

Certaines études sur l'effet antioxydant des composés phénoliques sur les LDL plasmatiques ont été effectuées, dans le but de simuler le mieux possible la situation *in vivo*. Le plasma a été incubé en présence de divers

composés phénoliques extraits d'huile d'olive; les LDL ont été ensuite isolés et soumis à l'action des radicaux libres, afin de tester leur résistance relative à l'oxydation. Les résultats ont indiqué que l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine sont plus efficaces contre la peroxydation des LDL que les mono-hydroxyphénols (tyrosol et ligstroside aglycone), confirmant les résultats antérieurs de Rice-Evans (1996) et Cao (1997) et leurs collaborateurs. Toutefois, la concentration d'antioxydants ajoutée au plasma pour inhiber l'oxydation des LDL a été sensiblement plus élevée que dans les études précédentes, où les antioxydants ont été ajoutés directement aux LDL isolés (*Leenen et al., 2002*). Ces données confirment d'autres études réalisées *in vivo* sur des animaux nourris avec des huiles d'olive riches en polyphénols; chez ces animaux, les lipoprotéines étaient beaucoup plus résistantes à l'oxydation que chez les animaux témoins nourris avec la même quantité d'acide oléique (*Scaccini et al., 1992*), en prenant soin de maintenir des niveaux constants de la vitamine E (*Wiseman et al., 1996*).

Le docteur Werner Alex Faché, médecin nutritionniste au Centre de prévention Linus Pauling à Gand a montré que la prise quotidienne de 3 à 6 gélules par jour d'Olivie Riche 4000 (concentration élevée d'hydroxytyrosol) diminuait le LDL oxydé chez des patients ayant des problèmes cardiovasculaires.

LA CARDIOLOGIE INNOVANTE et PREVENTIVE

Dr. Werner Alex Faché, MD

www.linus-pauling-preventie-centrum.be

La pierre angulaire de la prévention des maladies cardio-vasculaires est l'optimisation du mode de vie du patient par un coaching professionnel qui proposera un comportement santé à faible risque.

La « Lifestyle Medicine » est une spécialité médicale reconnue au niveau international (par exemple par «The Institute of Lifestyle Medicine - Harvard University – USA») et qui se définit comme «La prévention et le traitement des maladies dégénératives chroniques liées au mode de vie, grâce à des interventions sur le style de vie, fondées sur des preuves internationalement reconnues (evidence-based lifestyle interventions), souvent combinées avec une approche nutraceutique et/ou pharmaceutique ».

Le soutien psychologique que l'on prodigue lors d'un sevrage tabagique et les conseils diététiques lors d'une volonté de perte de surpoids, parle de lui-même.

Mais, **première injonction**, premier conseil: le mode alimentaire, qui reste d'une importance primordiale.

Dans ce cadre, le régime méditerranéen traditionnel devrait être activement mis en place. L'huile d'olive est l'un des aliments qui a été officiellement inclus dans le screening des aliments « méditerranéens » favorables pour la santé et auxquels il faut rester fidèle.

Être fidèle signifie qu'il faut tous les jours, au quotidien, - sauf pour l'huile de cuisson -, consommer au moins 4 cuillères à soupe d'huile d'olive. L'huile d'olive est riche en acides gras mono-insaturés (oméga-9) et contient une quantité unique et importante de polyphénols d'olive.

L'hydroxytyrosol, polyphénol type de l'olivier, est actuellement le polyphénol le plus étudié. Il est considéré comme l'un des composants actifs responsables des effets positifs sur le système cardio-vasculaire.

Dans un **second temps**, le patient doit être activement motivé « à bouger », à faire plus d'exercices physiques afin de minimiser le nombre d'heures assis au quotidien et pratiquer une activité physique aérobie en alternance avec un entraînement physique plus intensif. Nous faisons ici référence aux directives de la « American Heart Association ».

Dans un **troisième temps**, l'impact négatif du stress sur l'organisme peut être diminué, entre autres, à l'aide de techniques de méditation telles que le mindfulness, des moments de « déconnection » comme la méditation et le yoga.

Les « blue-zones » constituent un bel exemple de mode de vie bénéfique. Elles sont les régions du monde où les personnes âgées sont en bonne santé et mènent une vie active grâce à leurs modes de vie sains. Elles montrent qu'il est en effet possible d'augmenter de manière significative notre espérance de vie, malgré notre programmation génétique, en vivant encore de nombreuses années de qualité en bonne santé.

Des recherches scientifiques récentes montrent que l'épigénétique a un impact plus déterminant sur notre santé que la génétique elle-même. Avec l'épigénétique, on entend les changements dans l'expression des gènes causés par des facteurs environnementaux, sans modification séquentielle de nos gènes. Notre ADN n'est pas toujours notre destin !

Tout le monde connaît les facteurs de risques cardiovasculaires comme l'hypertension (haute pression sanguine), trop de cholestérol, le diabète,... mais peu d'entre nous (y compris bon nombre de mes collègues médecins) connaissent les récents facteurs de risques mis en évidence en laboratoire.

Ainsi, il faut distinguer les différentes particules de cholestérol LDL (mauvais cholestérol). Les particules de **cholestérol « LDL-3 »** se différencient des particules de cholestérol « LDL-2 » car elles sont beaucoup plus sensibles à l'oxydation et forment ainsi plus facilement des plaques athéromateuses.

On peut également mesurer directement le cholestérol oxydé (LDL-Ox) dans le sérum du patient. Le **cholestérol LDL-Ox** a une valeur prédictive beaucoup plus forte dans l'apparition de l'athérosclérose et le risque d'infarctus du myocarde par rapport aux taux de cholestérol LDL et de cholestérol NON-HDL (mauvais cholestérol total).

Enfin, la mesure de la **Lp-PLA2** (phospholipase A2 lipoprotéine associée), également connue sous le nom « Pla-q-test » est d'une importance primordiale afin d'estimer le risque d'accidents vasculaires (crise cardiaque ou accident vasculaire cérébral (AVC)). Ce paramètre de laboratoire détermine le risque inflammatoire spécifique des vaisseaux sanguins, exprimé par les plaques athéroscléroseuses. Une valeur élevée indique une inflammation active dans la plaque, de sorte que celle-ci devient instable et peut se fissurer. Cela crée immédiatement une thrombose entraînant un accident vasculaire cérébral. Des recherches récentes à l'Université d'Anvers (UA) démontrent le lien linéaire entre les AVC et le LDL-Ox et le Lp-PLA2.

La recherche clinique intensive au Centre de prévention Linus Pauling à Gand a montré sans équivoque que les trois risques cardiovasculaires précédemment cités (LDL-3, LDL-Ox et Lp-PLA2) peuvent être favorablement affectés par de fortes doses quotidiennes de polyphénols d'olive. Les recommandations pour les patients étaient d'augmenter leur consommation journalière d'huile d'olive extra-vierge et de participer activement à la prise quotidienne d'une huile thérapeutique issue de terres arides aux pieds des montagnes de l'Atlas (ElBrouj, Maroc). Ces oliviers sont soumis à un stress climatique sévère (des variations importantes de températures nuit/jour et un manque d'eau). En conséquence, les arbres, leurs feuilles et leurs fruits, produisent beaucoup plus d'huiles et de polyphénols essentiels tels que l'hydroxytyrosol précédemment cité, et ce jusqu'à un facteur 30 fois plus élevé. Malgré une légère amertume de cette huile d'olive, les patients s'y habituent aisément et en consomment 2 cuillères à soupe quotidiennement au repas.

Cette huile d'olive particulière, de part sa teneur en polyphénols, existe également en gélules et contient jusqu'à 20 mg d'hydroxytyrosol standardisé, augmenté d'un Totum des polyphénols issus du fruit, de la feuille et de l'huile extra-vierge.

Chez les patients à hauts risques, **2 à 3 gélules, 3 x par jour** d'oliviers du désert de rocailles du terroir marocain d'Elbrouj pendant les repas, ont été **prescrits pendant 8 semaines**. Nous avons ainsi pu démontrer que les **ox-LDL diminuaient alors en moyenne de 27%**. Les résultats ont été spectaculaires!

Nous pouvons conclure qu'à présent il est devenu possible, par l'apport d'une supplémentation en hydroxytyrosol, sous forme d'huile d'olive ou sous forme de gélules, d'améliorer considérablement le risque cardiovasculaire et par conséquent, de limiter ou d'éviter les incidents vasculaires.

Il est donc logique que la «European Food Safety Authority» ait approuvé l'allégation sur les effets bénéfiques de l'hydroxytyrosol sur le cholestérol oxydé.

Dr. Werner Alex Faché, MD
Linus Pauling Institute
Gent (Gand) Belgique

Dokter W. FACHÉ
Zuidstationstraat 3A
9000 GENT
Tel: 09 222 24 00
Fax: 09 222 20 11
1/345667/1/003



Une concentration sanguine élevée en cholestérol est un autre facteur de risque de l'athérosclérose. La régulation du cholestérol plasmatique est liée à l'activité de l'hydroxyméthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), l'enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol. L'utilisation de substances inhibant la HMG-CoA réductase est très efficace dans la réduction de cholestérol dans le sang. Certaines études ont attiré l'attention sur l'effet des composés phénoliques contenus dans l'huile d'olive vierge sur le métabolisme du cholestérol. Récemment, il a été démontré que l'activité de l'HMG-CoA réductase a significativement diminué dans les microsomes du foie de rats nourris avec les composés phénoliques. L'ingestion de l'huile d'olive représente un effet bénéfique à travers les composés phénoliques qui inhibent la HMG-CoA réductase et jouent un rôle important dans la prévention des maladies cardio-vasculaires. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de tester la concentration de composés phénoliques capables de provoquer une telle réponse thérapeutique (*Benkhalti et al., 2002*).

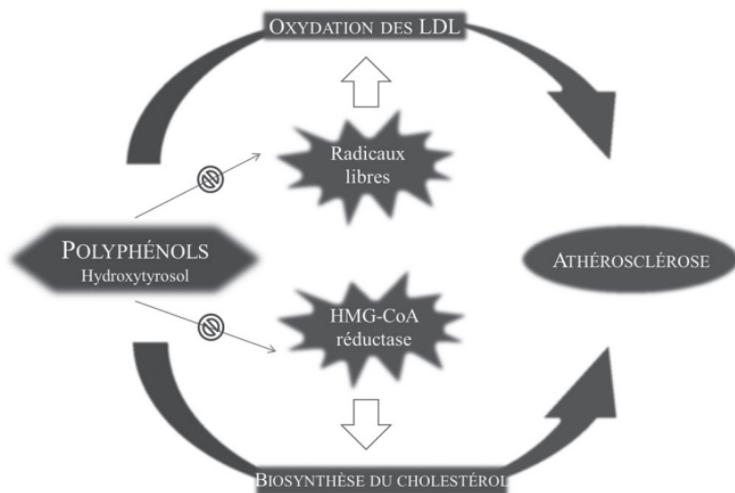


Figure 34. Effet anti-athérosclérose des polyphénols de l'huile d'olive.

3. Effet des polyphénols de l'huile d'olive contre l'agrégation plaquettaire

Une étude *in vitro* a examiné l'effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropéine sur l'agrégation plaquettaire. L'hydroxytyrosol inhibe complètement l'ADP (2 μ M) et le collagène (2 μ g/ml) induisant l'agrégation plaquettaire dans le plasma riche en plaquettes sanguines (fig. 34) (Petroni *et al.*, 1995). L'effet antiagrégant d'hydroxytyrosol a été jugé équivalent à celui de l'aspirine. Dans la même étude, il s'est également avéré que l'hydroxytyrosol est un inhibiteur de la thrombine induisant la production de la thromboxane B2 (fig. 35) (impliquée dans l'activation et l'agrégation plaquettaire en cas de blessure). Chez des volontaires, il a également été reporté que l'extrait de feuilles d'olive contenant 5,40 mg/ml de polyphénols, était capable d'inhiber l'activation des plaquettes *in vitro* chez des individus sains, non-fumeurs et de sexe masculin (Singh *et al.*, 2007).

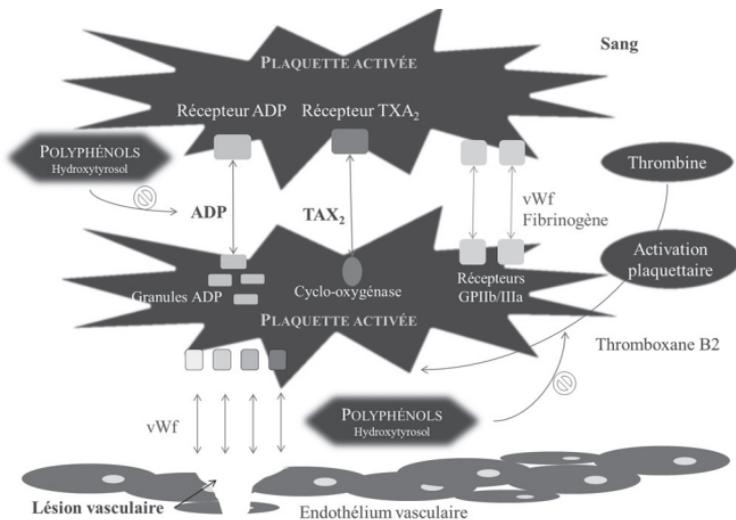


Figure 35. Effet antiagrégant plaquettaire des polyphénols de l'huile d'olive.

Dans le but de prouver que l'AMPc et la GMPc phosphodiesterase pourraient être la cible biologique de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, Dell'Agli et ses collègues (2007) ont examiné les effets des extraits d'huile de haute et de basse teneur en polyphénol et des composés phénoliques simples sur l'agrégation plaquettaire. Les extraits de l'huile et les phénols simples ont présenté un effet inhibiteur dépendant de la concentration administrée sur l'agrégation et sur l'AMPc phosphodiesterases.

Dans un essai contrôlé randomisé à Naples, en Italie, 180 sujets souffrant d'un trouble métabolique ont été invités à suivre une alimentation méditerranéenne complétée en l'huile d'olive. Après 2 ans, il y avait une nette amélioration de la fonction endothéliale, avec une diminution statistiquement significative de la pression artérielle, du cholestérol, des taux d'insuline et de glucose et de l'agrégation plaquettaire. 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 souffrant d'un syndrome métabolique (*Esposito et al., 2004*).

On ignore encore dans quelle voie exacte les polyphénols inhibent l'agrégation plaquettaire. Il est supposé qu'ils soient l'inducteur de la diminution de la production d'eicosanoïdes ou de la dégradation de l'AMPc (*Dell'Agli et al., 2007*).

4. Effet anti-inflammatoire des polyphénols de l'huile d'olive

La réponse inflammatoire au cours de l'athérogénèse comprend l'adhésion des leucocytes, des monocytes et des lymphocytes à l'endothélium. L'adhésion de ces cellules est facilitée par les molécules d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1), les molécule d'adhésion cellulaire 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 (fig. 36). Un mélange de polyphénols de l'huile d'olive, y compris l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol a aussi permis une diminution des taux d'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 l'alimentation méditerranéenne complétée en l'huile d'olive a entraîné 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 une alimentation faible en graisses (Estruch et al., 2003).

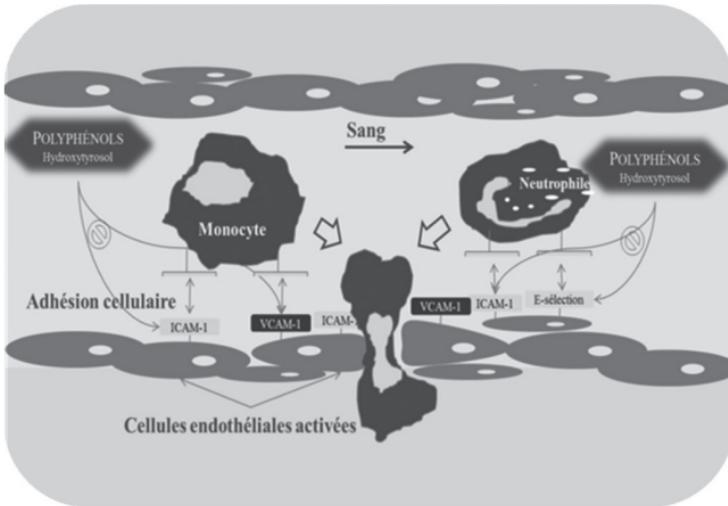


Figure 36. Effet des polyphénols sur les molécules d'adhésion endothéliales.

Enfin, peu de recherches ont examiné l'effet de l'alimentation méditerranéenne sur la paroi vasculaire. L'étude PREDIMED a examiné l'effet de l'huile d'olive sur

les changements morphologiques de la paroi vasculaire. Les mesures de l'épaisseur intima-média de la carotide (EIM) ont été utilisées comme marqueurs de substitution pour évaluer la gravité de la maladie d'athérosclérose. Une augmentation de 0,2 mm dans l'EIM a été impliquée dans 28 % et 31 % d'augmentation du risque d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral, respectivement (*de Groot et al., 2004*). Les données recueillies sur 190 participants ont montré que ceux qui ont consommé moins d'huile d'olive sont les plus exposés à l'augmentation de l'EIM. Une autre étude a révélé une différence statistiquement significative entre l'épaisseur de l'EIM de ceux qui ont consommé de 6 à 34 g d'huile d'olive par comparaison à ceux qui ont consommé 35 à 74 g d'huile d'olive par jour (*Buil-Cosiales, 2008*).

5. L'hydroxytyrosol de l'huile d'olive augmente le taux du monoxyde d'azote, gaz vasodilatateur

En cas d'hypercholestérolémie, la production d'anions superoxydes et d'autres espèces de radicaux libres a augmenté dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, et les monocytes par rapport à celle des contrôles normocholestérolémiques (*Keaney et Vita, 1995*). Ces espèces réagissent avec le monoxyde d'azote (NO) et dégradent l'endothélium vasculaire qui, dès lors, ne peut pas produire suffisamment de NO, ce qui peut conduire à l'agrégation plaquettaire aboutissant à la thrombose. La diminution de la bioactivité du NO peut provoquer une constriction des artères coronaires au cours de l'exercice physique et l'inflammation vasculaire conduisant à la formation de cellules spumeuses (*Cannon, 1998*).

D'autre part, des études ont montré que les oxLDL stimulent la transcription de la NO synthétase et la synthèse de NO dans les cellules aortiques bovines (*Hirata et al., 1995*). Des

études ont également montré une expression accrue de la NO synthétase dans les tissus aortiques du lapin atteint d'athérosclérose et dans les plaques d'athérome chez l'Homme. Cette surproduction accompagne l'inactivation oxydative ou la conversion rapide de NO en ONOO⁻ toxique en raison de l'accumulation des anions superoxyde et d'autres radicaux libres (*Cannon, 1998*).

Des études suggèrent que la dysfonction vasculaire peut être limitée grâce à l'apport des agents capables de piéger ces radicaux libres (*Perona et al., 2006*). La consommation d'un repas riche en composés phénoliques de l'huile d'olive a amélioré la vasodilatation microvasculaire endothélium-dépendante durant les 4 premières heures postprandiales parmi des volontaires hypercholestérolémiques. Des sujets alimentés par un repas riche en polyphénols ont montré une plus forte concentration de NO et des taux inférieurs de lipoperoxyde (lipides péroxydés) par rapport à ceux nourris avec un repas pauvre en polyphénols. Cette amélioration est liée à une diminution du stress oxydatif et une augmentation des produits finaux du NO (*Ruano et al., 2005*). En outre, l'oleuropéine stimule la production du NO dans les macrophages de la souris et active la forme inductible de la NO synthétase (*Visioli et al., 1998*).

Une enquête menée sur 20.343 sujets, dans le cadre de la cohorte grecque de l'EPIC (Prospective Européen de l'Etude sur le Cancer et la Nutrition) a constaté que l'adhésion au régime alimentaire méditerranéen est inversement proportionnelle à l'incidence des pressions artérielles systolique et diastolique. L'huile d'olive, les légumes et les fruits ont été les principaux facteurs responsables de l'effet global de l'alimentation méditerranéenne sur la pression artérielle. Or, les céréales, généralement considérées comme bénéfiques pour la santé humaine, ont été corrélées à une augmentation de la pression artérielle (*Psaltopoulou et al., 2004*).



CHAPITRE 9

La protection des polyphénols contre les lésions des protéines

Plusieurs études ont montré que les ondes longues ultraviolettes (UVA) du rayonnement induisent des lésions graves de la peau à travers la génération des ROS et l'épuisement des systèmes antioxydants endogènes. D'Angelo et ses collaborateurs (2001) ont remarqué une augmentation spectaculairement anormale des produits de peroxydation des lipides et du résidu L-isoaspartyl (marqueur de l'oxydation des protéines) pour des cellules de mélanome humain irradiées par les UVA.

Dans cette étude, l'effet de l'hydroxytyrosol sur les dommages cellulaires induits par les UVA a été étudié en utilisant une lignée cellulaire de mélanome humain (cellules M14) en tant que système modèle. Pour les cellules M14 irradiées par les UVA, l'hydroxytyrosol exerce un effet protecteur traduit par l'inhibition de l'ascension des marqueurs typiques de stress oxydatif, comme les TBARS (marqueurs d'oxydation des lipides). En outre, l'hydroxytyrosol empêche l'augmentation des résidus de L-isoaspartate modifiés et formés après l'irradiation des protéines par les UVA.

Ces résultats s'accordent avec l'hypothèse que le stress oxydatif joue un rôle majeur dans la médiation des dommages protéiques induits par les UVA. Les résultats suggèrent que l'hydroxytyrosol exerce des effets différents sur les cellules de mélanome en fonction de la dose utilisée. Cela doit toujours être pris en compte lors de la consommation de l'huile d'olive et de ses produits dérivés, y compris les produits cosmétiques et les aliments fonctionnels.



CHAPITRE 10

Effet antimicrobien des polyphénols de l'huile d'olive

Plusieurs études ont montré la capacité de l'hydroxytyrosol à retarder ou à empêcher la croissance d'une gamme de bactéries et des champignons y compris les bactéries pathogènes pour l'homme (agents pathogènes humains). Il a été rapporté que l'eau de végétation résultant de l'extraction de l'huile d'olive est toxique pour les bactéries phytopathogènes *Pseudomonas syringae* (Gram-négatif) et *Corynebacterium michiganense* (Gram-positif). Capasso et ses collègues (1995) ont signalé que parmi les principaux polyphénols de l'eau de végétation, le méthylcatéchol a montré une forte activité bactéricide contre *P. syringae*, en revanche, légèrement actif contre *C. michiganense*. D'autres polyphénols, tels que le catéchol et l'hydroxytyrosol, ont été moins actifs sur les souches de *P. syringae*, et inactifs sur *C. michiganense*.

Bisignano *et al.*, (1999) ont étudié la sensibilité *in vitro* de plusieurs agents pathogènes des voies respiratoires ou intestinales de l'homme à l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine. Les agents pathogènes étudiés étaient, cinq souches bactériennes standards (*Haemophilus influenzae* ATCC 9006; *Moraxella catarrhalis* ATCC 8176; *Salmonella typhi* ATCC 6539; *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et 44 isolats frais (isolés à partir de sujets hospitalisés) (*Haemophilus influenzae*, huit souches; *Moraxella catarrhalis*, six souches; *Salmonella typhi* espèces, 15 souches; *Vibrio cholerae*, une souche; *Vibrio alginolyticus*, deux souches; *Vibrio parahaemolyticus*, une souche; *Staphylococcus aureus*; cinq sensibles à la pénicilline

et six souches résistantes à la pénicilline). La concentration minimale inhibitrice (CMI) signalé dans cette étude a prouvé une large activité antimicrobienne d'hydroxytyrosol contre ces souches bactériennes (CMI entre 0,24 et 7,85 mg/ml pour les souches standards et entre 0,97 et 31,25 mg/ml pour les souches isolées cliniquement). Ces résultats suggèrent que l'hydroxytyrosol peut être utile dans le traitement antimicrobien des infections des tractus intestinal et respiratoire chez l'homme.

Une autre étude menée par l'équipe de Benlemlih en 2015 a montré que l'extrait d'olivier riche en polyphénols (Olivie Riche) avait une activité antibactérienne à large spectre contre *Escherichia coli*, *Escherichia coli* TG1, *Escherichia coli* DH5a, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* MED5 et *Streptococcus agalactiae*. L'effet antifongique de cet extrait d'olivier dépasse les antibiotiques à une concentration de 3 mg / disque ($p < 0,05$).



CHAPITRE 11

Prévention des polyphénols de l'huile d'olive contre le diabète

Les polyphénols d'olives sont efficaces contre l'hyperglycémie et peuvent jouer un rôle dans la prévention des complications diabétiques associées au stress oxydatif.

Le diabète de type 1 est une maladie métabolique provoquée par une insuffisance complète ou relative de la sécrétion d'insuline (Henquin et al., 1992). Elle est une des principales causes de nombreuses complications liées à de nombreuses maladies. L'augmentation chronique de la glycémie finira par causer des lésions tissulaires, qui peuvent être observées dans de nombreux organes et systèmes (Henquin et al., 1992; Hamden et al., 2008). L'hyperglycémie entraîne des complications à long terme qui sont classées parmi les principales causes de morbi-mortalité dans le monde (Palsamy et al., 2009). L'augmentation de la production de radicaux libres ainsi que le stress oxydatif semblent jouer un rôle important dans la pathogenèse du diabète et ses complications tardives (Palsamy et al., 2009).

Hamden et ses collaborateurs (2009) ont étudié l'effet des polyphénols d'olive (à une dose de 20 mg/kg/j) et d'autres composés phénoliques sur le stress oxydatif et l'hyperglycémie chez les rats diabétiques (traités par l'alloxane). Après deux mois de traitement, Le taux de glucose dans le plasma des rats traités par l'hydroxytyrosol a diminué de 55 % par rapport aux rats diabétiques non traités.

Une autre étude a montré que l'administration d'un extrait d'olivier riche en polyphénols (OLIVIE RICHE - OTE) (1g/kg) contribue après 4 semaines à diminuer le taux de glucose

sanguin chez des rats diabétiques induit par une injection intrapéritonéale de streptozotocine par rapport à des rats témoins non diabétiques. Cette supplémentation diminue significativement le cholestérol total, les triglycérides, le LDL cholestérol chez les rats diabétiques de manière similaire à la prise d'un médicament anti-diabétique (gibenclamide) (*Benlemlih et al, 2016*).

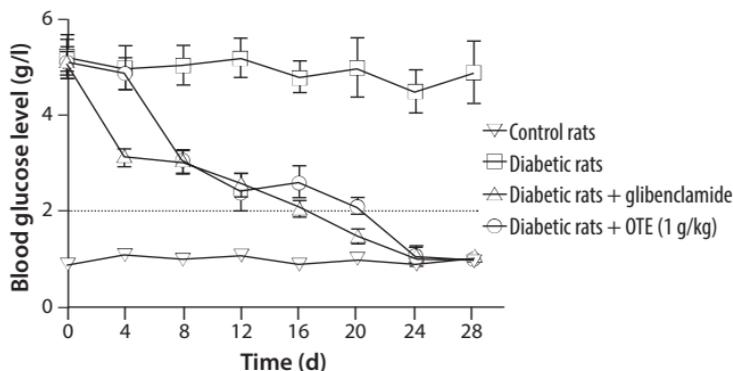


Figure 37: Effet de l’Olivie Riche (OTE) sur les taux de glucose sanguin chez des rats diabétiques et non diabétiques après 4 jours d’admission quotidienne (n = 10).

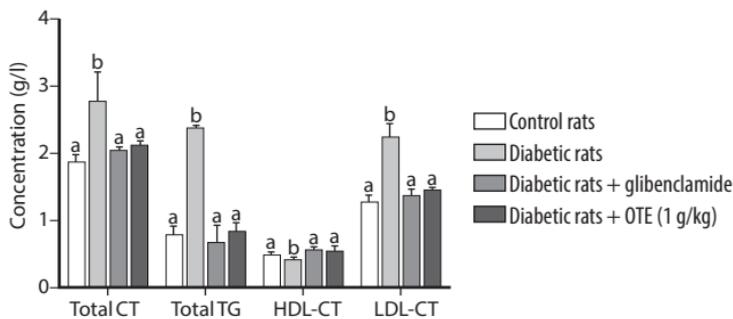


Figure 38: Effet d’Olivie Riche sur le cholestérol total (CT), les triglycérides (TG), le cholestérol à lipoprotéines de haute densité (HDL-CT) et le cholestérol à lipoprotéines faibles (LD-CT) chez les rats diabétiques et normaux après 4 jours d’admission quotidienne (n = 10). Différentes lettres a-b indiquent des différences significatives (p < 0,05).

Variable	Intervention group (n=39)	Placebo group (n=37)	aPvalue
	Δ study 14-weeks end	Δ study 14-weeks end	
Weight (Kg)	86.3 ± 3.8 ↓2.5	87.3 ± 3.4 ↑1.2	0.593
BMI (Kg/M2)	28.1 ± 4.6 ↓2.4	30.8 ± 3.9 ↑1	0.332
HbA _{1c} (%)	6.08 ± 1.2 ↓1.3	8.6 ± 1.3 ↑1.04	<0.0001
Glucose (mg/dL)	111.2 ± 15.2 ↓55.7	172.7 ± 17.1 ↑10.3	<0.0001
Insulin (μU/mL)	14.5 ± 2.5 ↑1.4	13.6 ± 3 ↓0.5	0.251
HOMA-IR	3.9 ± 1.2 ↓1.4	5.8 ± 2.0 ↑0.1	0.0002
Total cholesterol (mg/dL)	150.9 ± (26.4) ↓50.8	234.8 ± 37.3 ↑35.5	<0.0001
LDL-C (mg/dL)	106.9 ± 20.1 ↓20.8	150.9 ± 26.4 ↑17	<0.0001
HDL-C (mg/dL)	51.5 ± 9.4 ↑5.6	41.7 ± 11 ↓1.9	0.007
Tgs (Mg/dL)	87.1 ± 11.2 ↓44.4	148.8 ± 19.4 ↑21.7	<0.0001
GAST	3.4 ± 0.6	2.2 ± 0.4	0.04

Tableau 6. Mesures cliniques et de laboratoire entre les examens initiaux et les examens de suivi après 14 mois.

Une autre étude en double aveugle et contrôlé par placebo menée par le professeur Benlemlih a montré qu'une dose quotidienne de 3 g de poudre d'olivier riche en polyphénols (OLIVIE RICHE) pendant 14 semaines améliorerait significativement le glucose plasmatique à jeun, l'insulinorésistance et le profil lipidique chez les sujets atteints de diabète de type 2, suggérant l'effet thérapeutique potentiel de cet extrait comme antidiabétique (*Benlemlih et al, 2017*: en cours de publication).

Ces deux études démontrent pour la première fois que les polyphénols de l'olive, riche en hydroxytyrosol, sont efficaces pour l'inhibition du stress oxydant et de l'hyperglycémie. Ainsi, ces études suggèrent que l'administration des polyphénols de l'huile d'olive peut être utile dans la prévention des complications diabétiques associées au stress oxydant.



CHAPITRE 12

Prévention des polyphénols contre la maladie d'Alzheimer

Les études épidémiologiques indiquent que la consommation d'huile d'olive peut retarder le déclin cognitif (Solfrizzi *et al.*, 1999, 2003, 2005, 2006; Panza *et al.*, 2004).

Les protéines Tau (isoformes Tau) font partie de la famille des protéines associées aux microtubules qui sont principalement exprimées par les neurones du système nerveux central. Ils favorisent l'assemblage de la tubuline en microtubules monomères et permettent de moduler leur stabilité, jouant ainsi un rôle structurel clé dans la partie distale des axones. Pour la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives, quand la protéine Tau est hyperphosphorylée, elle se détache des microtubules. Elle va se conformer en paire de filaments hélicoïdaux pathologiques, qui s'agrègent en amas de neurofibrilles causant une neurodégénérescence fibrillaire progressive. Les substances nécessaires au fonctionnement du neurone ne pouvant plus être acheminées jusqu'au corps cellulaire, le neurone finit par mourir. Daccache et ses collègues (2011) ont étudié la capacité des trois composés phénoliques naturels obtenus à partir de l'huile d'olive; à savoir l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine, et l'oleuropéine aglycone à prévenir l'agrégation des protéines Tau en écheveaux fibrillaires *in vitro*.

Les principaux constituants phénoliques des fruits, l'olive ou l'huile d'olive, oleuropéine, aglycone oleuropéine et l'hydroxytyrosol, inhibent l'agrégation des protéines Tau au même niveau que le bleu de méthylène (principe actif de référence). Hydroxytyrosol, l'un des principaux métabolites

de l'oleuropéine, atteint le cerveau après consommation d'huile d'olive. Les résultats montrent que ce métabolite agit en tant que polyphénol qui inhibe l'agrégation de protéines Tau d'une manière similaire à d'autres composés phénoliques (fig. 39). La présence de fragments aldéhyde dans les formes tautomères de l'oleuropéine aglycone augmente la capacité d'inhibition de ce dernier, par un mécanisme qui peut différer de celle des oléocanthal, un autre composé dialdéhydrique isolé de l'huile d'olive.

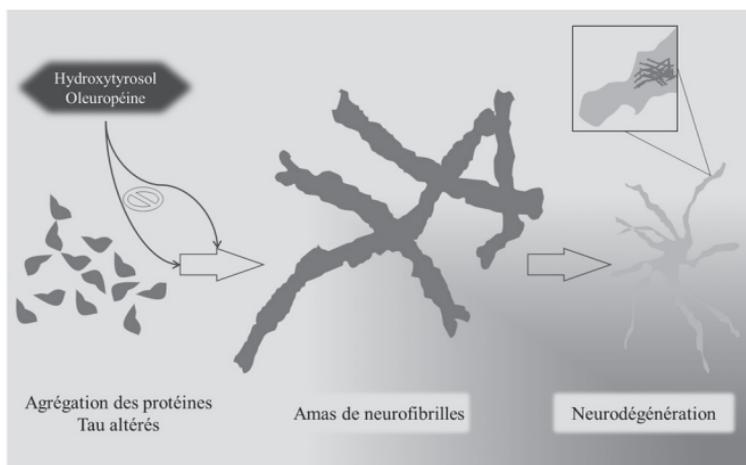


Figure 39. Effet des polyphénols de l'huile d'olive sur la maladie d'Alzheimer.

À la lumière de ces résultats, la capacité de l'oleuropéine aglycone, de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol à inhiber l'agrégation Tau est montrée. Ces composés peuvent ainsi être reliés à la réduction du risque de la maladie d'Alzheimer ou les démences neurodégénératives associées à l'alimentation méditerranéenne et la consommation d'huile d'olive et fournir une base chimique pour le développement des inhibiteurs de l'agrégation de protéines Tau.



CHAPITRE 13

Témoignages

Ils ont essayé *Olivie Plus 30X Bio* ou *Olivie Riche* et ont remarqué une diminution du taux de cholestérol et de la tension en cas d'hypertension, une diminution de leur douleur articulaire, ainsi qu'une amélioration de la qualité de leur peau. Nous avons sélectionné quelques uns des témoignages :

1. Bienfaits en général

Marco P. - *Quand on sait que le voltarène, le nurofène et toutes ces marmites chimiques anti-inflammatoire ont le plus souvent des effets secondaires sur notre estomac, et que le patient ne peut pas le prendre plus de 5 jours suivis, on est heureux d'offrir une alternative naturelle OLIVIE Riche que le patient peut prendre TOUS LES JOURS et bénéficier de plusieurs autres bienfaits en parallèle: cholestérol, hypertension, psoriasis le cas échéant, anti-âge... Etant persuadé que le naturel, de surcroît bio et «produit de ferme», reviendra toujours au galop...*

Catherine S. - *OLIVIE Force / Riche apporte beaucoup de bienfaits. C'est un excellent produit*

Chantal C. - *Excellent produit, on sent les effets rapidement.*

Aurelien H. - *Presque magique. C'est peut être le hasard mais après avoir pris 3 capsules sur une journée, du soir même j'avais un transit intestinal de retour à la normal. Ce qui n'était pas le cas depuis plus d'une semaine, et ce qui n'est généralement pas mon cas du tout (colon irritable depuis tous petit). Cela doit faire une semaine que je prends 2 à 4 capsules par jour et je n'ai plus de problème aux intestins*

depuis. A vérifier sur le long terme, mais très satisfait de ce produit pour le moment.

Claude - *Un goût nouveau. Je consomme Olivie essentiellement comme un complément alimentaire contribuant à une bonne santé en raison de sa haute teneur en hydroxytyrosol. Cette huile au goût très prononcé (il faut s'y habituer progressivement) est vivement recommandée par le Pr Joyeux, entre autres.*

Alain D.- *La meilleure huile d'olive connue. Les bienfaits de l'huile d'olive bio ont été démontrés scientifiquement par de nombreuses études. J'ai acheté Olivie Plus 30x et j'ai été vraiment épaté par cette huile, d'abord par le parfum qu'elle dégage, on sent tout de suite que l'on a affaire à un produit exceptionnel, puis au goût cette huile me fait penser à l'huile que l'on trouvait il y a cinquante ans et lorsque qu'on la boit on sent tout de suite qu'elle fait du bien, c'est un super médicament naturel. Difficile d'expliquer, goûtez-la et vous verrez par vous même !*

Eric B.- *Merveille en bouche!*

Patricia B.- *Même si en goût, c'est vraiment très hard, je dois bien avouer qu'au point de vue santé, c'est une évidence, très bon... Je suis en rémission d'un cancer, j'ai refusé tout traitement après opération, je suis donc abonnée aux traitements alternatifs, et bien cette huile est carrément une bénédiction. Moral en hausse et reprise de poids, les cheveux sont plus épais, plus de douleur d'articulation, une belle peau et j'ai l'impression que mon foie est tout content. Merci infiniment !!! Je recommande cette huile !!!*

Christiane C.- *Très fruitée. Elle magnifie le poisson, la viande et les légumes à souhait et est divine dans les salades Je l'apprécie énormément.*

Fabienne L. - *Très satisfaite. Excellente au goût, elle surprend un peu, mais je ne peux plus m'en passer. Aussi efficace que la chimiothérapie, il n'y a aucune raison de s'en priver.*

Annick K. - *Je ne peux plus m'en passer, cette huile est vraiment bénéfique pour mon corps et son goût d'olive est incomparable... Elle fait partie de mon alimentation quotidienne, l'essayer c'est l'adopter...*

Marie A. - *OLIVIE Plus 30X est un très bon produit et service ultra rapide. Tout était très bien»*

Guillaume D. - *D'abord j'en apprécie beaucoup le goût, ensuite je constate un effet coupe faim les heures qui suivent, je la prends vers 13h00 et prends ensuite une collation vers 17h00. L'huile est très digeste, je ne ressens pas de lourdeur, j'ai l'impression de ressentir un effet bénéfique pour mon estomac, aussi au niveau de la gorge et de l'œsophage qui semblent apaisés. N'ayant pas fait d'analyse sanguine depuis assez longtemps je ne peux pas vous informer sur ce sujet, mais je ressens un bien être général et compte bien continuer à consommer OLIVIE Plus 30X chaque jour. Je me sens aussi moins attiré par la viande et le poisson, plus par les fruits et légumes frais. J'en ressens aussi un bien être, je consomme aussi moins d'alcool.*

Gilberte L. - *Dès que la bouteille est terminée j'en commande une autre aussitôt !*

Christian M.- *Très bon produit - utilisation régulière*

Astrid H.- *Surprenante dans le goût étant habituée à l'huile d'olive traditionnelle, à refaire.*

Gisele R. - *DÉLICIEUSE! C'est un véritable plaisir de déguster cette huile sur une petite salade, pas besoin de vinaigre, elle se suffit à elle seule.*

Srinath S. - *Très bonne huile!*

Francoise S. - *Parfait: rapide, efficace. Merci.*

Viviane C. - *Les premières fois, surpris par le goût très très corsé de cette huile, nous nous y sommes habitués peu à peu et aujourd'hui nous adorons. Très différente de l'huile d'olive que nous connaissons habituellement.*

Annie L. - *10/10! Olivie Plus 30x est très bon, on sent bien le goût d'olive.*

Janine T. - *J'ai connu ces produits grâce aux conférences du professeur Joyeux que j'ai suivies sur internet. Je trouve les produits d'excellente qualité. Merci au pr Joyeux, merci à Olivie.*

Nathalie P. - *Produit d'une très grande qualité.*

Fabienne L. - *Huile de très bonne qualité et très goûteuse, Bravo !*

Martin G. - *Mon huile d'olive préférée.*

Francine L. - *Extraordinairement bonne*

Marie M. - *Excellent produit dont la saveur m'a surprise au début, mais plus maintenant.. Je le prends avec du miel ou du sirop d'agave sur du bon pain... Un délice excellent pour ma santé.*

Alain S. - *Très bon produit, on en ressent la capacité de faire du bien. Très bonne huile!*

Alain D. - *Olivie Plus est un très bon produit. Je n'ai encore jamais trouvé d'équivalent sur le marché, produit rare un trésor pour la santé. Naturamédicatrix est un site bien conçu avec une documentation sérieuse avec résultats scientifiques prouvés, la livraison est rapide.*

Ginetta B. - Je prends OLIVIE plus 30x régulièrement et je suis très satisfaite de ce produit !!

Nicolas F. - Le goût est celui des anti-oxydants (un peu amer), mais la qualité est là, merci

Ismail B - Mes enfants m'ont acheté Olivie 30X et depuis son utilisation, mon taux de sucre dans le sang est tombé de 13,9 mmol/mol à 8 mmol / mol, je compte bien continuer à utiliser le produit en prévention pour surmonter mes problèmes de santé, j'essaierai aussi de le faire connaître aux membres de ma famille.

Hizanuddin Z - J'ai du diabète et un taux élevé de cholestérol. Depuis 2014, je prends tous les soirs une cuillère à soupe d'Olivie 30, depuis, mon taux de sucre dans le sang est tombé de 12-16 mmol/mol à 4-5 mmol / mol!

Eliane G. - Super produit

2. Un taux de cholestérol normal

Francine M. - Enfin le produit naturel qui a eu raison de mon cholestérol et de mes petits problèmes intestinaux. Pour l'instant je continue ce traitement encore quelques mois, et j'essaierai les autres produits que vous me proposez ensuite. Merci pour vos bons conseils.

JOPAR - Mon cholestérol a baissé ! Après une cure de 3 mois à raison de 2 cuillères à soupe par jour mon cholestérol est passé de 3,30 à 3,00. J'aurais préféré plus mais c'est déjà pas mal.

René D. - Très content. C'est un top produit! J'ai baissé mon taux de cholestérol de 25% depuis 2 mois que je prends Olivie 30x.

Michel - *Je suis très content de cette huile, une baisse de mon cholestérol de presque de 50%, et surtout je me sens bien.*

Dahri B. - *Après une consommation régulière de OLIVIE Plus 30X (environ un mois), j'ai pu constater que mon mauvais cholestérol a baissé, les triglycérides ont légèrement diminué, je vais continuer à la consommer pour sentir ses bienfaits...*

3. Articulations

Eliane S. - *Rien qu'en goutant, on sent bien que ce n'est pas n'importe quelle huile, j'ai deux personnes qui la testent et moi aussi et pour l'instant tout va bien... Même mieux pour une amie qui a des problèmes articulaires assez sérieux !*

Antoine R. - *Amélioration intestinale, et des problèmes de peau en général. Un bon anti-inflammatoire.*

Mme Debbagh K. - *Au début mon seul souci était de soulager ma douleur d'arthrose au genou car je n'arrivais plus à marcher normalement, ni à me tenir debout. Mon époux m'a parlé d'une huile d'olive anti-inflammatoire, et j'ai décidé de tester OLIVIE Plus 30X pourvu qu'elle fasse son effet et qu'elle me soulage! Après un mois, la grande surprise est que non seulement je me sentais plus souple et j'arrivais à bouger mon genou sans douleur, mais aussi mon Psoriasis commençait à disparaître! Mes plaques rouges changeaient de couleur jusqu'à devenir pâles et disparaître après 2 mois environ*

4. Régulation de la tension

Mme Martine H. - *OLIVIE Plus 30X, mis à part le goût un peu fort, cette huile est fantastique, elle m'a réduit l'hypertension et mes douleurs articulaires, je la conseille!*

Martine K. - *Très Bon produit. Efficace pour faire baisser la tension artérielle.*

5. Peau et cheveux en santé

Marie-Madeleine P. - *Mes problèmes de transit sont guéris depuis que je prends cette huile, la peau devient plus jeune, le teint plus clair. Le goût est un peu amer sans doute parce que l'huile est très jeune. Livraison rapide avec suivi, très satisfaite.*

Solveig K. - *Je peux juste constater que j'ai une peau ULTRA DOUCE.*

Shariffah Z - *Je souffrais de sinusite depuis longtemps. Je n'arrêtais pas d'éternuer et j'avais tout le temps la grippe. Après un mois de consommation du produit, mes allergies cutanées allaient mieux et je n'éternuais presque plus. On m'avait diagnostiqué un kyste ovarien en 2010 dont la taille augmentait et diminuait. Mais un diagnostic récent a montré que le kyste avait disparu ! J'espère continuer à prendre ce produit pour être en bonne santé.*

Muhammad F - *Depuis 3 ans que j'utilise l'huile Olivie, par application sur le visage et par voie orale, ma peau est beaucoup moins enflée, les rougeurs ont presque disparus, et je n'ai plus de problème de constipation.*

Abdul K - *Je prends une cuiller à soupe d'Olivie plus 30X une fois par jour et j'applique le produit sur mon crâne, sur les parties chauves, et Allah soit loué, les cheveux repoussent autour des parties chauves !*



CHAPITRE 14

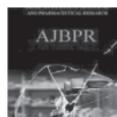
Etudes *in vitro*, *in vivo* et cliniques avec Olivie Riche

1. Arthrite rhumatoïde

Effet de l'extrait d'huile d'olive riche en polyphénols, Olivie Riche 4000, sur l'inflammation et la douleur chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde: une étude clinique randomisée en double aveugle contre placebo d'une durée de 8 semaines.

Par Ghanam Jamal^a, Cresteil Thierry^b, Benlemlih M.^a
^aBiotechnology Laboratory, Faculty of Science Dhar El Mahraz, P.O. Box 1796, Atlas-Fez, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fez, Morocco.

Publié par Journal américain de Recherches Biologiques et Pharmaceutiques le 2 février 2015.



1.1 Résumé

Objectifs: les polyphénols d'olive sont connus comme agents anti-inflammatoires naturels. Le but de l'essai clinique était de déterminer l'effet thérapeutique d'un extrait d'olive riche en polyphénols sur le processus inflammatoire et l'intensité de la douleur chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (AR).

Méthodes: il s'agit d'un essai clinique randomisé en double aveugle contre placebo. Un total de 90 patients atteints d'AR ont été répartis en deux groupes de manière

aléatoire; dans le groupe traité, les participants ont reçu une dose quotidienne de 3 g d'extrait d'olive Olivie Riche (6 gélules, 500mg chacune) pendant 8 semaines, tandis que les patients du groupe placebo ont reçu des gélules de maltodextrine. Les analyses en laboratoire, les réponses aux questionnaires, l'intensité de la douleur, et les biomarqueurs inflammatoires ont été déterminés au début de l'étude ainsi qu'à la fin. Des médecins ont évalué les effets négatifs potentiels de l'extrait d'olive pendant toute la durée de l'étude.

Résultats: une diminution significative du score de la maladie à la fin de l'étude dans le groupe traité ($P < 0,0001$). En comparaison avec le groupe placebo, les biomarqueurs inflammatoires ont diminué de manière significative chez les participants traités ($P < 0,0001$). Les améliorations relevées dans le groupe traité par rapport au début de l'étude étaient: -1,37 mg/L (IC -2,71 à -1,57 mg/L), -2,14 pg/mL (IC -2,71 à -1,57), -1,046 pg/mL (IC - 1,50 à -0,59) et -1795 pg/mL (IC -2283 à - 1308) pour hs-CRP, IL-6, TNF- α et PGE2 respectivement.

Le soulagement de la douleur a augmenté de manière significative ($P < 0,0001$) après 8 semaines de supplémentation avec l'extrait d'olive Olivie Riche.

Conclusion: les résultats obtenus après 2 mois d'essai clinique démontrent pour la première fois l'effet thérapeutique potentiel de l'extrait d'olive Olivie Riche, contenant une teneur élevée en polyphénols (OLF), contre l'inflammation et la douleur qu'elle entraîne en cas d'arthrite rhumatoïde (AR).

Il est à noter que ces gélules végétales Olivie Riche / Olivie Force sont produites à partir d'oliviers plantés au milieu d'un désert rocailleux du Maroc, sans pollution, exempt d'activité industrielle, un environnement très rude où les températures atteignent 52°C, où il n'y a presque pas de pluie, et où les

racines n'ont pas d'espace où croître en raison des roches massives (calcaire et silex) à fleur de sol. Par conséquent, ces oliviers stressent et pensent qu'ils vont mourir. Ils déclenchent ainsi un mécanisme de survie où ils produisent des quantités anormalement élevées d'antioxydants (polyphénols) pour se défendre. Les antioxydants sont ensuite recueillis 100% naturellement à partir des feuilles et des olives de ces arbres du désert (voir www.olivie.ma).

1.2 Introduction

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie inflammatoire auto-immune chronique responsable de la destruction des articulations qui contribue à une détérioration fonctionnelle. L'AR reste la maladie des articulations la plus courante, touchant 0,5-1% de la population mondiale (*Helmick et al., 2008; Erikson et al. 2013*). Plusieurs facteurs sont impliqués dans le déclenchement de la maladie: le tabac (*Ruiz-Esqvide et Sanmarti, 2012; Glossop et al. 2006; Matthey et al., 2002*), le microbiome (*Wu et al., 2010*), les facteurs hormonaux (*Berglin et al., 2010*), les antécédents génétiques et les facteurs environnementaux (*Packard et al., 2011; Landre-Beauvais, 1800*). Schématiquement, on peut diviser la physiopathologie de l'AR en 3 phases: (1) la phase d'initiation, (2) l'inflammation de la membrane synoviale (synovite) et (3) la destruction de l'articulation due à la prolifération pseudo-tumorale des cellules synoviales sous l'action des cytokines.

En fait, l'inflammation synoviale chronique est la marque de l'AR qui implique des interactions complexes entre les lymphocytes T et B, les macrophages et les synoviocytes semblables aux fibroblastes, incluant un réseau de cytokines, chimiokines et autres molécules (*Smolen et Redlich, 2014; Boissier et al., 2012; Firestein, 2003*). Dans l'AR, il y a un déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires. Par exemple, le facteur nucléaire kappa β (NF- κ B) est activé

dans les cellules inflammatoires du synovium et induit l'expression des cytokines, y compris le facteur alpha de nécrose tumorale (TNF- α), l'interleukine-1 (IL-1 β), IL-6, IL-15, IL-18, mais aussi la métalloprotéinase (MMP-1) et les petites molécules de destruction cartilagineuse comme la prostaglandine E2 (PGE²) et l'oxyde nitrique (*Killeen et al., 2014; Tak et al., 2001*). Ces biomarqueurs inflammatoires sont présents en fortes concentrations dans le liquide synovial et le sérum des patients atteints d'AR, ce qui se manifeste cliniquement en gonflements, douleurs et destruction du tissu. Ces quelques dernières années, le blocage du réseau de cytokines a pris une part importante dans la gestion clinique de l'AR, surtout dans l'inhibition des TNF- α , IL-6 et IL-1 produits (*Smolen, 2014; Smolen et al., 2012*). Les molécules utiles au blocage de ces cytokines sont la plupart du temps des anticorps monoclonaux ou des protéines recombinantes (par ex. infliximab, Etanercept) (*Smolen et al., 2012; Strand et al., 2007*). Malgré leur utilisation clinique simple, ces substances ont eu quelques effets inattendus (y compris efficacité, toxicité et même pharmacodynamie). Par ex. les effets catastrophiques de la première administration à des humains de TGN1412 (*Strand et al., 2007*).

Outre l'arsenal thérapeutique existant pour l'AR, les produits naturels représentent une source de traitements innovateurs qui pourraient révolutionner la gestion des maladies inflammatoires. *Salminen et al. (2002)* ont signalé que 33 à 75% des patients atteints d'AR croyaient à des thérapies alternatives complémentaires, comme le régime alimentaire qui peut retarder les symptômes (*Cernadas et al., 2014*). Dans ce sens, de nombreux essais cliniques ont élucidé l'efficacité des polyphénols d'olive, composants principaux du régime méditerranéen, sur des maladies inflammatoires chroniques, y compris l'AR (*McKellar et al., 2007; Sköldstam et al., 2003*) et la maladie coronaire stable (ou angine de poitrine) (*Estruch, 2010; Fito et al., 2007; Estruch et al., 2006*). L'adoption du régime méditerranéen

a diminué l'activité inflammatoire, augmenté la fonction physique et amélioré la vitalité des patients atteints d'AR. L'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) est un des polyphénols les mieux étudiés de l'olive pour ses propriétés anti-inflammatoires et nombreuses activités pharmacologiques qui permettent de penser à une potentielle utilisation pour le développement d'une alimentation fonctionnelle (Hu et al., 2014). En réalité, l'hydroxytyrosol, le tyrosol (p-HPEA) et l'oleuropéine (3,4-DHPEA- EA) exercent *in vitro* des effets inhibiteurs sur la PGE2, LTB4, TNF- α , IL-6, IL-1 et la protéine réactive très sensible (hs-CRP) (Camargo et al., 2014; Richard et al., 2011; Zhang et al., 2009). Beauchamp et al. (2005) ont signalé que l'effet anti-inflammatoire de l'oleocanthal était semblable à celui de l'ibuprofène (anti-inflammatoire non stéroïdien : AINS).

Bien que les résultats *in vitro* puissent être le premier maillon de la chaîne des modifications du produit naturel en produit pharmaceutique basé sur une molécule synthétique, nous avons besoin de plus de résultats d'essais cliniques. Nous présentons donc ici les résultats d'un essai clinique randomisé concernant les effets de la supplémentation d'un extrait d'olive sur les biomarqueurs inflammatoires, l'intensité de la douleur et l'activité de la maladie de patients marocains atteints d'AR.

1.3 Matériels et méthodes

Sujets

Parmi les patients adressés à la clinique de rhumatologie ESSEHA de Casablanca, Maroc, des hommes et des femmes ont été choisis entre octobre 2012 et avril 2013. Pour faire partie de l'étude en cours, les sujets devaient souffrir d'arthrite rhumatoïde diagnostiquée depuis au moins un an selon les critères du Collège Américain de Rhumatologie (ACR) et la Ligue Européenne Contre les Rhumatismes (EULAR) (Aletaha et al., 2010). L'étude a été dûment

expliquée aux participants volontaires. Pour être sélectionné, il fallait remplir les conditions suivantes: avoir entre 20 et 80 ans, ne pas être enceinte, ne pas allaiter, ne pas prendre de contraceptif, être non-fumeur, ne pas avoir été diagnostiqué porteur du syndrome métabolique tel que défini dans le tableau III du Traitement de l'Adulte, ne pas avoir de problèmes inflammatoires, ne pas recevoir d'AINS et/ou d'inhibiteurs de cytokines, ne pas avoir un taux leucocytaire $\leq 3.5 \times 10^9/L$, un taux de créatinine $\geq 2.1 \text{ mg/dl}$, et des taux d'aspartate aminotransférase (AST) 2,5 fois supérieur à la limite supérieure de la normale. Les critères d'exclusion comprenaient aussi la consommation d'antioxydants provenant de l'olive ou d'autres compléments alimentaires contenant des antioxydants moins de trois semaines avant l'intervention, les antécédents d'allergie ou l'intolérance aux produits contenant de l'olive. Pour être enrôlés dans cette étude, tous les participants volontaires devaient donner leur consentement écrit en toute connaissance de cause.

Descriptif de l'étude et intervention

L'étude en cours a été conçue avec les caractéristiques suivantes: double-aveugle, mode aléatoire et contrôlé placebo. Les participants choisis ont été répartis au hasard, selon une séquence aléatoire, en deux groupes: un groupe recevant OLIVIE RICHE (OLF), l'autre recevant le placebo. Les chercheurs, les participants et le personnel clinique n'avaient pas accès aux codes de traitement de chaque groupe. Les candidats avaient été invités à se présenter à la clinique, après une nuit de jeûne d'au moins douze heures, pour y subir une visite médicale de dépistage des articulations douloureuses et gonflées. Fondamentalement, l'examen incluait leur adhésion au Régime Méditerranéen selon le questionnaire modifié d'Estruch *et al.* (2006) (appendice table 1), l'évaluation d'exercice physique selon le Questionnaire International d'Activité Physique (l'exercice physique étant subdivisé en: élevé, moyen ou bas). Il était demandé aux participants de garder leur régime habituel durant la

période de l'étude et d'éviter la consommation de produits contenant de l'olive (y compris huile d'olive et olive de table) et de nutriment à taux élevés d'acides gras polyinsaturés Ω -3 (PUFA) présents par exemple dans le poisson, et d'éviter également aromates et produits connus pour leur capacité à altérer l'état inflammatoire et la fonction immunitaire (à savoir des compléments antioxydants et probiotiques). Les changements diététiques ont été enregistrés pendant les 3 premiers jours de régime, puis à 4 et 8 semaines après le traitement ou le placebo. Les participants ont reçu les explications nécessaires sur la façon d'estimer leur prise de nourriture et d'enregistrer ces estimations. Des mesures anthropométriques, la prise de la pression sanguine et le prélèvement à jeun d'un échantillon de 8 ml de sang veineux ont été réalisés chez chaque participant. Ces examens et mesures furent répétés après 8 semaines (voir figure 40).

Pendant l'étude, tous les participants et chercheurs avaient un accès libre et continu à une clinique pour conseils et consultations. Les participants qui remplissaient tous les critères de sélection avaient reçu des gélules de 500 mg (identiques pour le complément et le placebo).

Les participants recevaient aussi des instructions concernant la prise et le stockage des gélules. On a demandé aux patients de prendre **6 gélules par jour avant chaque repas** et on les a contactés toutes les semaines pour contrôler la prise du complément.

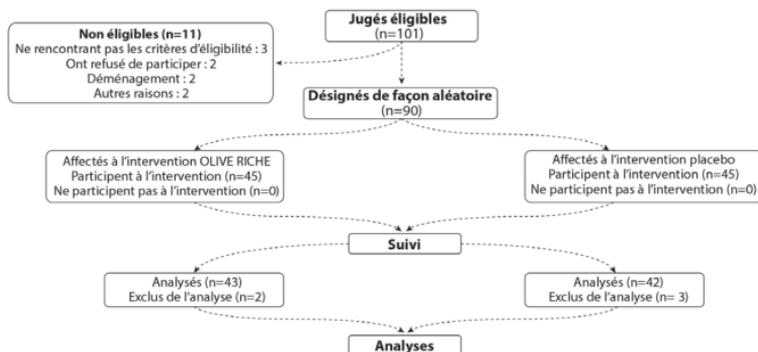


Figure 40. Diagramme de flux (organigramme) de l'étude

L'extrait aqueux d'olive (OLF: Olive Riche/Olive Force) et l'excipient maltodextrine étaient enfermés dans des gélules molles de gélatine soluble. Les gélules placebo contenaient uniquement de la maltodextrine. L'OLF provenait de l'olivier (fruits et feuilles) en utilisant un procédé d'extraction purement physique. Il est à noter que ces gélules végétales Olive Riche/Olive Force sont produites à partir d'oliviers plantés au milieu d'un désert rocailleux du Maroc, sans pollution, exempt d'activité industrielle, un environnement très rude où les températures atteignent 52 ° C, où il n'y a presque pas de pluie, et où les racines n'ont pas d'espace où croître en raison des roches massives (calcaire et silex) à fleur de sol. Par conséquent, ces oliviers stressent et pensent qu'ils vont mourir. Ils déclenchent ainsi un mécanisme de survie où ils produisent des quantités anormalement élevées d'antioxydants (polyphénols) pour se défendre. Le nom de ces gélules végétales est Olive Force au Maroc et Olive Riche en Belgique et France. Pour plus d'informations: www.olivie.ma ou www.naturamedicatrix.fr. Le tableau 7 illustre les composants principaux de l'extrait d'olive (OLF).

Paramètres	Valeur moyenne (g/100g)
Solides totaux	97.96 +/- 7.83

Paramètres	Valeur moyenne (g/100g)
Volatiles totaux (minéraux)	12.9 +/- 0.7
Lipides totaux	<1
Polyphénols totaux	15.98 +/- 1.9
Hydroxytyrosol	2.09 +/- 0.14

Tableau 7. Composants principaux de l'extrait d'olive (OLF) exprimés en pourcentage (g/100g). Ecart moyen +/- standard.

Mesures de laboratoire

On a réalisé des mesures anthropométriques à l'aide d'échelles calibrées et d'un stadiomètre mural avec une précision de 0,1 cm; on a mesuré la tension systolique et diastolique à l'aide d'un oscillomètre semi-automatique (Boso Medicus smart Semi automatic Blood Pressure Monitor, Allemagne).

On a récolté des échantillons de sang dans des tubes EDTA et SST. Les échantillons d'érythrocytes, de plasma, de sérum et d'urine ont été placés dans des micro-tubes de 1 ml et stockés à -80° en attendant l'analyse. L'évaluation de l'énergie, de la prise de nutriments et des régimes des participants a été réalisée par le logiciel Nutritionist 4.3 (First Databank, Hearst Corp. San Bruno, CA). On a utilisé les tests ELISA à haute sensibilité (DIA, Belgique) pour quantifier la PGE2, les leucotriènes B4 (LTB4), TNF- α et les cytokines IL-1 et IL-6 dans le sérum selon les directives du fabricant. Le niveau de hs-CRP du sérum a été déterminé par essai Turbidometric et des kits commerciaux à une longueur d'ondes de 500 nm. On a mesuré l'indication clinique de l'activité de la maladie et les paramètres de laboratoire des participants au début et à la fin de l'étude selon les méthodes internes des laboratoires cliniques ESSEHA.

L'hydroxytyrosol urinaire a été quantifié par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) comme marqueur de la prise d'OLF. En bref, l'hydroxytyrosol a été extrait de l'urine acidifiée (acide chlorhydrique, 0,6 N de concentration finale) comme décrit auparavant (*Visioli et al., 2000*) et analysé dans un appareil chromatographique Shimadzu équipé d'une colonne C18 à phase inversée (250 mm L. X 4,6 mm I.D., 5 µm).

L'intensité de la douleur a été évaluée au départ, après 4 et 8 semaines (fin de l'étude) en utilisant une échelle visuelle analogique (VAS) selon le protocole défini par DeLoach *et al.* (1998). On a demandé aux participants d'indiquer l'intensité de la douleur en cochant une ligne de 100 mm, 0 = pas de douleur et 100 = douleur violente. Le soulagement de la douleur a été évalué en utilisant une échelle d'évaluation verbale à 5 points (VRS) où 0 = aucun soulagement, 1 = un petit soulagement, 2 = un soulagement significatif, 3 = un grand soulagement, et 4 = soulagement complet. Le score d'activité de la maladie (DAS28) a été déterminé selon le EULAR (*Wells et al., 2009*), basé sur le nombre d'articulations fragiles et gonflées (TJC et SJC), le sérum, la concentration hs-CRP et le résultat de la Santé Globale (GH) évalué par le patient sur une VAS de 10 cm. Le DAS28 a été calculé comme suit :

$$\text{DAS28(CRP)} = \{0,56\sqrt{\text{TJC}}\} + \{0,28\sqrt{\text{SJC}}\} + \{0,36\text{Ln} \\ (\text{CRP}+1)\} + \{0.014(\text{GH})\}$$

Les docteurs ont évalué les effets secondaires potentiels de l'administration d'OLF pendant la durée de l'étude, y compris les symptômes dans la bouche, les troubles digestifs, le rassasiement et la réponse allergique de la peau et d'autres symptômes liés à l'étude. Pour finir, l'évaluation de la satisfaction totale en réponse au traitement (GAST) (y compris l'anxiété) a été réalisée en utilisant une échelle catégorique à 5 points (0= médiocre, 1= passable, 2= bon,

3= très bon, et 4= excellent). L'étude actuelle a été réalisée selon les directives approuvées par la Déclaration d'Helsinki.

Analyse statistique

Les données ont été analysées statistiquement en utilisant un GrapfPad Prism version 5.00 (GraphPadInc, San Diego, Californie). Pour les caractéristiques de départ, les variables continues sont exprimées comme écart moyen +/- standard (SD) et les variables catégoriques comme fréquences (pourcent). Pour les biomarqueurs inflammatoires, l'intensité de la douleur et son soulagement, les valeurs moyennes sont exprimées avec des intervalles de confiance de 95% (CIs). La répartition normale des données a été contrôlée en utilisant le test Kolmogorov-Smirnov. La différence entre la caractéristique des groupes de départ a été réalisée par le test *t* indépendant, par le test U Mann-Whitney, et le test χ^2 respectivement pour les données normalement continues, les données non normalement continues et les données catégoriques. Le test *t* indépendant a aussi été utilisé pour comparer les changements moyens du début à la fin de l'étude (8 semaines) entre les groupes OLF et placebo. Les résultats avec des valeurs P bilatérales de <0,05 ont été considérés comme statistiquement significatifs.

1.4 Résultats

101 patients éligibles ont été enrôlés, et 11 ont été exclus de l'étude pour plusieurs raisons (fig. 40). Cinq participants ont été retirés de l'analyse (2 dans le groupe OLF et 3 dans le groupe placebo) parce qu'ils étaient incapables de suivre le protocole de l'étude. Une bonne conformité a été observée dans le groupe OLF (95,55%) et dans le groupe placebo (93,33%) sans que l'on observe de facteur défavorable à l'étude. L'hydroxytyrosol urinaire déterminé comme biomarqueur de conformité a été quantifié par HPLC. Les résultats pointés dans le graphe de la fig. 41 illustrent les

changements à partir des périodes d'avant l'intervention pour les groupes placebo et OLF (à 4 semaines et à la fin de l'étude). La concentration d'hydroxytyrosol déterminée dans l'urine des participants du groupe OLF était significativement différente ($P < 0,0001$) de celle du groupe placebo. Toutefois, il faut noter que les données de la littérature sur l'absorption des phénols d'olive, le métabolisme et l'excrétion ne sont pas en accord (Covas et al., 2006; Visioli et al., 2003).

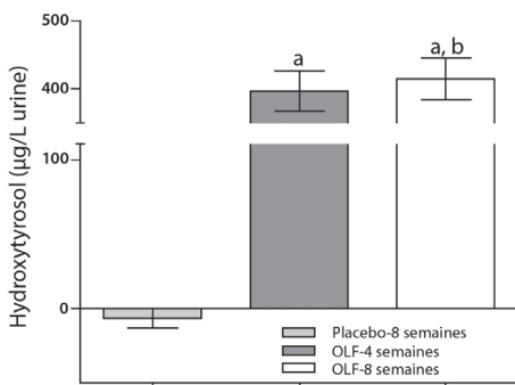


Figure 41. Changement à partir du début dans l'excrétion de l'hydroxytyrosol urinaire. Moyenne avec 95% de CI. a) $P < 0,0001$, entre le groupe OLF à 4 et 8 semaines; b) $P = 0,003$ entre le groupe OLF à 4 et 8 semaines.

Le tableau 8 (voir plus loin) montre les caractéristiques de départ des 90 participants qui ont été mis au hasard dans les groupes OLF et placebo. L'analyse statistique ne révèle aucune différence entre les deux groupes en ce qui concerne les caractéristiques de départ, y compris le degré d'adhésion au régime méditerranéen ($p = 0,296$).

Les résultats des questionnaires sur l'alimentation représentés dans le tableau 9 montrent qu'il n'y avait pas de différence significative dans l'apport alimentaire au début et après 8 semaines de supplémentation d'OLF et de placebo.

Le résultat du tableau 9 montre aussi que la prise de PUFA est restée constante (valeur P de 0,611 à 0,741 pour groupes OLF et placebo), puisque la présence d'une quantité de PUFA peut être utile pour le traitement de l'inflammation dans l'AR (Park et al., 2013).

Paramètres	Groupe OFL (n=45)	Groupe placebo (n=45)	Valeur P ^a
Âge	53.27 +/- 1.61	55.73 +/- 1.97	0.346
Féminin, n (%)	42 (93.33)	41 (91.11)	0.915
Poids (kg)	67.15 +/- 3.86	67.65 +/- 3.99	0.944
IMC (kg/m ²)	28.17 +/- 1.662	27.83 +/- 1.815	0.851
Durée de la maladie (années)	6.67 +/- 0.421	7.50 +/- 0.563	0.366
Antécédents médicaux, n (%)	19 (40.00)	15 (33.33)	0.106
Antécédents familiaux, n (%)	9 (20.00)	10 (22.22)	0.698
Habitudes d'exercices physiques, n (%)	14 (31.11)	13 (28.88)	0.788
Habitudes de consommation d'alcool, n (%)	4 (8.88)	2 (4.44)	0.293
-Score du régime méditerranéen	2.05 +/- 0.15	2.40 +/- 0.20	0.296
-DAS28	3.374 +/- 0.6625	3.392 +/- 0.7132	0.940
-Pain VAS (0-100mm)	75.51 +/- 9.814	76.65 +/- 10.12	0.741

Tableau 8. Caractéristiques de base des participants. La valeur est exprimée comme écart type moyen +/- standard ou en pourcentage. ^aValeur P (<0,05) au test-t indépendant ou au test Mann-Whitney.

Nous avons aussi indiqué dans le tableau 9 les changements de poids chez les participants, et n'avons observé aucune différence significative pendant la durée de l'étude pour les groupes OLF ($P= 0,976$) et placebo ($P= 0,759$). Ceci est approprié à cette étude puisque le tissu adipeux est un organe endocrinien qui sécrète des cytokines inflammatoires (Lu et al., 2014). En général on a maintenu constant le niveau des apports de macronutriments pendant la durée de l'étude ce qui ne pouvait pas modifier la réponse inflammatoire et les biomarqueurs du niveau d'inflammation dans le sérum du patient. Néanmoins, la dernière semaine de l'étude d'intervention, on a noté chez 2 participants du groupe placebo une différence significative dans l'apport de MUFA (acide oléique), due à une consommation excessive d'huile d'olive (forte teneur en acide oléique (MUFA)) dont on a pensé qu'elle n'influçait pas les résultats de l'étude. En effet, tous les participants respectaient le régime quotidien recommandé par les chercheurs pour l'étude en évitant la consommation de produits de l'olive et de quelques autres produits connus pour avoir des effets anti-inflammatoires.

Paramètres	Groupe (OLF) n=45	Groupe Placebo (n=45)
Énergie (cal)		
Début	1695.00 +/- 219,80	1729.00 +/- 100.7
8 semaines	1702.00 +/- 225,30	1685.00 +/- 318.6
Valeur Pa	0.576	0.745
Graisse (g)		
Début	65.90 +/- 11.04	68.23 +/- 14.37
8 semaines	69.07 +/- 12.35	70.40 +/- 14.35
Valeur Pa	0.547	0.780
PUFA (g)		
Début	13.23 +/- 1.41	12.90 +/- 1.33
8 semaines	13.73 +/- 2.89	13.07 +/- 1.91

Valeur Pa	0.611	0,741
MUFA (g)		
Début	20.57 +/- 1.85	20.07 +/- 1.77
8 semaines	21.57 +/-2.09	21.57 +/- 1.62
Valeur Pa	0.110	0.045
SFA		
Début	13.73 +/- 1.49	13.73 +/- 2.07
8 semaines	14.23 +/- 1.63	13.57 +/- 2.09
Valeur Pa	0.415	0.849
Poids (kg)		
Début	67.15 +/- 3.86	67.65 +/- 3.99
8 semaines	67.31 +/- 3.87	69.31 +/- 3.46
Valeur Pa	0.976	0.759

Tableau 9. Changement dans l'apport d'énergie et de macronutriments au début et à la fin de l'étude pour les 2 groupes d'étude. Les données sont exprimées comme écart moyen +/- standard. PUFA, acides gras polyinsaturés; MUFA, acides gras mono-insaturés; SFA, acides gras saturés. a test t de Student ($p < 0,05$).

L'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune inflammatoire chronique caractérisée par un gonflement des articulations, la fragilité de l'articulation et la destruction des articulations synoviales. Conséquences cliniques: douleurs, sensation de chaleur, rougeurs et perte de fonctionnement. On croit que l'inflammation de la membrane synoviale est la cause principale des conséquences de l'AR. Une forte concentration des marqueurs de l'inflammation, tels les cytokines (IL-6, IL-1, TNF- α) et hs-CRP corrèle avec la propension à la destruction de l'articulation dans l'AR. Les graphes de la fig. 41 montrent les changements à partir des valeurs de départ dans les biomarqueurs inflammatoires IL-6, IL-1, TNF- α , et les concentrations hs-CRP dans les deux groupes. La concentration CRP diminuait de façon

significative chez les participants qui avaient reçu de l'OLF après 4 ($P=0,014$) et 8 semaines ($P<0,0001$) par rapport aux participants du groupe placebo. Le changement moyen des niveaux de hs-CRP était $-0,55$ (CI, $-0,92$ à $-0,18$) et $-1,37$ mg/L (CI, $-2,71$ à $1,57$ mg/L) après respectivement 4 et 8 semaines.

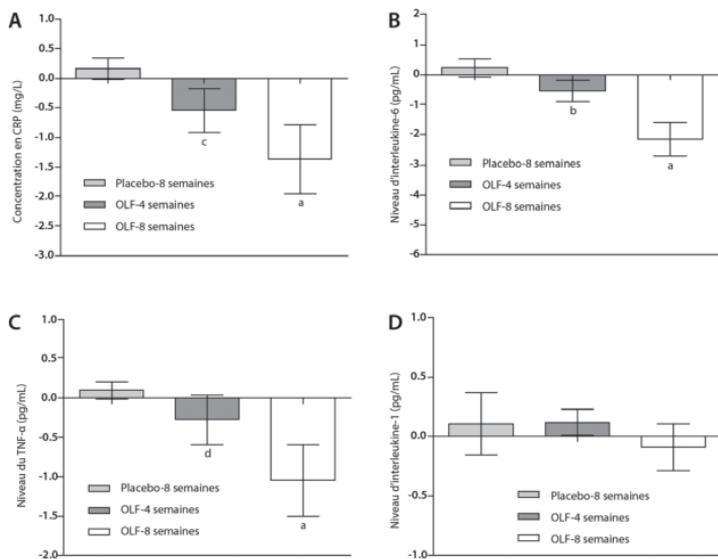


Figure 42. Changement du niveau de départ des biomarqueurs inflammatoires dans les groupes d'étude (a) hs-CRP, (b) IL-6, (c) TNF- α , et (d) IL-1. Les barres d'erreur sont 95% CIs. a($P<0,0001$), b($P=0,014$), c($P=0,009$), et d($P=0,0247$).

On a aussi observé une diminution significative dans les niveaux plasmatiques d'IL-6 et TNF- α ($P<0,0001$). Les changements ajustés entre les groupes étaient $-2,14$ pg/mL (CI, $-2,71$ à $-1,57$) et $-1,046$ pg/ml (CI, $-1,50$ à $-0,59$) pour l'IL-6 et le TNF- α respectivement à la fin de l'étude. Néanmoins, on n'a observé aucune différence significative par rapport au début (valeur P de 0,929 et 0,206 à 4 et 8 semaines) pour les concentrations d'IL-1. La diminution significative d'IL-6 plasmatique peut entraîner une stabilisation de l'IL-

1 circulant, ce qui peut expliquer les résultats de la fig 42d. D'autre part, l'AR s'accompagne souvent de douleurs chroniques très fortes.

Les graphes de la figure 43 résument les changements dans l'intensité et le soulagement de la douleur depuis le départ dans les groupes OLF et placebo.

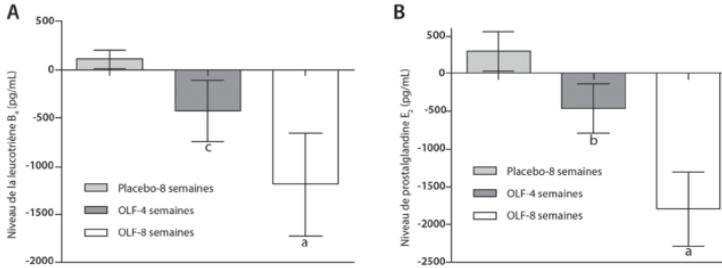


Figure 43. Changement depuis le début dans les scores de l'intensité de la douleur (a) et du soulagement de la douleur (b). Moyenne avec 95% CIs. Les astérisques indiquent la différence significative entre les groupes OLF et placebo, a($p < 0,0001$).

Une diminution significative ($P < 0,0001$) dans le score d'intensité de la douleur a été enregistrée dans le groupe OLF comparé au groupe placebo. L'évaluation de l'intensité de la douleur après intervention montre une diminution de $-12,94 \pm 4,970$ (CI, $-15,50$ à $-10,139$) après 4 semaines et $-26,71 \pm 9,29$ (CI, $-31,49$ à $-21,93$) à la fin de l'essai. L'intensité de la douleur (échelle de douleur 100-mm) diminue donc de $75,51 \pm 9,81$ à $48,80 \pm 4,16$ après 8 semaines de prise d'OLF. Une tendance similaire à la réponse à l'intensité de la douleur a été observée pour le score de soulagement. Les participants du groupe OLF avaient des scores de soulagement de la douleur significativement élevés comparés à ceux du groupe placebo ($P < 0,0001$), même après seulement 4 semaines d'intervention. Le score de soulagement de la douleur a augmenté de $2,61 \pm 0,48$ (CI, $2,37$ à $2,37$), ce qui correspond à une valeur moyenne

de 3,26 +/- 0,66 (CI, 2,92 à 3,60) dans le VRS 5-point après 8 semaines d'administration d'OLF. Nous devrions souligner que 30% des participants du groupe OLF ont déclaré un grand soulagement de la douleur (score de soulagement de la douleur ≥ 3) alors que les autres membres du groupe OLF ont senti un soulagement significatif de la douleur (score de soulagement de la douleur ≥ 2) à la fin de l'étude.

De la même façon, on a noté des différences significatives entre les groupes OLF et placebo ($p < 0,0001$) pour les scores DAS28. Les patients du groupe OLF avec une AR active au départ (score DAS28 $\geq 3,2$) ont montré une bonne réponse thérapeutique (diminution de DAS28 de 1,23). Le score DAS enregistré à la fin de l'essai pour le groupe OLF était de 2,23 +/- 0,40, signalant une rémission de l'AR ($\leq 2,6$). La figure 5 résume aussi l'évaluation globale de la satisfaction en réponse au traitement, y compris en ce qui concerne l'anxiété du patient. Les participants qui avaient été placés dans le groupe OLF avaient un score de satisfaction de 3,206 +/- 0,53 (correspondant à « très bien » dans l'échelle à 5 points), comparé à celui du groupe placebo. Un tel degré de satisfaction corrèle avec une diminution significative du niveau des biomarqueurs inflammatoires et une augmentation du score de soulagement de la douleur et des DAS.

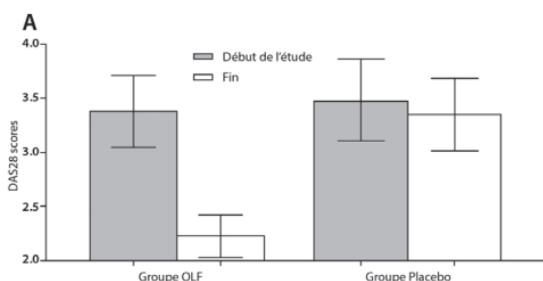


Figure 44. Effet de la supplémentation d'extrait d'olive sur les scores DAS28 (A) et GART (B). Moyenne avec 95% CIs. $aP < 0,0001$ vs groupes placebo et groupe OLF au départ.

1.5 Discussion et conclusion

Des patients atteints d'AR chronique (selon le ACR/ ELUAR) ont été affectés à un traitement par un extrait aqueux d'olive pendant 8 semaines, recevant une dose quotidienne de 3 g d'extrait d'olive (6 gélules, 500 mg chacune). On a observé aucune fluctuation de signe défavorable, ni des paramètres de laboratoires pendant l'étude et 3 semaines après l'intervention (données non publiées).

Les résultats obtenus après 2 mois d'essai clinique démontrent pour la première fois l'efficacité thérapeutique potentielle d'un extrait d'olive riche en polyphénols (OLF) contre l'inflammation dans l'AR.

Les 8 semaines d'administration d'OLF ont donc réduit le niveau de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, mais pas significatif pour IL-1), la concentration de hs-CRP et l'intensité de la douleur. Pendant la progression de l'AR, on note un afflux de cellules inflammatoires dans la membrane synoviale (transformée en tissu autonome, pannus) où l'inflammation chronique a lieu, entraînant des dégâts au cartilage et la destruction des os (due aux ostéoclastes).

Pris ensemble, le processus inflammatoire et la différenciation des ostéoclastes étaient la conséquence de l'activation des cytokines, surtout le TNF- α , IL-6, IL-1 et d'autres médiateurs d'inflammation tels les eicosanoïdes (surtout PGE2 et LTB4) (*Smoklen et Redluch, 2014; Boissier et al., 2012*).

L'inhibition de la surproduction de cytokines inflammatoires est donc le but principal des agents anti-inflammatoires, y compris les glucocorticoïdes et les AINS. Smolen et Redlich (2014) ont rapporté que l'inhibition de la production du TNF- α et d'IL-6 semble être plus importante pour prédire l'inflammation, tandis que l'inhibition de l'IL-1 semble être secondaire.

Les résultats obtenus montrent que la supplémentation d'un extrait riche en polyphénols (15% des polyphénols totaux et 2% d'hydroxytyrosol) contribue à la réduction du TNF- α , de l'IL-6, du hs-CRP, de la PGE2, et du LTB4 (figure 45) chez les patients atteints d'AR. Il se peut que ce résultat soit une conséquence directe des polyphénols d'OLF (surtout l'hydroxytyrosol) qui agissent directement sur l'ADN pour réduire l'expression des médiateurs inflammatoires ou inhiber leurs voies de biosynthèse à travers un mécanisme similaire à celui des glucocorticoïdes et/ou des AINS.

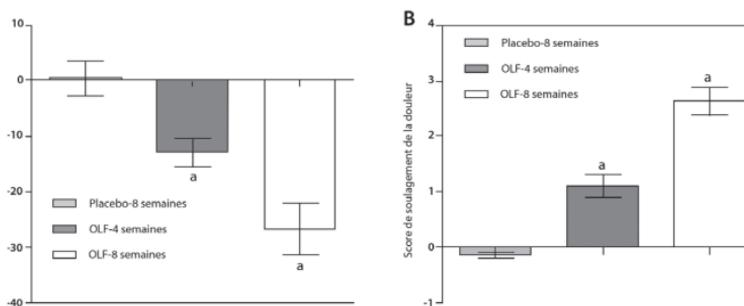


Figure 45. Changement depuis le point de départ des niveaux de leucotriène B4 (A) et de prostaglandine E2 (B). Moyenne avec 95% CIs. aP<0,0001 vs groupe placebo; bP=0,0004 vs groupe placebo; cP= 0,0017 vs groupe placebo.

Dans ce sens, l'hydroxytyrosol inhibe l'expression de la cyclo-oxygenase induite (COX- 2) (enzyme clé qui catalyse la biosynthèse de la PGE2 à partir de l'acide arachidonique pendant le processus d'inflammation) et par conséquent, le niveau de PGE2 dans les monocytes humains isolés (*Rosignoli et al., 2013; Zhang et al., 2009a; Lu et al., 2005*) et dans les macrophages murins (*Richard et al., 2011*). On a observé un effet semblable sur la COX-2 et la PGE2 *in vivo* quand les souris avec colite induite au DSS sont traitées avec de l'huile d'olive à forte teneur en hydroxytyrosol (*Sanchez- Fidalgo et al., 2011*) ou par oleuropéine (*Giner et al., 2011*). En outre,

cet hydroxytyrosol pur ou contenu dans sa matrice naturelle (produits de l'olive tels des extraits aqueux et de l'huile d'olive) exerce un effet inhibiteur sur LTB₄, TNF- α , IL-6, IL-1 et hs-CRP (Camargo et al., 2014; Richard et al., 2011; Zhang et al., 2009a; Bitler et al., 2005; Maiuri et al., 2005). L'effet des polyphénols d'olive sur les marqueurs inflammatoires a été accentué chez les patients atteints d'une maladie coronarienne stable qui recevaient de l'huile d'olive dans des concentrations différentes (Fito et al., 2007; Estruch et al., 2006). Les résultats de la présente étude sont en accord avec les recherches *in vitro* et *in vivo* (cf. littérature ci-dessus) suggérant l'efficacité thérapeutique de l'hydroxytyrosol et d'autres polyphénols OLF contre les inflammations dans l'AR. En outre, la diminution de la PGE₂, LTB₄, TNF- α , IL-6, IL-1 et de la concentration hs-CRP pourrait être la conséquence directe de l'inhibition de la COX-2. Toutefois, la répression du gène COX-2 entraîne la diminution de la production d'IL-6 et on signale une relation entre une augmentation du macrophage PGE₂ dépendant et le niveau d'IL-6 *in vitro* (Inoue et al., 2002; Hinson et al., 1996). A son tour, un des rôles biologiques connus de l'IL-6 est l'activation des protéines inflammatoires produites, ce qui peut expliquer la diminution du niveau de hs-CRP. Un mécanisme semblable a déjà été décrit pour les médicaments AINS.

Néanmoins, les AINS (celecoxib[®], rofecoxib[®], diclofenac[®]) ont fait augmenter la production de TNF- α dans les cultures de membrane synoviale rhumatoïde (Rosignoli et al., 2013; Page et al., 2010), alors que nos résultats indiquent une diminution significative du TNF- α plasmatique. Cela pourrait être dû à une autre voie de signalisation induite par l'hydroxytyrosol et/ ou d'autres polyphénols OLF. En admettant cela, l'effet potentiel de l'hydroxytyrosol (et d'autres polyphénols d'olive) sur le NF- κ B a été expliqué auparavant par plusieurs auteurs. Le NF- κ B occupe une position centrale en amont dans le processus inflammatoire puisqu'il déclenche l'expression de plus de 150 gènes (Makarov, 2001). Parmi ceux-ci, ceux qui encodent les

cytokines, le TNF- α , les IL-1 et IL-6 étudiés ici. L'hydroxytyrosol de l'extrait d'olive aqueux inhibe l'expression du NF- κ B-P65 et les auteurs suggèrent que cet effet inhibiteur pourrait être la cause de la diminution des cytokines dans les macrophages murins (*Richard et al., 2011*). En outre, l'hydroxytyrosol supprime l'expression du NF- κ B dans le monocyte humain (TPH-1) et modifie sa translocation dans le noyau (*Zhang et al., 2009b*). De plus, l'hydroxytyrosol diminue l'activité du NF- κ B dans les cellules endothéliales (*Scoditti et al., 2012*) et neurales (*St-Laurent- Thibault et al., 2011*). Il est donc plus que probable que l'extrait d'olive aqueux (OLF) exerce son effet anti-inflammatoire chez les patients atteints d'AR en diminuant l'expression du NF- κ B et/ou de l'enzyme COX-2.

D'autre part, une angiogenèse excessive résulte de la progression du processus inflammatoire dans la membrane synoviale et entraîne une prolifération des cellules du tissu pannus et une complication des symptômes de l'AR. La néovascularisation (angiogenèse) contribue beaucoup au développement et au maintien de l'inflammation dans l'AR (*Semerano et al., 2011; Lee et al., 2001*), et on a observé une corrélation entre la progression de l'AR et le niveau de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, le facteur pro-angiogénique le plus important) chez les patients souffrant d'AR (*Lee et al., 2001; Sone et al., 2001*). L'activation du VEGF et de l'angiopoietins-1 (Ang-1), autre facteur pro-angiogénique, est un mécanisme partagé et à cibles multiples, incluant le NF- κ B dépendant des cytokines (IL-1 β et TNF- α) et l'expression de la COX-2 (*Scoditti et al., 2012; Pettit et al., 2001*).

Nos données non encore publiées expliquent que l'hydroxytyrosol de l'olive (fruit) inhibe *in vitro* la réponse angiogénique des cellules endothéliales, en réprimant le VEGF (isoformes A, B, et C), l'expression des gènes Ang-1 et Ang-2. Cela correspond aux résultats des études précédentes (*Scoditti et al., 2012; Fortes et al., 2012*). Sinon, l'intensité

de la douleur est connue depuis longtemps pour être la principale manifestation clinique du processus inflammatoire de l'AR. L'intensité de la douleur dans l'AR était associée à une augmentation du niveau de PGE2 (Prochazkova et al., 2009; Scher et al., 2007; Kamei et al., 2004) ce qui explique l'efficacité des AINS comme analgésiques. Beauchamp et al. (2005) ont signalé des résultats semblables pour l'oléocanthal (composant phénolique de l'huile d'olive). Il est probable que la diminution des marqueurs inflammatoires circulant, surtout au niveau des PGE2, est la cause principale de la diminution de l'intensité de la douleur observée dans le groupe OLF.

En conclusion, les résultats de l'essai clinique semblent indiquer l'efficacité de l'extrait d'olive à forte teneur en polyphénols comme agent anti-inflammatoire chez les patients souffrant d'AR. La résolution du processus inflammatoire dans l'AR s'exerce à travers des mécanismes plausibles, y compris l'inhibition du NF- κ B dépendant des cytokines (IL-6 et TNF- α), la répression de la COX-2, du VEGF et de l'Ang-1. Les résultats nets sont la diminution de l'intensité de la douleur, du score d'activité de la maladie et la protection des articulations. Ceci fournit la preuve des effets pleiotropes de l'hydroxytyrosol sur l'inflammation, surtout quand il était transporté dans sa matrice naturelle. Malgré les objectifs divers, plus d'informations sont nécessaires en ce qui concerne l'activité anti-angiogénique de l'hydroxytyrosol dans la membrane synoviale qui pourrait représenter une cible future pour de nouveaux médicaments anti-inflammatoires basés sur la structure de l'hydroxytyrosol. En plus, l'effet potentiel des polyphénols de l'olive sur la co-stimulation des cellules T et la diminution des cellules B doit être clarifié. Les découvertes actuelles correspondent à celles obtenues *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs études cliniques concernant les effets anti-inflammatoires des polyphénols de l'olive suggérant le rôle potentiel de ces composés naturels pour la conception d'aliments fonctionnels.

2. Effet anti-cancéreux

Effet anti-cancéreux d'un extrait d'olive (Olivie Riche) à travers ses activités cytotoxiques, antioxydantes et antiangiogéniques.

Laure Eloy², Thierry CRESTEIL^{2,3}, Jamal GHANAM¹, Wafa LAABOUDI¹, and Mohammed BENLEMLIH¹

³ IPSIT, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, 92290 Chatenay-Malabry, France.

² ICSN-CNRS UPR 2301, Avenue de la terrasse, 91190 Gif sur Yvette, France.

¹ Biotechnology Laboratory, Faculty of Science Dhar El Mahraz University Sidi Mohamed Ben Abdellah, P.O. Box 1796 Atlas, Fez-Morocco.

En cours de publication dans une revue internationale.

2.1. Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer le potentiel anticancéreux d'un extrait d'olivier riche en polyphénols (Olivie Riche) à travers ses activités cytotoxiques, antioxydantes et anti-angiogéniques. L'activité cytotoxique *in vitro* d'un extrait d'olivier brut et de ses principaux composants constitutifs a été évaluée sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses (KB, HL60) à l'aide de MTS et à la cytométrie de flux. La production de ROS a été estimée avec le test DCFHDA. L'activité anti-angiogénique a été évaluée *in vitro* sur la formation des tubes de cellules endothéliales et l'expression du facteur pro-angiogénique a été quantifiée en utilisant qRT-PCR. Des tests cellulaires *in vitro* ont démontré l'effet cytotoxique de l'extrait d'olivier brut. **Cet extrait réduit significativement ($p < 0,05$) les ROS produits dans les cellules exposées au stress oxydant.** A côté de cela, l'extrait d'olivier a démontré une **forte activité anti-angiogénique**, qui était corrélée à une diminution significative ($p < 0,05$) de l'expression du VEGF, de l'angiopoïétine et de HIF1 α . Fondamentalement, l'évaluation des activités antiprolifératives, antioxydantes

et anti-angiogéniques pourrait être la première étape pour formuler un produit pharmaceutique efficace ayant des propriétés préventives et/ou curatives contre le cancer.

3. Effets hypoglycémiants et hypolipidémiants

Effets hypoglycémiants et hypolipidémiants d'un extrait d'olive riche en polyphénols chez des rats diabétiques induit par la streptozotocine.

Wafa Laaboudi*, Jamal Ghanam¹, Oumaima Ghoumari¹, Fatiha Sounni¹, Mohammed Merzouki¹, Mohamed Benlemlih¹

¹Biotechnology, Laboratory, Faculty of Science, Dhar El Mahraz University Sidi Mohamed Ben Abdellah @ Fez-Morocco. Received: 13 Jul. 2016. Revised and Accepted: 04 Nov 2016

Publié dans l'International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences en 2016

3.1. Résumé

Objectif: le but de la présente étude était de déterminer les effets d'un extrait d'olivier à haute teneur en polyphénols (Olivier Riche) sur le niveau de glucose sanguin et d'autres paramètres apparentés chez des rats diabétiques induits par la streptozotocine.

Méthodes: le diabète a été induit chez le rat par injection intrapéritonéale de streptozotocine (55 mg/kg pc). 72 heures après l'injection, les rats ayant une glycémie à jeun supérieure à 2 g/l ont été utilisés pour les expériences. L'extrait d'olivier a été administré pendant 28 jours et la glycémie a été mesurée tous les 4 jours. Les taux de cholestérol total, de triglycérides, de cholestérol HDL, de créatinine, d'urée, de protéines totales, d'acide urique, d'aspartate aminotransférase et

d'alanine aminotransférase ont été déterminés à la fin de l'expérience.

Résultats: l'administration orale d'extrait d'olivier contribue à une diminution du taux de glucose sanguin dans le groupe des rats diabétiques, qui était significativement plus faible à la 4ème semaine par rapport aux rats témoins diabétiques. De plus, la supplémentation en extrait d'olivier diminue significativement ($p < 0,05$) les valeurs de cholestérol total, triglycérides, HDL-cholestérol, créatinine, urée, protéine totale, acide urique, aspartate aminotransférase et alanine aminotransférase résultant des dommages causés par le traitement à la streptozotocine. A côté de cela, une réduction significative ($p < 0,05$) du risque de maladie cardiaque a été observée pour le groupe traité ($4,1 \pm 0,14$) comparé au groupe non traité ($7,64 \pm 0,36$), ce qui était assez similaire aux rats normaux ($4,50 \pm 0,36$). Les effets de l'extrait d'olivier étudiés étaient similaires à ceux du glibenclamide, un antidiabétique bien connu.

Conclusion: les résultats obtenus ici révèlent l'effet hypoglycémiant de cet extrait d'olivier, suggérant son utilisation potentielle en tant qu'agent antidiabétique naturel.



La supplémentation en poudre d'olivier riche en polyphénols (Olivie Riche) améliore la glycémie à jeun et l'insulinorésistance chez les patients atteints de diabète de type 2: un essai clinique randomisé, à double aveugle et contrôlé par placebo d'une durée de 14 semaines.

Jamal GHANAM & Mohammed BENLEMLIH*
Biotechnology Laboratory, Faculty of Science Dhar El Mahraz, P.O. Box 1796, Atlas-Fez, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fez, Morocco.

En cours de publication dans une revue internationale.

Objectif: Pour évaluer l'effet de l'extrait d'olive riche en polyphénols sur le métabolisme du glucose et les facteurs de risque cardiovasculaire, un essai randomisé, à double aveugle et contrôlé par placebo a été mené chez des sujets humains atteints de diabète de type 2.

Méthodes: Quatre-vingts patients atteints de T2D ont été randomisés pour recevoir soit une dose quotidienne de 3 g de poudre d'olivier (6 gélules, 500 mg chacune), soit un placebo pendant 14 semaines. Les mesures anthropométriques, les profils de glucose et d'insuline, le profil lipidique et l'administration des questionnaires ont été déterminés au départ et à la fin de l'essai. Les médecins ont évalué les effets indésirables potentiels de la poudre d'olivier tout au long de la période d'étude.

Résultats: Une bonne observance (plus de 94%) du traitement a été observée, sans qu'aucun effet indésirable ni effet secondaire n'ait été observé. Le profil lipidique du groupe traité diminue significativement ($p < 0,0001$ vs. groupe placebo), tandis que la valeur du cholestérol HDL augmente à $51,5 \pm 9,4$ mg/dL ($p = 0,007$ vs. placebo). L'administration quotidienne de poudre d'olivier riche en polyphénols entraîne une réduction significative (par rapport au placebo) de l'HbA1c ($p < 0,0001$), du glucose à jeun ($p < 0,0001$), de l'insulinorésistance ($p = 0,0002$). La valeur moyenne du glucose à jeun diminue à $114,2 \pm 15,2$ mg/dL, ce qui est inférieur à la plage normale définie par l'American Diabetic Association.

Conclusion: La supplémentation en poudre d'olivier riche polyphénols a été associée à une nette amélioration du glucose plasmatique à jeun, de l'insulinorésistance et du profil lipidique chez les sujets atteints de diabète de type 2, suggérant l'effet thérapeutique potentiel de cet extrait comme antidiabétique.

4. Activités anti-inflammatoires et analgésiques

Activités anti-inflammatoires et analgésiques de l'extrait d'olivier

Wafa LAABOUDI, Jamal GHANAM¹, Hala AISSAM¹, Mohammed MERZOUKI¹, Mohamed BENLEMLIH¹

¹Received: 08 Apr 2016 Revised and Accepted: 20 May 2016

Biotechnology Laboratory, Faculty of Science Dhar El Mahraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fez-Morocco

Publié dans l'International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences en 2016

Objectif: le but de cette étude était l'évaluation in vivo de l'effet analgésique et anti-inflammatoire d'un extrait d'olivier à haute teneur en polyphénols (Olivie Riche).

Méthodes: cet extrait d'olivier a été obtenu à partir de fruits et de feuilles d'olives marocaines en utilisant une éco-extraction exempte de solvants chimiques et d'additifs toxiques. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en utilisant des méthodes d'œdème de la patte induites par la carragénine et l'histamine. L'activité analgésique de l'extrait d'olivier a été estimée par rapport à une plaque chauffante, des tests de torsion induite par l'acide acétique et formol.

Résultats: les extraits ont montré des activités anti-inflammatoires et analgésiques significatives d'une manière dose-dépendante. L'activité anti-inflammatoire de l'extrait d'olivier à des doses de 250 et 500 mg/kg était plus importante par rapport aux médicaments standard utilisés ($p < 0,05$), dans les tests d'œdème des pattes induits par la carragénine et l'histamine. Dans les dosages analgésiques, les résultats ont montré qu'une dose de 500 mg/kg d'extrait

d'olivier a un effet analgésique significatif à la fois par les mécanismes périphériques et centraux.

Conclusion: nos résultats suggèrent que l'extrait d'olivier est sûr et a des activités anti-inflammatoires et analgésiques potentielles, qui favorisent cette utilisation comme complément alimentaire contre la douleur et l'inflammation liées aux maladies inflammatoires.

5. Effet anti-microbiens

Éco-extraction des composés phénoliques des fruits et feuilles d'olives marocaines et leur utilisation potentielle en tant qu'agents antimicrobiens

Wafa Laaboudi

Corresponding Author, Biotechnology Laboratory,
Faculty of Science Dhar El Mahraz

University Sidi Mohamed Ben Abdellah - Fez - Morocco

Jamal Ghanam

Biotechnology Laboratory, Faculty of Science Dhar El
Mahraz

University Sidi Mohamed Ben Abdellah - Fez - Morocco

Mohammed Merzouki

Biotechnology Laboratory, Faculty of Science Dhar El
Mahraz

University Sidi Mohamed Ben Abdellah - Fez - Morocco

Mohamed Benlemlih

Biotechnology Laboratory, Faculty of Science Dhar El
Mahraz

University Sidi Mohamed Ben Abdellah - Fez -
Morocco

Publié dans le European Journal of Scientific Research
en 2016

Au Maroc, la récolte des olives génère de nombreux déchets tels que les feuilles et les olives.

L'évaluation par l'extraction des polyphénols de ces déchets pourrait être une source prometteuse. Dans notre travail, nous avons préparé un extrait d'olivier à partir de ces déchets, notre extrait contient 148 g / l de polyphénols, 8,4 g / l de flavonoïdes et 39,11 g/l d'o-diphénols. Les polyphénols, principaux antioxydants naturels jouent un rôle clé dans des centaines de réactions biologiques. Le test d'activité antioxydante a révélé un fort potentiel antioxydant de notre extrait avec une valeur ORAC élevée de 3 848 100 $\mu\text{mol Te} / \text{kg}$. Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne. L'extrait d'olivier a montré une activité antibactérienne à large spectre contre *Escherichia coli*, *Escherichia coli* TG1, *Escherichia coli* DH5a, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* MED5 et *Streptococcus agalactiae*. Alors que les composés phénoliques purs (acide caféique, acide ascorbique et quercétine) ont montré une activité plus limitée. L'effet antifongique de l'extrait d'olivier dépasse les antibiotiques à une concentration de 3 mg / disque ($p < 0,05$). La technologie industrielle peut donc exploiter cet extrait, riche en polyphénols, pour l'utiliser à la place d'antioxydants synthétiques et d'antibiotiques potentiellement dangereux. Cela conduirait le Maroc à améliorer les déchets issus des récoltes d'olives en tant que source économique importante.



Références bibliographiques et ouvrages scientifiques

Abbey M, Nestel PJ & Baghurst PA (1993). Antioxidant vitamins and low density lipoprotein oxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*. 58, 52.

Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aurome OI (1994). Antioxidant actions of tymol, carvacrol, 6-gingerolo, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*. 32 : 31–36.

Akl MR, Ayoub NM, Mohyeldin MM, Busnena BA, Foudah AI, Liu YY, Sayed KA. Olive phenolics as c-Met inhibitors: (-)-oleocanthal attenuates cell proliferation, invasiveness, and tumor growth in breast cancer models. *PLoS One* 2014; 9:e97622.

Aletaha D, Neogi T, Silman A, Funovits J, Felson D, Bingham III, CO, et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum.* 2010; 69: 1580-1588.

Amanda L, Clark, Kathryn Mansfield Matera (2010). Effect of unsaturation in fatty acids on the binding and oxidation by myeloperoxidase : Ramifications for the initiation of atherosclerosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20 : 5643–5648.

Andrikopoulos N, Hassapidou M, Manoukas A (1989). The Tocopherol Content of Greek Olive Oils. *J. Sci. Food Agric*. 46 : 503-509.

Anon (1983). Presencia Historica del Aceite de Oliva, in (Cabrera,F,B,ed), Las Raices del Aceite de Oliva, Ministerio de Agricultura, Servicio de Publicaciones Agrarias, Madrid.

Antunes F, Cadenas E, Brunk UT. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem. J.* 2001; 356:549-55.

Aparicio R., Luna G (2002). Characterization of Monovarietal Virgin Olive Oils. *Eur. J. Lipid Sci. Tech-* nol. 104 : 614-627.

Aruoma OI (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 32 : 671–683.

Aruoma OI, Deiana M, Jenner A, Halliwell B, Harparkash K, Banni S, Corongiu FF, Dessi MA, Aeschbach R (1998). Effect of hydroxytyrosol found in extravirgin olive oil on DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 5181–5187.

Baccouri O, Guerfel M, Baccouri B, Cerretani L, Bendini A, Lercker G, Zarrouk M, Daoud Ben Miled D (2008). Chemical composition and

oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*. 109 : 743–754.

Bai C, Yan X, Takenakay M, Sekiya S, Nagata T. (1998). Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by GC–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 : 3998–4001.

Beauchamp GK, Russell SJK, Diane M, Jianming L, Jana P, Qiang H, et al. Phytochemistry: Ibuprofenlike activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005; 437: 45–46.

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

Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005; 437:45-6.

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2004). *Food Chemistry* (3rd edition). Berlin : Springer Verlag.

Belkner J, Wiesner R, Rathman J, (1993). Oxygenation of Lipoproteins by Mammalian Lipoygenases. *Eur J Biochem*. 213 : 251-261.

Beltran G, Aguilera A, del Rio C, (2005). Influence of Fruit Ripening Process on the Natural Antioxidant Content of Hojiblanca Virgin Olive Oils. *Food Chem*. 89 : 207-215.

Ben Sassi A, Boularbah A, Jaouad A, Walker G, Boussaid A (2006). A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*. 41 (1) : 74–78.

Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Maria Gómez-Caravaca A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A and G Lercker (2007). Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils : a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*. 12: 1679-1719.

Benkhalti F, Prost J, Paz E, Perez-Jimenez F, El Modafar C, El Boustani E (2002). Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. *Nutrition Research*. 22 : 1067–1075.

Berglin E, Kokkonen H, Einarsdottir E, Agren A, Rantapää Dahlqvist S. Influence of female hormonal factors, in relation to autoantibodies and genetic markers, on the development of rheumatoid arthritis in northern Sweden: a case-control study. *Scand. J. Rheumatol* 2010; 39:454-60.

Bianco A, Chiacchio M, Grassi D (2006). Phenolic Components of Olea europaea: Isolation of New Tyrosol and Hydroxytyrosol Derivatives. *Food Chem*. 95 : 562-565.

Bianco A, Coccioli F, Guiso M (2001). Presence in Olive Oil of a New Class of Phenolic Compounds : Hydroxyl-isochromans. *Food Chem*. 77 : 405-411.

- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A (1999).** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 51: 971–974.
- Bitler CM, Viale TM, Damaj B, Crea R.** Hydrolyzed Olive Vegetation Water in Mice Has Anti- Inflammatory Activity. *J. Nutr.* 2005; 135: 1475-1479.
- Blazquez-Martinez JM (1996).** History of Olive Tree, The World Olive Encyclopaedia, IOOC. Madrid, pp19-54.
- 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.
- Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg- Kermanac’h N, Falgarone G.** Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction: a review. *J. Autoimmun* 2012; 39: 222– 8.
- Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S (1992).** Effect of Dietary Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids on the Susceptibility of Plasma Low Density Lipoproteins to Oxidative Modification. *Arterioscler Thromb.* 12: 529-533.
- Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, Xamin A, Fedeli E, Berra B, Zamburlini A, Ursini F, Galli G, (2000).** Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 10: 111–120.
- Boskou D (1996).** Olive oil: Chemistry and Technology. *AOCS Press, Champaign.* IL: 52– 83.
- Boskou D, In. Gunstone F (ed) (2002).** Vegetable Oils in Food Technology. *Oxford: CRC Press.* 244-277.
- Boya P, Kroemer G.** Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 2008; 27:6434-51.
- Brenes M., Hidalgo F, Garcia A, (2000).** Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, Two New Phenolic Compounds Identified in Olive Oil. *JAOCS.* 77:715-720.
- Brown MS, Goldstein JL (1983).** Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry.* 52: 223.
- Buil-Cosiales P, Irimia P, Berrade N, (2008).** Carotid intima-media thickness is inversely associated with olive oil consumption. *Atherosclerosis.* 196:742–748.
- Burke JR, Deshong AJ, Pelton JG, Rubin SM.** Phosphorylation-induced conformational changes in the retinoblastoma protein inhibit E2F transactivation domain binding. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:16286-93.

Busnena BA, Foudah AI, Melancon T, El Sayed KA. Olive secoiridoids and semisynthetic bioisostere analogues for the control of metastatic breast cancer. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21:2117-27.

Camargo A, Rangel-Zuñiga O, Haro C, Meza- Miranda E, Peña-Orihuela P, Meneses M, et al. Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels. *Food Chem.* 2014; 162: 161-171.

Cannon R (1998). Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem.* 44:1809–1819.

Cantarelli C (1961). Sui polifenoli presenti nella drupa e nell'olio di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse.* 38: 69–72.

Cao G, Sofic E, Prior RL (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine.* 22: 749–760.

Cao G, Sofic E, Prior RL (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine.* 22: 749–760.

Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio G (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology.* 79: 393–398.

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, Fernandez-Gutierrez A (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* 28: 837 – 858.

Caruso D, Visioli F, Patelli R., Galli C, Galli G (2001). Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism.* 50: 1426–1428.

Cernadas L, Rodríguez-Romero B, Carballo- Costa L. Importance of nutritional treatment in the inflammatory process of rheumatoid arthritis patients; a review. *Nutr. Hosp.* 2014; 29: 237–45.

Cohen J (2002). Therapies. Confronting the limits of success. *Science;* 296:2320–2324.

Cominacini L, Garbin U, Cenci B, Davoli A (1991). Predisposition to LDL oxidation during copper-catalyzed oxidative modification and its relation to α -tocopherol content in humans. *Clinica Chimica Acta.* 204: 57–68.

Covas MI, Konstantinidou V, Fito M (2009). Olive oil and cardiovascular health. *J Cardiovasc Pharmacol.* 54: 477–82.

Covas MI, de la Torre K, Farre-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fitò M, Lopez-Sabater C, et al. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in human. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40: 608–16.

D’Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition.* 29: 1492–1498.

Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotellet P (2011). Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry International.*

de Groot E, Hovingh G, Wiegman A, (2004). Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation.* 109: III33–III38.

De Leonardis A, Macciola V, De Felice M (1998). Rapid Determination of Squalene in Virgin Olive Oils Using Gas-liquid Chromatography. *It. J. Food Sci.* 1: 75-80.

DeLoach LJ, Higgins MS, Caplan AB, Stiff JL. The visual analog scale in the immediate postoperative period: intra subject variability and correlation with a numeric scale. *Anesth. Analg.* 1998; 86: 102–106.

de Rojas-Walker T, Tamir S, Ji H, Wishnock J, Tennanbaum SR (1995). Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophages DNA. *Chemical Research in Toxicology.* 8: 473–477.

Deiana M, Aruoma OI, Bianchi MDLP, Spencer JPE, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi MA, Corongiu FP (1999). Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radical Biology and Medicine.* 26: 762–769.

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.

Dell’Agli M, Maschi O, Galli G (2007). Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP phosphodiesterase. *Br J Nutr.* 11:1–7.

Di Giovacchino L (1989). Olive Processing Systems. Separation of the Oil from the Must. *Olivae.* 26: 21-29.

Di Giovacchino L (1996). Influence of Extraction Systems on Olive Oil Quality, in (Boskou D., ed), Olive Oil, Chemistry and Technology. AOCS Press, Champaign, Illinois. 12-51.

Di Giovacchino L, Sestili S, Di Vincenzo D (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 587–601.

Dougherty RM, Galli C, Ferro-Luzzi A (1987). Lipid and Phospholipid Fatty Acid Composition of Plasma, Red Blood Cells, and Platelets and How They are Affected by Dietary Lipids: a Study of Normal Subjects From Italy, Finland, and the USA. *Am J Clin Nutr.* 45 : 443-455.

Dridi S, Decuypere E, Buyse J. Cerulenin upregulates heat shock protein-70 gene expression in chicken muscle. *Poult. Sci.* 2013; 92:2745-53.

DT Angelo S, Ingrosso D, Perfetto B, Baroni A, Zappia M, Lo bianco Lubrano L, Tufano MA, Galletti P (2001). UVA irradiation induces l-isoaspartyl formation in melanoma cell proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1–9.

Duriez P (2004). Mécanismes de formation de la plaque d'athérome. *La revue de médecine interne* 25 : S3–S6.

Edwin N. Frankel (2011). Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*

Elnagar AY, Sylvester PW, El Sayed KA. (-)-Oleocanthal as a c-Met inhibitor for the control of metastatic breast and prostate cancers. *Planta Med.* 2011; 77:1013-9

Eriksson JK, Neovius M, Ernestam S, Lindblad S, Simard JF, Askling J. 2013. Incidence of rheumatoid arthritis in Sweden: a nationwide population-based assessment of incidence, its determinants, and treatment penetration. *Arthritis. Care Res.* 2013; 65: 870-878.

Espósito 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.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine.* 13: 341.

Estruch R, Martínez-González M, Corella D (2006). Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors. *Ann Int Med.* 145:1–11.

Estruch, R., Martínez-González, M.A., Corella, D., Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, et al. Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* 2006; 145: 1-11.

Estruch R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *Proc. Nutr. Soc.* 2010; 69: 333–40.

Evagelia T, Harris N. Lazarides and Konstantinos B (2004). Olive Mill Wastewater Treatment. Petrotos Aristotle University of Thessaloniki, Department of Food Science and Technology, 54006, Thessaloniki, Greece.

Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 2005; 73:1907-16.

Finotti E, Di Majo D (2003). Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Nahrung/Food.* 47: 186–187.

Firestein, G. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356–361 (2003).

Fitó M, Cladellas M, Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H, et al. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2007; 62: 570–574.

Flemington EK, Speck SH, Kaelin WG, Jr. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:6914-8.

Fortes C, García-Vilas J, Quesada A, Medina M. Evaluation of the anti-angiogenic potential of hydroxytyrosol and tyrosol, two bio-active phenolic compounds of extra virgin olive oil, in endothelial cell cultures. *Food Chem.* 2012; 134: 134–140.

Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL, Isaacs JT. The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res.* 1994; 54:6167-75.

Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.* 2009; 46:497-510.

Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Gatenby P, Gerbi V, Janssens J, Johnston B, Kas K, La Vecchia C, Mainguet P, et al. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur. J. Cancer Prev.* 2013; 22:90-5.

Gandul-Rojas B, Mínguez-Mosquera M (1996). Chlorophyll and Carotenoid Composition in Virgin Olive Oils From Various Spanish Olive Varieties, *J. Sci. Food Agric.* 72: 31-39.

Gardner CD, Kraemer HC (1995). Monounsaturated Versus Polyunsaturated Dietary Fat and Serum Lipids. A Meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15: 1917-1927.

Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006; 5:2592-601.

Giner E, Andújar I, Recio M, Ríos J, Cerdá-Nicolás J, Giner R. Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 12882–92.

Glossop JR, Dawes PT, Matthey DL. Association between cigarette smoking and release of tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 1223-1229.

Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991; 67:293-302.

Grams G, Eskins K (1972). Dye-sensitized Photooxidation of Tocopherols: Correlation Between Singlet Oxygen Reactivity and Vitamin E Activity. *Biochemistry.* 11 : 606-608.

Granados-Principal SP, Quiles LJ, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, and Ramirez-Tortosa MC (2010). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews.*68(4):191–206.

Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004; 23:2881-90.

Gunstone F, Harwood J, Padley F (eds) (1994). The Lipid Handbook (2nd Edition). London : Chapman and Hall.

Gunstone FD (2004). The Chemistry of Oils and Fats Sources, Composition, Properties and Uses. Oxford, UK : Blackwell Publishing.

Gutfinger T (1981). Polyphenols in Olive Oils. *JAOCS.* 58: 966-968.

Gutteridge JM, Halliwell B (1992). Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med.* 12: 93-95.

Haiwell B, Gutteridge JMC (1999). "Free Radicals in Biology and Medicine." Oxford University Press, Oxford.

Halliwell B (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews.* 55, 44–52.

Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology.* 33: 601–617.

Halliwell B, Gutteridge MC (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology.* 186: 1–85.

Hamden K, Carreau S, Lajmi S, Aloulou D, kchaou D, Elfeki A (2008). Protective effect of 1,7-estradiol on hyperglycemia, stress oxidant, liver

dysfunction and histological changes induced by alloxan in male rat pancreas and liver. *Steroids*. 94: 495–501.

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

Han J, Talorete TP, 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.

Hao J, Shen W, Yu G, Jia H, Li X, Feng Z, Wang Y, Weber P, Wertz K, Sharman E, Liu J (2010). Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 21: 634–644.

Harborne JB, Dey PM.. Methods in Plant Biochemistry. Harborne JB (Ed.) (1989). Academic Press, London (UK).

Hegsted DM., Ausman LM, Johnson JA (1993). Dietary Fat and Serum Lipids: an Evaluation of the Experimental Data. *Am J Clin Nutr*. 57: 875–883.

Helin K, Harlow E, Fattaey A. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol*. 1993; 13:6501-8.

Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 15-25.

Henquin C, Debuyser A, Drews G (1992). Plant, Regulation of K⁺ permeability and membrane potential in insulin-secreting cells, in: P.R. Flatt (Ed.), *Nutrient Regulation of Insulin Secretion*, Portland, London. pp. 173–192.

Hertog MLG, Feskens EJM, Katan MB, Kromhout D (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 342: 1007.

Hinson R, Williams J, Shacter E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc. Natl. Sci. Acad*. 1996; 93: 4885–4890.

Ho A, Dowdy SF. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2002; 12:47-52.

Hrnčirik K, Fritsche S (2004). Comparability and Reliability of Different Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 106: 540-549.

Hu T, He XWW, Jiang JGG, Xu XLL. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects: a review. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62: 1449–55.

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

Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT (1994). Food phytochemicals for cancer prevention. In *Fruits and Vegetables*. ACS Symposium Series no. 46. Washington, DC : *American Chemical Society*.

Inoue H, Takamori M, Shimoyama Y, Ishibashi H, Yamamoto S, Koshihara Y. Regulation by PGE2 of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2002; 136: 287-295.

Jamal Ghanam & Mohammed Benlemlih (2017). Supplementation with rich-polyphenols olive tree powder improves fasting blood glucose and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus: a 14-weeks randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial (en cours de publication).

Jenkins RW, Canals D, Hannun YA. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal* 2009; 21:836-46.

Jialal I, Fuller CJ, Huet BA (1995). The effect of α -tocopherol supplementation on LDL oxidation. A dose-response study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 15: 190–198.

Johnson IT, Williamson G, Musk SRR (1994). Anticarcinogenic factors in plant foods. A new class of nutrients. *Nutrition Research Reviews.* 7: 1–30.

Kalan S, Matveyenko A, Loayza D. LIM protein ajuba participates in the repression of the ATR-mediated DNA damage response. *Front. Genet* 2013; 4:95.

Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-Ishi S, et al. Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 33684-95.

Katan MB (1995). Fish and Heart Disease. *N Engl J Med.* 332: 1024-1025.

Katiyar S, Mukhtar H (1996). Tea in the chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies. *In t J Oncol.* 8: 221–238.

Keceli T, Gordon MH (2001). The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 81: 1391–1396.

Killeen M, Linder M, Pontoniere P, Crea R. NF- κ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discov. Today* 2014; 19: 373-378.

- Kirkegaard T, Roth AG, Petersen NH, Mahalka AK, Olsen OD, Moilanen I, Zyllicz A, Knudsen J, Sandhoff K, Arenz C, et al.** Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature* 2010; 463:549-53.
- Kolter T, Sandhoff K.** Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett.* 2010; 584:1700-12.
- Kroemer G, Jaattela M.** Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5:886-97.
- Landre-Beauvais AJ.** Doit-on admettre une nouvelle espèce de Goutte sous la denomination de Goutte, Asthenique Primitive? *An. VIII*, Paris, Brisson 1800.
- Lanzón A, Albi T, Cert A (1994).** The Hydrocarbon Fraction of Virgin Olive Oil and Changes Resulting From Refining. *JAOCs.* 71 : 285-291.
- Lavee S (1996).** Olive Tree Biology and Physiology, World Olive Encyclopaedia, IOOC, Madrid, pp 5910.
- Law BK, Chytil A, Dumont N, Hamilton EG, Waltner-Law ME, Aakre ME, Covington C, Moses HL.** Rapamycin potentiates transforming growth factor binduced growth arrest in nontransformed, oncogene-transformed, and human cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22:8184-98.
- Lee-Huang S, Lin Huang P, Zhang D, Wook Lee J, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, 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.
- Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL, Chang YT (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.
- Leenen R, Roodenburg AJ, Vissers MN, Schuurbijs JA, van Putte KP, Wiseman SA, van de Put FH (2002).** Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50: 1290-1297.
- Linke T, Wilkening G, Lansmann S, Moczall H, Bartelsen O, Weisgerber J, Sandhoff K.** Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biol. Chem.* 2001; 382:283-90.
- Lu Y, Wahl LM.** Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa β activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J. Immunol.* 2005; 175: 5423-9.
- Lu B, Hiraki L, Sparks JA, Malspeis S, Chen CY, Awosogba JA, et al.** Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis

among women: a prospective cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73: 205-459.

Loukas M, Krimbas CB (1983). History of Olive Cultivars Based on the Generic Distances, *J.Hort. Science.* 58: 121-127.

Maiuri M, Stefano D, Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, et al. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol,* 2005; 371: 457-465.

Makarov S. NF-kappa β in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res.* 2001; 3: 200-206.

Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V (1997). The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl) ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition.* 127: 286-292.

Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Montedoro GF, Zappia V (1999). Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 10: 159-165.

Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, Dangelo S, Zappia V (2000). Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters.* 470: 341-344.

Manzi P, Panfili G, Esti M, (1998). Natural Antioxidants in the Unsaponifiable Fraction of Virgin Olive Oils From Different Cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 77: 115-120.

Martin S, Andriantsitohaina R (2002). Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* 51: 304-315.

Mario-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuno J, Weinbrenner T, Roset P, de la Torre R, (2003a). Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry.* 49: 945-952.

Mario-Casas E, Covas MI, Fito M, Farre-Albadalejo M, Marrugat J, de la Torre R (2003b). Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European Journal of Clinical Nutrition.* 57: 186-190.

Mario-Casas E, Farre Albaladejo M, Covas MI, Rodriguez JO, Menoyo Colomer E, Lamuela Raventos RM, de la Torre R (2001). Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Analytical Biochemistry.* 294: 63-72.

Masella R, Cantafora A, Modesti D, Cardilli A, Gennaro L, Bocca A, Coni E (1999). Antioxidant activity of 3, 4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Report.* 4: 113–121.

Mateos R, Espartero J, Trujillo M (2001). Determination of Phenols, Flavones and Lignans in Virgin Olive Oil by Solid Phase Extraction and HPLC With Diode Array Ultraviolet Detection. *J Agric. Food Chem.* 49: 2185-2192.

Mattey DL, Dawes PT, Clarke S, Fisher J, Brownfield A, Thomson W, et al. Relationship among the HLADRB1 shared epitope smoking and rheumatoid factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 403-407.

Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2- overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 2007; 7:80.

Menotti A, Blackburn H, Kromhout D, Nissinen A, Fidanza F, Giampaoli S, Buzina R, Mohacek I, Nedeljkovicff S, Aravanis C, et Toshima H (1997). Changes in population cholesterol levels and coronary heart disease deaths in seven countries. *Eur Heart J.*18: 566–571.

Mensink RP, Zock PL, Kester AD (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.

Mínguez-Mosquera M, Rejano-Navarro L, Gandul-Rojas B (1991). Color-pigment Correlation in Virgin Olive Oil. *JAOCS.* 68: 332-336.

Mínguez-Mosquera M., Gandul-Rojas B, Garrido-Fernández (1990). J Pigments Present in Virgin Olive Oil. *JAOCS.* 67: 192-196.

Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6:764-75.

Montedoro GF, Cantarelli C (1969). Indagine sulle sostanze fenoliche presenti nell'olio di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse.* 46: 115–124.

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

Monti MC, Margarucci L, Riccio R, Casapullo A. Modulation of tau protein fibrillization by oleocanthal. *J. Nat. Prod.* 2012; 75:1584-8.

Morales M, Tsimidou M, In Harwood J, Aparicio R (eds) (2002). Handbook of Olive Oil. Gaithersburg: Aspen Publishers. pp: 393-438.

- Mukherjee S, Lekli I, Gurusamy N, Bertelli AAA, Das DK (2009).** Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Free Radical Biology & Medicine*. 46: 573–578.
- Nenadis N, Tsimidou M (2002).** Determination of Squalene in Olive Oil Using Fractional Crystallization for Sample Preparation. *JAOCS*. 79: 257-259.
- Newcomb TG & Loeb LA (1998).** Mechanism of mutagenicity of oxidatively-modified bases. In *Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases*, pp. 137–166 [Ol Aruoma and B Halliwell, editors]. Saint Lucia: OICA International.
- Ninni V (1999).** A Statistical Approach to the Biosynthetic Route of the Fatty Acids in Olive Oil: Crosssectional and Time Series Analyses. *J.Sci.Food Agric*. 79: 2113-2121.
- Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jaattela M.** Heat shock protein.
- Oninla VO, Breiden B, Babalola JO, Sandhoff K.** Acid sphingomyelinase activity is regulated by membrane lipids and facilitates cholesterol transfer by NPC2. *J. Lipid. Res*. 2014; 55:2606-19.
- Ortega RM (2006).** Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Publ Health Nutr*. 9: 1136–1140.
- Owen R, Mier W, Giacosa A (2000).** Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clinic. Chem*. 46: 976-988.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalter B, Bartsch H (2000a).** The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*. 36: 1235–1247.
- Owen RW, Mier W, Giacosa A (2000).** Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clin Chem*. 46: 976-988.
- Packard CJ, Bezlyak V, McLean JS, Batty GD, Ford I, Burns H, et al.** Early life socioeconomic adversity is associated in adult life with chronic inflammation, carotid atherosclerosis, poorer lung function and decreased cognitive performance: a cross-sectional, population-based study. *BMC Public Health* 2011;11, 42.
- Page TH, Turner JJ, Brown AC, Timms EM, Inglis JJ, Brennan FM, et al.** Nonsteroidal antiinflammatory drugs increase TNF production in rheumatoid synovial membrane cultures and whole blood. *J. Immunol*. 2010; 185: 3694–3701.

- Palsamy P, Subramanian S (2009).** Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocinnicotinamide induced diabetic. *Chem. Biol. Interact.* 179: 356–362.
- Panza F, Solfrizzi V, Colacicco AM, D'introno A, Capurso C, Torres F, Del Parigi A, Capurso, S, Capurso A (2004).** Mediterranean diet and cognitive decline. *Public Health Nutr.* 7: 959–963.
- Papadopoulos G & Boskou D (1991).** Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society.* 68: 669–671.
- Park Y, Lee A, Shim S-C, Lee J, Choe J-Y, Ahn H, et al.** Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a 16-week randomized, double-blind, placebo- controlled, parallel-design multicenter study in Korea. *J. Nutr. Biochem.* 2013; 24: 1367–72.
- Parthasarathy S (1991).** Novel atherogenic oxidation modification of low density lipoprotein. *Diabetes/Metabolism Reviews.* 7: 163.
- Perez-Jimenez F (2005).** International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin In vest.* 35: 421–424.
- Perez-Jimenez F, Castro P, Lopez-Miranda J (1999).** Circulating levels of endothelial function are modulated by dietar y monounsaturated fat. *Atherosclerosis.* 145: 351–358.
- Pérez-Jiménez F, Delgado Lista J, Pérez-Martínez P, López-Segura F, Fuentes F, Cortés B, Lozano A, López-Miranda J (2006).** Olive oil and haemostasis: a review on its healthy effects. *Public Health Nutrition.* 9(8A): 1083–1088.
- Perrin J (1992).** Minor Components and Natural Antioxidants of Olives and Olive Oils. *Rev. Franç.*
- Petersen NH, Olsen OD, Groth-Pedersen L, Ellegaard AM, Bilgin M, Redmer S, Ostenfeld MS, Ulanet D, Dovmark TH, Lonborg A, et al.** Transformationassociated changes in sphingolipid metabolism sensitize cells to lysosomal cell death induced by inhibitors of acid sphingomyelinase. *Cancer Cell* 2013; 24:379-93.
- Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Müller R, Goldring SR, Choi Y, et al.** TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 1689– 1699.
- Pezzuto JM (1997).** Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology.* 53: 121–133.
- Pitt J, Roth W, Lacor P, Smith AB, 3rd, Blankenship M, Velasco P, De Felice F, Breslin P, Klein WL.** Alzheimer'sassociated Ab oligomers show

altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 240:189-97.

Princen HMG, van Poppel G, Vogelzang C, Buytenhek R, Kok FJ (1992). Supplementation with vitamin E but not b-carotene *in vivo* protects low density lipoprotein from lipid peroxidation *in vitro* Effect of Cigarette Smoking. *Arteriosclerosis and Thrombosis.* 12 : 554-562.

Procházková M, Zanvit P, Doležal T, Prokešová L, Kršiak M. Increased gene expression and production of spinal cyclooxygenase 1 and 2 during experimental osteoarthritis pain. *Physiol. Res.* 2009; 58: 419-25.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 2003; 283:1-16.

Psaltopoulou T, Naska A, Ofranos P (2004). Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr.* 80 : 1012–1018.

Psomiadis 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.

Psomiadis E, Tsimidou M (1998). Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids and Chlorophylls for Monitoring Their Effect on Virgin Olive Oil Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46 : 5132-5138.

Psomiadis E, Tsimidou M (2001). Pigments in Greek Virgin Olive Oils: Occurrence and Levels. *J. Sci. Food Agric.* 41 : 640-647.

Rabascall NH, Riera JB (1987). Variations of the Tocopherols and Tocotrienols Content in the Obtention, Refining and Hydrogenation Processes of Edible Oils. *Gracas Aceites.* 38 : 145-148.

Raederstorff D, Wang-schmidt Y, Wertz K (2010). Use of hydroxytyrosol as anti-aging agent. Pub. No. : US 2010/0130621 A1.

Rahmanism M, Csallany A (1991). Chlorophyll and β -carotene Pigments in Moroccan Virgin Olive Oils Measured by High Performance Liquid Chromatography, *JAACS.* 68 : 672-674.

Rao C, Newmark H, Reddy B (1998). Chemopreventive Effect of Squalene on Colon Cancer. *Carcinogenesis.* 19 : 287-290.

Raven PD, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Almazan F, Mattson FH, Khoo JC, Steinberg D, Witztum JL (1991). Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *American Journal of Clinical Nutrition.* 54 : 701–706.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-Antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20: 933–956.

Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. Hydroxytyrosol Is the Major Anti-Inflammatory Compound in Aqueous Olive Extracts and Impairs Cytokine and Chemokine Production in Macrophages. *Planta Medica* 2011; 77: 1890-1897.

Rohn TT, Hinds TR, Vincenzi OF (1993). Ion transport ATPases as targets for free radical damage. Protection by an aminosteroid of the Ca²⁺ pump ATPase and Na⁺/K⁺ pump ATPase of human red blood cell membranes. *Biochemical Pharmacology*. 46: 525–534.

Rossell JB (2001). *Frying: Improving quality*. Woodhead Publishing Limited, CRC Press, Boca Raton. Boston. New York Washington, DC.

Rosignoli P, Fuccelli R, Fabiani R, Servili M, Morozzi G. Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *J. Nutr. Biochem*. 2013; 24: 1513- 1519.

Ruiz-Canela M, Martínez-González MA (2011). Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*. 68: 245–250.

Ruiz-Esquide V, Sanmartí R. Tobacco and Other Environmental Risk Factors in Rheumatoid Arthritis. *Reumatol. Clin*. 2012; 8: 342–350.

Ruiz-Gutierrez V, Juan ME, Cert A, Planas JM (2000). Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC. *Analytical Chemistry*. 72: 4458–4461.

Ryan D, Robardo K (1998). Critical review: phenolic compounds in olives. *Analyst*. 123: 31R-44R.

Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ*. 2002; 9:3-5.

Sacchi R (2007). Extraction technology In L'Extravergine, a guide to the best certified quality olive oil in the world. *Oreggia, M. Ed Cucina Vini*. 82-103.

Sadrzadeh SMH, Graf E, Panther SS, Hallaway PE, Eaton JW (1984). Hemoglobin. A biologic Fenton reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 259: 14354–14356.

Salami M, Galli C, De Angelis L, Visioli F (1995). Formation of F₂-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein. Inhibitory effects of hydroxytyrosol. *Pharmacological Research*. 31: 275–279.

Salminen E, Heikkila S, Poussa T, Lagstrom H, Saario R, Salminen S, et al. Female patients tend to alter their diet following the diagnosis of rheumatoid arthritis and breast cancer. *Prev. Med*. 2002; 34: 529-35.

Sánchez-Fidalgo S, Sánchez de Iburgüen L, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model. *Eur. J. Nutr.* 2011; 51: 497–506.

Scaccini C, Nardini M, D'Aquino M, Gentili V, Di Felice M, Tomassi G (1992). Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *Journal of Lipid Research.* 33: 627–633.

Scania P, Casu M, Lai A (1999). Recognition and Quantitation of Cis-vaccenic and Eicosenoic Fatty Acids in Olive Oils by C-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Lipids.* 34: 757759.

Scher J, Pillinger M, Abramson S. Nitric oxide synthases and osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2007; 9: 9-15.

Schmitz NM, Hirt A, Aebi M, Leibundgut K. Limited redundancy in phosphorylation of retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin-dependent kinases in acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Pathol.* 2006; 169:1074-9.

Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Martines G, et al. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012; 527: 81–89.

Scotece M, Gomez R, Conde J, Lopez V, Gomez-Reino JJ, Lago F, Smith AB, 3rd, Gualillo O. Oleocanthal inhibits proliferation and MIP-1a expression in human multiple myeloma cells. *Curr. Med. Chem.* 2013; 20:2467-75.

Semerano L, Clavel G, Assier E, Denys A, Boissier MC. Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *J. Bone Spine* 2011; 78: 118-123.

Servilism M, Piacquadio P, De Stefano G (2002). Influence of a New Crushing Technique on the Composition of the Volatile Compounds and Related Sensory Quality of Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 483-489.

Shahidi F (1997). Natural antioxidants: Chemistry, health effects and applications. AOCS Press, Champaign, IL (USA), 97–149.

Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventos R, In. Packer L (ed) (1999). Methods in Enzymology (Vol. 299). San Diego: Academic Press, 152-178.

Smith T, Yang G, Serial D (1998). Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced Lung Tumorigenesis by Dietary Olive Oil and Squalene. *Carcinogenesis.* 19: 703-706.

Smolen J, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2012; 8: 235–43.

Smolen JS, and Redlich K. Rheumatoid arthritis. In Rose N & Mackay I (Eds): *The Autoimmune Diseases* (Fifth Edition); 2014. p. 511-523.

Solfrizzi V, Colacicco AM, D’Introno A, Capurso C, Torres F, Rizzo C, Capurso A, Panza F, (2006). Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow up of the Italian longitudinal study on aging. *Neurobiol. Aging.* 27: 1694–1704.

Solfrizzi V, Colacicco AM, D’Introno A, Capurso C, Torres F, Rizzo C, Capurso A, Panza F, (2006). Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow up of the Italian longitudinal study on aging. *Neurobiol. Aging.* 27: 1694–1704.

Solfrizzi V, Panza F, Capurso A (2003). The role of diet in cognitive decline. *J. Neural. Transm.* 110: 95–110.

Solfrizzi V, Panza F, Torres F, Mastroianni F, Del Parigi A, Venezia A, Capurso A, (1999). High monounsaturated fatty acids intake protects against age-related cognitive decline. *Neurology.* 52: 1563–1569.

Speroni E, Guerra MC, Minghetti A, Crespi-Perello N, Pasini P, Piazza F, Roda A (1998). Oleuropein evaluated in vitro and in vivo as an antioxidant. *Phytotherapy Research.* 12: 98–100.

St-Laurent-Thibault C, Arseneault M, Longpré F, Ramassamy C. Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid-b-induced toxicity. Involvement of the NF- κ B signaling. *Curr. Alzheimer Res.* 2011; 8: 543–551.

Strand V, Kimberly R, Isaacs J. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6: 75–92.

Sumpio B, Cordova A, Be rke-Schlessel D (2006). Green tea, the “Asian paradox,” and cardiovascular disease. *J Am Coll Surg.* 202:813–825.

Sung B, Jin Jeong KI, Seok Song YE, Jin Son M, Pal Yu B, Young Chung H (2005). cDNA representational difference analysis used in the identification of genes related to the aging process in rat kidney. *Mechanisms of Ageing and Development.* 126: 882–891.

Tanaka T, Makita H, Kawamori T, Kawabata K, Mori H, Murakami A, Satoh K, Hara A, Ohigashi H, Koshimizu K (1997). A xanthine oxidase inhibitor 10 acetoxychavicol acetate inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis.* 18: 1113–1118.

Tiscornia E, Fiorina N, Evangelisti F (1982). Chemical Composition of Olive Oil and Variations Induced by Refining. *Riv. Ital. Sost. Grasse.* 59: 519-555.

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C (2003). Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population. *N Engl J Med.* 348: 2599-2608.

Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T (2005). Modified Mediterranean Diet and Survival: EPIC- elderly Prospective Cohort Study. *Bmj.* 330: 991.

Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL, Stupans I (2001). The *in vivo* fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *Journal of Nutrition.* 131: 1993–1996.

Tuck KL, Hayball PJ (2002). Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 13: 644.

Tuck KL, Hayball PJ, Stupans I (2002). Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50: 2404–2409.

Uccella N (2001). The olive biophenols: hedonic-sensory descriptors of evoo and wotos in the Mediterranean aliment culture. In Food flavours and Chemistry: Advances of the New Millennium. A. H. Spanier, F. Shahidi, T.H. Parliment, C. J. Mussinan, C. T. Ho, E. TratrasContis Eds. *The Royal Society of Chemistry Publishers, Cambridge, UK.* 253-265.

Van Dyke DR, Saltman P (1996). Hemoglobin: a mechanism for the generation of hydroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine.* 20: 985–989.

Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited *in vitro* by olive oil constituents. *Atherosclerosis.* 117:25–32.

Visioli F, Bellomo G, Montedoro GF, Gallic (1995a). Low density lipoprotein oxidation is inhibited *in vitro* by olive oil constituents. *Atherosclerosis.* 117: 25–32.

Visioli F, Bellomo G, Montedoro GF, Gallic (1995a). Low density lipoprotein oxidation is inhibited *in vitro* by olive oil constituents. *Atherosclerosis.* 117: 25–32.

Visioli F, Caruso D, Plasmati E, Patelli R, Mulinacci N, Romani A, Galli G, Galli C (2001). Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently a and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radical Research.* 34: 301– 305.

Visioli F, Galli C (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev.* 56: 142– 147.

Visioli F, Galli C (1998b). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition Reviews.* 56: 142–147.

Visioli F, Galli C (2001). Antiatherogenic components of olive/olive oil. *Current Atherosclerosis Reports*. 3: 64–67.

Visioli F, Galli C (2003). Olives and their production waste products as sources of bioactive compounds. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 1: 85–88.

Visioli F, Galli C (2003). Olives and their production waste products as sources of bioactive compounds. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 1: 85–88.

Visioli F, Galli C, Bonnet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*. 468: 159–160.

Visioli F, Galli C, Borner F, Mattei A, Patelli R, Galli G, et al. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett*. 2000; 468:159–160.

Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, et al. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J. Nutr*. 2003; 133: 2612–2615.

Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB (2001). Olive oil phenols are absorbed in humans. *American Society for Nutritional Sciences*. 409–417.

Wafa Laaboudi, Jamal Ghanam, Oumaima Ghoumari, Fatiha Sounni, Mohammed Merzouki, Mohamed Benlemlih (2016). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of phenolic olive tree extract in streptozotocin diabetic rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 8, Issue 12, 2016.

Wattiaux R, Jadot M, Warnier-Pirrotte MT, Wattiaux-De Coninck S. Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Lett*. 1997; 417:199-202.

Wells G, Becker JC, Teng J, Dougados M, Schiff M, Smolen J, et al. Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann. Rheum. Dis*. 2009; 68: 954–60.

Wiseman SA, Mathot JNJ, De Fouw NJ, Tijburg LBM (1996). Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*. 120: 15–23.

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

Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 2010; 32: 815-827.

Yermilov V, Rubio J, Ohshima H (1995). Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite *in vitro* and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Letters.* 376 : 207–210.

Zhang X, Cao J, Jiang L, Zhong L. Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-kappa β activation in THP-1 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2009a; 32: 578–582.

Zhang X, Cao J, Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2009b; 379: 581–6.

Zhu LI, Liu Z, Feng ZHao J, Shen WEI, Li X, Sun L, Sharman E, Wang Y, Wertz K, Weber P, Shi X, Liu J (2010). Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 21 : 1089–1098.

Zhuang S, Kinsey GR, Yan Y, Han J, Schnellmann RG. Extracellular signal-regulated kinase activation mediates mitochondrial dysfunction and necrosis induced by hydrogen peroxide in renal proximal tubular cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 325:732-40.

70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J. Exp. Med.* 2004; 200:425-35.

