

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**



**ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE**

**Département de Génie de l'Environnement**

**Laboratoire de l'Unité de Recherche en Ingénierie et Environnement**

**MEMOIRE DE MASTER**

**En Génie de l'Environnement**

**Thème**

**Identification des polyphénols dans les extraits  
des rejets d'huileries par chromatographie  
liquide à haute performance (HPLC)**

**Réalisé et présenté par :**

**BENDIEB ABERKANE Amar**

**Proposé est dirigé par :**

**Pr. GRIB Hocine**

**Soutenu le 16/06/2015 devant le jury suivant :**

**Président de jury : Mr. MAMERI Nabil**  
**Examineur: Mme. ABDI Haider Nadia**  
**Promoteur : Mr. GRIB Hocine**  
**Co-promotrice : Mme FERGUENE Amel**

**Professeur, ENP**  
**Professeur, ENP**  
**Professeur, ENP**  
**Doctorante, ENP**

**Promotion juin 2015**

**Ecole Nationale Polytechnique (ENP)**  
**10, Avenue des Frères Oudek, Hassen Badi, BP. 182, 16200 El Harrach, Alger, Algérie**  
[www.enp.edu.dz](http://www.enp.edu.dz)

## ملخص:

الهدف من هذا العمل هو تحديد المركبات الفينولية في النفايات السائلة لمعاصر الزيتون (الزبار) بالكروماتوغرافيا السائلة مع الكشف : (Diode Array Detector)، لقد قمنا بهذه التحاليل بعد إستخراج المركبات الفينولية من ثفل الزيتون و مياه عصر الزيتون (الزبار) بإستخدام عدة مذيبات، و تقييمها كيميا و نوعيا، هذه الطريقة مكنتنا من دراسة مردود الإستخراج لمركبين فينولين هما حمض الغال و الفينول.

**الكلمات المفتاحية :** تحديد، ثفل الزيتون، النفايات السائلة لمعاصر الزيتون (الزبار)، الكروماتوغرافيا السائلة (HPLC) ، مردود، المركبات الفينولية.

## Résumé :

L'objectif de ce travail est l'identification des polyphénols des sous-produits oléicoles par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à barrette de détection (DAD) après leur extraction à partir des grignons d'olive et les margines d'olives en utilisant différents solvant; et de l'évaluer quantitativement et qualitativement, cette méthode nous a permis d'étudié le rendement d'extraction de deux éléments polyphénoliques tel que l'acide gallique et le phénol.

**Mots clés :** Identification, Grignon d'olives, margines, chromatographie liquide HPLC, rendement, polyphénols.

## Abstract:

The aim of this work is the identification of polyphenols in olive by-products by high performance liquid chromatography (HPLC) detection array (DAD) after extraction from a solid residue (Olive Mill SolidWaste) and an aqueous effluent (Olive Mill WasteWater) using various solvent; and evaluate it quantitatively and qualitatively, this method allowed us to study the extraction yield of two polyphenols compounds Gallic acid and Phenol.

**Keys words:** Identification, Olive Mill SolidWaste, Olive Mill WasteWater, yield, polyphenols.

## *Remerciements*

*Ce travail a été réalisé au laboratoire l'Unité de Recherche en Ingénierie et Environnement (l'URIE) du département de Génie l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger.*

*Je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la force, la puissance, la patience et la volonté pour réaliser ce mémoire « hamdoulillah ».*

*Je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance à Monsieur GRIB H., professeur et Directeur du Laboratoire de l'URIE à l'ENP, pour avoir encadré ce travail, Je le remercie pour leur encadrement, disponibilité et conseils au cours de ce travail ainsi que pour ses qualités relationnelles.*

*Je remercie profondément Mme BENSADALLAH L., Mme KHALADI S., HARTI M et Mme CHEMLAL R., pour leurs aides précieux depuis mon arrivé au laboratoire, et de me faire bénéficier de leurs expériences, compétences et la motivation apportée durant la réalisation de ce mémoire.*

*Je remercie vivement Monsieur MAMERI Nabil, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, pour l'honneur qu'il me fait de présider ce jury.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur ABDI Haider Nadia, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, d'avoir acceptée d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements et profondes reconnaissances s'adressent également à tous mes collègues ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire notamment (Leila, Mohamed), qui ont fait pour que ce travail se passe dans une agréable ambiance. Une pensée sincère pour vous tous, vous qui deviennent « frères et sœurs » et sont toujours disponibles pour un coup de main, Un grand  
Merci.*

*Mes remerciements et profondes reconnaissances s'adressent également à toute l'équipe du laboratoire d'analyse de l'entreprise pharmaceutique BEKER de Dar-El-Beida, en particulier Mr.*

*Hakim Z.*

*Pour finir j'adresse mes remerciements à ma famille, mes amis, à tous ceux qui contribués à ma formation. Merci pour votre soutien.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

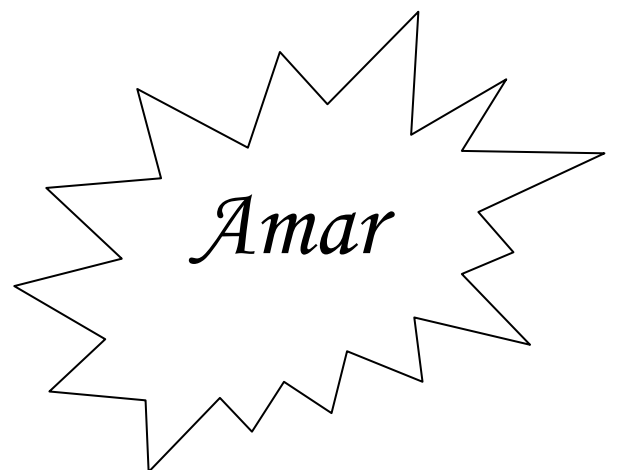
*A mes parents qui m'ont tout donné*

*A mes sœurs et frères*

*A mes cousins et cousines et toute la famille*

*A tous mes amis qui sont pour moi ma deuxième famille*

*Et à tous ceux qui ont contribué à ma formation*



# *Sommaire*

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

## **Chapitre I : Etude bibliographique**

<b>I-1 Grignons d'olive</b> .....	<b>2</b>
<b>I-1-1 Définition</b> .....	<b>2</b>
<b>I-1-2 Composition chimiques des grignons</b> .....	<b>2</b>
<b>I-1-3 Impact du grignon d'olive sur l'environnement</b> .....	<b>3</b>
<b>I-1-4 Traitement des grignons d'olive</b> .....	<b>3</b>
<b>I-1-5 Valorisation des grignons d'olive</b> .....	<b>4</b>
<b>I-2 Les margines</b> .....	<b>5</b>
<b>I-2-1 Définition</b> .....	<b>5</b>
<b>I-2-2 Composition physico-chimique des margines</b> .....	<b>5</b>
<b>I-2-3 Problématique environnementale</b> .....	<b>5</b>
<b>I-2-4 Valorisation des margines</b> .....	<b>7</b>
<b>I-3 Les composés phénoliques (Polyphénols)</b> .....	<b>8</b>
<b>I-3-1 Classification</b> .....	<b>8</b>
<b>I-3-2 Les principaux voie de synthèse des polyphénols</b> .....	<b>8</b>
<b>I-3-3 Les polyphénols dans les rejets d'huileries</b> .....	<b>9</b>
<b>I-3-4 Importance des composés phénoliques</b> .....	<b>9</b>
<b>I-3-5 L'acide gallique</b> .....	<b>10</b>
<b>I-3-6 Le phénol</b> .....	<b>11</b>

## **Chapitre II: Matériels et méthodes**

<b>II-1 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)</b> .....	<b>14</b>
<b>II-1-1 Principe</b> .....	<b>14</b>
<b>II-1-2 Le matériel et les conditions chromatographique</b> .....	<b>15</b>
<b>II-2 Méthodes de calcul</b> .....	<b>16</b>
<b>II-2-1 Concentration en polyphénol dans les extraits</b> .....	<b>16</b>

## Chapitre III: Résultats et discussion

<b>III-1 Dosage et analyse des composés phénolique par HPLC.....</b>	<b>17</b>
<b>III-1-1 Préparation des solutions standards .....</b>	<b>17</b>
<b>III-1-2 Les grignons d'olives .....</b>	<b>18</b>
<b>III-1-2-1 Quantification de l'acide gallique .....</b>	<b>18</b>
<b>III-1-2-2 Quantification du phénol.....</b>	<b>20</b>
<b>III-1-3 Les margines .....</b>	<b>22</b>
<b>III-1-3-1 Quantification de l'acide gallique .....</b>	<b>22</b>
<b>III-1-3-2 Quantification du phénol.....</b>	<b>24</b>
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>26</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I.1: Composition chimique indicative des différents types de grignons.....</b>	<b>3</b>
<b>Tableau. I.2: Composition chimique des margines.....</b>	<b>5</b>
<b>Tableau III.1 : Données chromatographiques des standards utilisé.....</b>	<b>18</b>
<b>Tableau III.2: Résultats de l'analyse par HPLC ainsi que la quantité en acide gallique calculé (grignon).....</b>	<b>19</b>
<b>Tableau III.3: Résultats de l'analyse par HPLC ainsi que la quantité en phénol calculé (grignon).....</b>	<b>21</b>
<b>Tableau III.4 : Résultats de l'analyse par HPLC ainsi que la quantité en acide gallique calculé (margine).....</b>	<b>23</b>
<b>Tableau III.5 : Résultats de l'analyse par HPLC ainsi que la quantité en phénol calculé (margine).....</b>	<b>24</b>

## *Liste des figures*

<b>Figure I.1 : Différentes filières de valorisation de grignons d'olive.....</b>	<b>4</b>
<b>Figure I.2 : Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel.....</b>	<b>6</b>
<b>Figure I.3 : Principaux voies de valorisation et de traitement des margines.....</b>	<b>7</b>
<b>Figure I.4 : Structure de l'acide gallique.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure I.5 : Structure du phénol.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure II.1 : Schéma de base d'une chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....</b>	<b>14</b>
<b>Figure II.2 : Appareil HPLC utilisé pour le dosage des polyphénols.....</b>	<b>16</b>
<b>Figure III.1 : HPLC - Pic de l'acide gallique standard.....</b>	<b>17</b>
<b>Figure III.2 : HPLC - Pic du phénol standard.....</b>	<b>17</b>
<b>Figure III.3 : Evolution de la quantité d'extraction par SOXLHET de l'acide gallique par différents solvants (grignon).....</b>	<b>19</b>
<b>Figure III.4 : Quantité extraite en acide gallique par SOXLHET en fonction de solvants (grignon).....</b>	<b>20</b>
<b>Figure III.5 : Evolution de la quantité d'extraction par SOXLHET du phénol par différents solvants (grignon).....</b>	<b>21</b>
<b>Figure III.6 : Quantité extraite en phénol par SOXLHET en fonction de solvants (grignon).....</b>	<b>22</b>
<b>Figure III.7 : Evolution de la quantité d'extraction par DISTILLATION de l'acide gallique par les deux solvants (margine).....</b>	<b>23</b>
<b>Figure III.8 : Quantité extraite de l'acide gallique par DISTILLATION en fonction de solvants (margine).....</b>	<b>23</b>
<b>Figure III.9 : Evolution de la quantité d'extraction par DISTILLATION du phénol par les deux solvants (margine).....</b>	<b>24</b>
<b>Figure III.10 : Quantité extraite du phénol par DISTILLATION en fonction de solvants (margine).....</b>	<b>25</b>



## *Liste des abréviations*

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**AG :** Acide gallique

**C:** Concentration en (g/l)

**COA:** Coenzyme A

**DAD:** Diode Array Detector

**DBO:** Demande Biologique en Oxygène (g d'O<sub>2</sub>/l)

**DCO:** Demande Chimique en Oxygène g d'O<sub>2</sub>/l)

**EPS:** Exopolysaccharides ;

**HPLC:** Chromatographie liquide à haute performance

**LDL:** Low Density Lipoprotein

**m :** masse en (mg)

**POU :** Protéines d'Organismes Unicellulaires

**s :** surface d'un pic (mAU\*s)

**t :** temps en (min)

L'industrie oléicole est une activité économique importante, concentrée principalement dans les pays méditerranéens qui tiennent environ **95%** de la production mondiale, dont **1,7%** pour l'Algérie en 2012. [1]

Comme toutes les industries agro-alimentaires, L'industrie oléicole engendre en plus de l'huile comme produit principal, de grandes quantités de deux sous-produits (résidus) principal tel que les **grignons d'olive et les margines**, ces derniers posent de sérieux problèmes à l'environnement dans la plupart des pays oléicoles [2]. La valorisation de ces résidus est devenue une nécessité pour éviter une pollution de plus en plus cruciale et pour contribuer à améliorer la rentabilité du secteur oléicole.

C'est dans ce cadre que ce travail met l'accent sur l'identification des composés phénoliques issus des rejets d'huileries tels que (les grignons d'olive et les margines) après extraction par différents procédés. De l'évaluer quantitativement et qualitativement, et ceci on utilisant des techniques chromatographiques.

Les polyphénols ont montré des propriétés antimicrobiennes et anti-cancérogènes. [3] Plus particulièrement, ces polyphénols sont identifiés comme des antioxydants naturels de la famille des antioxydants phénoliques largement utilisés en agroalimentaire, pharmacie, médecine, cosmétique...etc. [4]

Notre étude est constituée de trois chapitres :

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons commencé par une étude bibliographique sur : les rejets d'huileries, leur impact sur l'environnement et leurs valorisations ; et les composés phénoliques, leur importance, biosynthèse et leur applications.

Dans le deuxième chapitre nous avons écrit le matériel et les méthodes utilisées pour l'analyse des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) qualitativement et quantitativement de deux molécules (l'acide gallique et le phénol); dans le but d'évaluer leurs quantités dans les rejets d'huileries.

Le troisième chapitre comporte une synthèse et une interprétation des résultats ainsi qu'une conclusion générale et perspectives.

# *Chapitre I*

*« Etude bibliographique »*

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile, laisse deux principaux résidus : l'un liquides appelé margine et l'autre solide appelé grignons d'olive.

Les grignons et les margines constituent les principaux sous-produits des huileries d'olive. Chaque année, les pays oléicoles enregistrent des volumes importants de ces deux sous-produits.

Les olives contiennent généralement environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation (Margines). [5]

## I-1 Grignons d'olive

### I-1-1 Définition

Les grignons sont les résidus solides issus de la première pression ou centrifugation et sont formés des pulpes et noyaux d'olives. [6] Il est constitué de l'épicarpe du fruit (pellicule) le mésocarpe (pulpe ou chair de l'olive) et l'endocarpe (coque et amande de noyau).

Ce produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite de grignons d'olive après extraction chimique.[6]

### I-1-2 Composition chimiques des grignons [7].

La composition chimique des grignons d'olive varie dans très larges limites selon le stade de maturité des olives, le procédé d'extraction de l'huile, l'épuisement par les solvants. Cette composition peut se résumer comme suit :

- La teneur en cendres est normalement faible (3 à 5 %). Les teneurs élevées rencontrées sont dues à l'absence de lavage et à la présence des olives ramassées à même le sol.
- Les teneurs en matière azotée varient moins fortement et sont en moyenne de l'ordre de 10 %.
- La teneur en matières grasses est relativement élevée et varie principalement selon le procédé technologique employé. L'épuisement de grignon permet d'avoir un produit dont la teneur oscille entre 3 et 4 % de la matière sèche. Ces matières grasses sont composées principalement d'acide oléique (84 %), stéarique, palmitique, myristique et linolique.
- La teneur en cellulose brute est élevée (32 à 47 %).
- Les grignons contiennent **1–2,5%** en produits phénolique [8]. Les polyphénols de

l'olive sont en majorité éliminés dans les margines et l'huile durant la trituration. Les principaux polyphénols contenant dans les rejets d'huileries sont montrés dans l'Annexe 01.

**Tableau I.1: Composition chimique indicative des différents types de grignons:[9]**

		% de la Matière Sèche			
Type	Matière Sèche	Matières minérales	Mat. Azoté totales	Cellulose brute	Matières Grasses
<b>Grignon brut</b>	75–80	3–5	5–10	35–50	8–15
<b>Gr. gras part. dénoyauté</b>	80–95	6–7	9–12	20–30	15–30
<b>Grignon épuisé</b>	85–90	7–10	8–10	35–40	4–6
<b>Gr. épuisé part. dénoyauté</b>	85–90	6–8	9–14	15–35	4–6
<b>Pulpe grasse</b>	35–40	5–8	9–13	16–25	26–33

### **I-1-3 Impact du grignon d'olive sur l'environnement**

La majorité des grignons sont rejetés dans la nature et sont source de pollution soit parce qu'ils sont contaminés par des champignons, soit parce qu'ils rejettent des substances toxiques dans l'environnement. Les toxines fongiques ou les composés polyphénoliques qui résistent à la dégradation bactérienne peuvent alors se lixivier, menaçant ainsi la santé humaine et l'environnement. Certaines sources d'eau ont été polluées.

### **I-1-4 Traitement des grignons d'olive**

Dans les usines extractrices d'huile de grignons, on effectue un séchage jusqu'à une humidité de (8-10%) et une extraction chimique à l'aide d'hexane, qui dissout la fraction grasse. [10]

La destination finale des grignons détermine le traitement a effectué. Différents types de grignons peuvent être obtenus. Citons :

- **Grignon brut** : C'est le résidu de l'extraction de l'huile d'olive. Ses teneurs relativement élevées en eau et en huile favorisent son altération lorsqu'il est laissé à l'air libre. [11]
- **Grignon épuisé** : C'est le résidu obtenu après déshuilage du grignon brut par solvant, l'hexane généralement. [11]
- **Grignon partiellement dénoyauté** : Il résulte de la séparation partielle des débris de noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation. [11,12]

### I-1-5 Valorisation des grignons d'olive

La valorisation du grignon d'olive constitue une source potentielle de revenu complémentaire pouvant contribuer à l'amélioration de la rentabilité des exploitations oléicoles. Parmi les possibilités de revalorisation de grignon d'olive, on peut résumer toutes les techniques de valorisation dans le schéma suivant

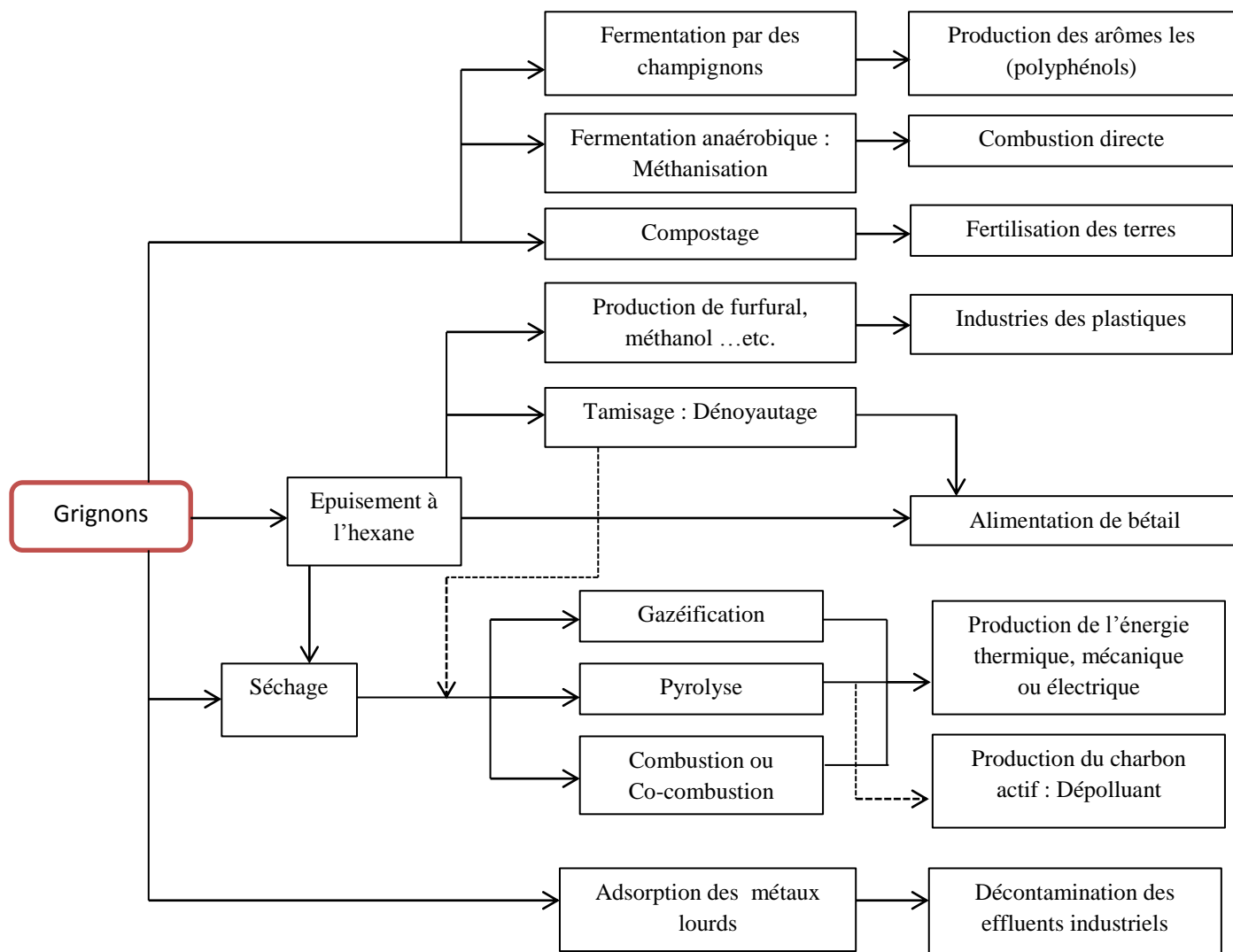


Figure I.1 : Différentes filières de valorisation de grignons d'olive. [13]

## I-2 Les margines

### I-2-1 Définition

Les margines ou eaux de végétation sont des effluents liquides générés par la fabrication de l'huile. Généralement, 40 à 50 % de ces eaux proviennent du fruit (eau de végétation), le reste de l'eau ajoutée pendant la trituration. Le volume des margines varie avec le système d'extraction [6].

Les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux de couleur brune rougeâtre. Ce liquide a une odeur agréable qui rappelle celle de l'huile d'olive mais un goût amer.

### I-2-2 Composition physico-chimique des margines

Les margines sont légèrement acides (pH = 4,5 à 5), elles sont très polluantes, surtout pour les nappes phréatiques. Leurs effets nocifs proviennent en grande partie de leur degré élevé de pollution organique (protéines, lipides, glucides et polyphénols peu biodégradable) qui inhibent la croissance des micro-organismes. La demande chimique en oxygène (DCO) est supérieur à 220 g/L avec un rapport de DCO/DBO entre 2,5 et 5 (donc difficilement dégradable) [14]; les composés fondamentaux des margines sont l'eau (83%), les substances organiques (15%) et de concentration élevée de matière solide totale (ST) 20 g/L (Tableau I.2).

**Tableau. I.2: Composition chimique des margines. [6]**

Composant	Teneur [%]
Eau	83 – 88 %
Matière organique	10.5 – 15 %
Matières minérales	1.5 – 2 %
Matières azotées totales	1.25 – 2.4 %
Matières grasses	0.03 – 1 %
Polyphénols	1.0 – 1.5 %

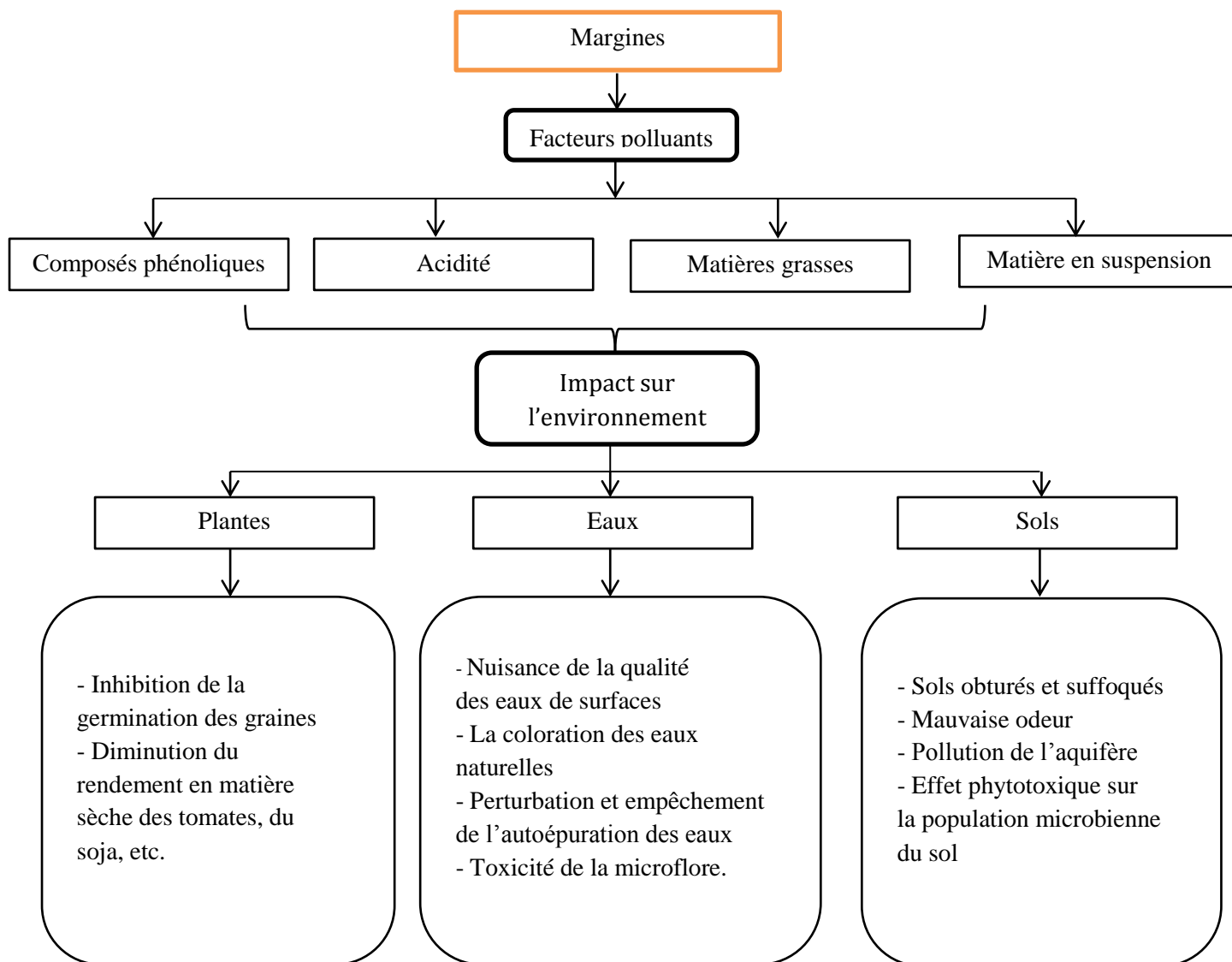
### I-2-3 Problématique environnementale

Le pouvoir polluant des margines est dû à des causes diverses parmi lesquelles nous pouvons citer :

- Le pH qui la première cause directe de la mort des poissons lorsque la marge est déversée dans le lit des fleuves.
- La teneur en matière grasse qui provoque la formation d'une couche à la surface de l'eau empêchant sa correcte oxygénation et le passage de la lumière solaire et faisant

obstacle au développement normal de la faune et la flore au sein des fleuves.

– Les substances phénoliques contenues dans les margines sont potentiellement toxiques et inhibent le développement des micro-organismes [15], leur teneur élevée dépassant dix fois plus celle de la phase huileuse [16]. D'une part, ces composés sont difficilement biodégradables. La **figure I.2** montre les différentes conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel.



**Figure I.2 : Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel.[6]**



### I-2-4 Valorisation des margines

Malgré les problèmes posés par les margines sur l'environnement, ces dernières peuvent être valorisées en subissant des traitements préalables permettant de produire des sous-produits présentant des rôles bénéfiques diversés.

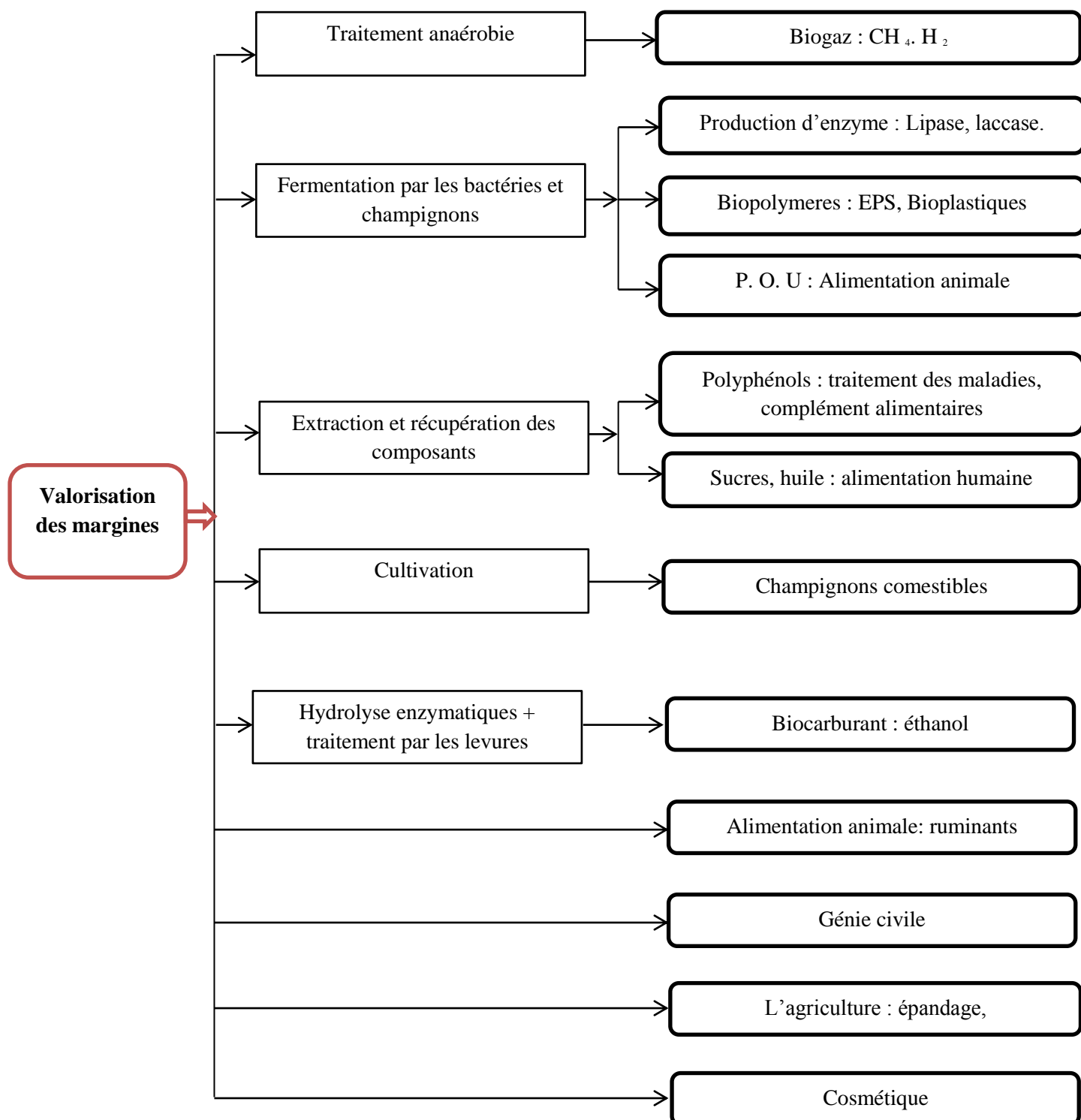


Figure I.3 : Principaux voies de valorisation et de traitement des margines. [17]

## I-3 Les composés phénoliques (Polyphénols)

### I-3-1 Classification

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes [18].

D'après [19], les polyphénols sont regroupés en nombreuses classe qui se différencient par :

- Les voies de la biosynthèse ;
- La complexité du squelette de base (de simple C<sub>6</sub> à des formes polymérisées) ;
- Les degrés de modification de ce squelette (degrés d'oxydation, de méthylation... ) ;
- Liaison possible de ses molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines et d'autres métabolismes secondaires qui peuvent être des composés phénoliques).

D'après [20] les composés phénoliques se regroupent en quatre groupes :

- Les acides benzoïques, les acides cinnamiques et les coumarines ;
- Les flavones, flavols et dérivés voisins ;
- Les chalcones, dihydrochalcones et auronnes ;
- Les anthocyanes.

Les principaux polyphénols des rejets d'huilerie sont montrés dans l'Annexe 01.

Les structures et origines de quelques polyphénols sont montrées dans l'Annexe 02. [21]

### I-3-2 Les principaux voie de synthèse des polyphénols

#### ➤ Voie acide shikimique

Les acides aminés aromatiques (phenylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux, ces acides aminés sont formés à partir des sucres simples issus des métabolismes primaires par voie de l'acide shikimique. La détermination de la phénylalanine donne naissance au précurseur direct des phénols : l'acide cinnamique.

La biosynthèse des composés phénoliques par voie d'acide shikimique est représentée dans l'Annexe 03.

➤ **Voie d'acide acétique [20]**

Cette voie donne naissance aux Flavonoïdes dont le squelette de base a une double origine :

- 3 molécules d'acétyl **COA** (cycle A) ;
- Une molécule de p-coumaryl **COA** (cycle B et l'hétérocycle C) ;

La condensation de ces unités donne naissance aux flavonoïdes et particulièrement aux pigments anthocyanes et flavonols ou encore certains monomères des types flavanols dont la polymérisation conduit aux tanins condensés. Les différentes étapes de formation des flavonoïdes par voie d'acide acétique sont montrées dans l'**Annexe 04**.

➤ **Voie des phénylpropanoïdes [20]**

Cette séquence biosynthétique permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques : acide coumarique, caféique, férulique et sinapique qui se présentent généralement sous forme d'esters ou de glucosides.

### **I-3-3 Les polyphénols dans les rejets d'huileries**

Les composés phénoliques des rejets d'huilerie sont très divers et leur structure est très variable. Plusieurs monomères ont été identifiés dans les margines. Ils sont représentés essentiellement par des acides et des alcools phénoliques. Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement les anthocyanes, la lignine et les tanins. Leur structure est très complexe et leur concentration peut atteindre **12 g.l<sup>-1</sup>** [22]. La teneur en polyphénols dans les rejets d'huilerie dépend essentiellement de la variété et de degré de maturité de l'olive.

### **I-3-4 Importance des composés phénoliques**

➤ **Sur la santé humaine**

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les polyphénols préviennent le développement des maladies cancérogènes dans l'organisme en inhibant les réactions oxydatives et empêchant la formation d'ADN anormal [23].

Une étude sur le cancer du côlon a également montré que des extraits phénoliques d'huile d'olive semblaient réduire la capacité d'adhésion des cellules cancéreuses, ce qui ralentirait la prolifération du cancer du côlon [24]. L'hydroxytyrosol réduit le dépôt des LDL (Low Density Lipoprotein, ou mauvais cholestérol) dans les parois artérielles, La présence de l'hydroxytyrosol et de quelques polyphénols est corrélée à une réduction de la formation des

molécules pro-inflammatoires [25,26].

L'acide caféique, l'acide férulique ainsi que l'hydroxytyrosol sont impliqués dans la protection contre les maladies cardiovasculaires. Ils ont un effet cytoprotecteur sur les cellules endothéliales en bloquant l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à l'oxydation des LDL [27].

#### ➤ **En cosmétologie**

L'intérêt des composés phénoliques en cosmétologie est lié aux propriétés suivantes :

Propriété antioxydante, capacité de chélater les métaux, pouvoir anti-inflammatoire, effet antimicrobien et l'intervention sur l'activité de nombreuses enzymes. Ils permettent de lutter contre le vieillissement cutané en tant que molécule antiradicalaire et en tant que protecteur des protéines de la peau comme l'élastine et le collagène. Le seul frein de l'utilisation des polyphénols en cosmétologie est leur forte réactivité à l'oxydation et leurs instabilités dans les formulations cosmétiques conduisant ainsi à la variation possible de l'odeur et de la couleur [28].

#### ➤ **Rôles des polyphénols dans les aliments et les végétaux**

Les polyphénols ont la capacité d'influencer l'aspect des aliments et notamment leurs couleurs. Ils peuvent provoquer leur brunissement car leur auto-oxydation conduit à une coloration. Ils améliorent le goût et la conservation des produits grâce à leurs propriétés antioxydantes.

Dans les végétaux, ils jouent un rôle dans la coloration des fleurs et des fruits qu'ils rendent attractifs à l'insecte qui assure la fécondation et dans la protection des végétaux contre le stress environnemental tout en luttant contre les micro-organismes, les bactéries et les champignons.

### **I-3-5 L'acide gallique**

#### ➤ **Sources**

L'acide gallique est largement distribué dans diverses plantes, fruits et aliments, où il est présent sous forme libre ou, plus communément, comme ingrédient de tannins, à savoir les gallotannins. Les noix de galle, sumac, l'écorce de chêne, le thé vert, raisins fraises, ananas, bananes, citrons, hamamélis, vins rouge et blancs et l'huile d'olive.[30,31]

➤ **Structure [31]**

L'AG ou acide 3, 4,5-trihydroxy- benzoïque ( $C_6H_2(OH)_3 COOH$ ) (figure I.4) issu de la voie de l'acide shikimique est un membre de classe des acides hydroxy-benzoïques. [31]

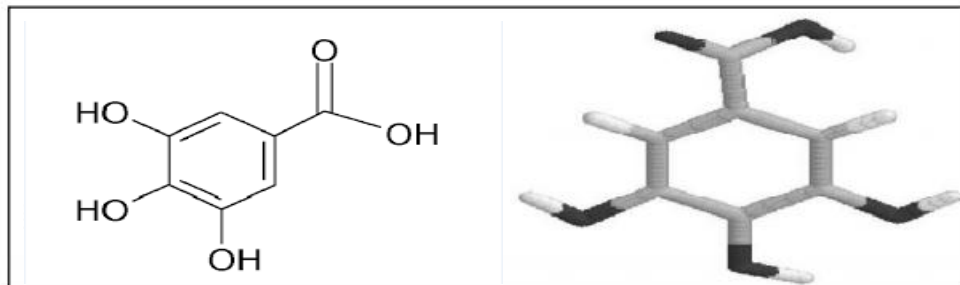


Figure I.4 : Structure de l'acide gallique

➤ **Propriétés et utilisation de l'acide gallique [31]**

Avec une structure cristalline, l'AG est un blanc jaunâtre pour une masse molaire de 170,12 g/mol, un point de fusion à 250°C et une solubilité dans l'eau de 1,1% à 20°C.

L'acide gallique est considéré comme un antioxydant potentiel, il est ainsi donc utilisé comme additif dans les aliments, les médicaments et cosmétique. En outre, l'acide gallique possède des activités anti-allergique, anti-inflammatoire, anti-mutagène et anti-cancéreuse.

Des recherches récentes ont étudié les effets anti-tumoraux, pro-apoptotique, anti-inflammatoire, Anti-cancérigène.

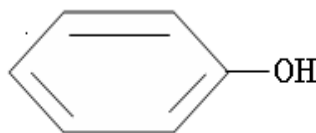
En outre, les dérivés de l'AG sont également retrouvés dans de nombreux médicaments avec diverses activités biologiques et pharmaceutiques. L'AG joue un rôle de protection des cellules contre les dommages induits par l'irradiation notamment UV.

### I-3-6 Le phénol

➤ **Définition du phénol**

Les phénols de formule générale **Ar-OH** sont des composés comportant un ou plusieurs groupes hydroxyles **OH** liés à un groupe aromatique **Ar**. Le plus simple des phénols est le phénol dérivé monohydroxylé du benzène.

C'est un composé organique aromatique de formule  $C_6H_5OH$ , appelé aussi acide phénique, hydroxybenzène ou encore acide carbonique. Composé d'un cycle aromatique benzénique et d'une fonction hydroxyle [32].



**Figure I.5 : Structure du phénol**

Le phénol est un liquide incolore qui sert à la fabrication de nombreux réactifs de l'industrie chimique (pharmacie, agrochimie, résines, nylon, explosifs...). Il a été isolé en 1834, à partir de résidus de houille.

#### ➤ Propriétés du phénol

Dans les conditions normales de température et de pression, le phénol est un solide qui se présente sous la forme d'une masse cristalline, hygroscopique et d'odeur caractéristique à la fois âcre et douceâtre. En présence d'impuretés, d'eau ou de lumière, le phénol se teint en rose ou rouge.

A  $25^{\circ}C$ , il est modérément soluble dans l'eau (environ  $80g.L^{-1}$ ), est en toute proportion à partir de  $65^{\circ}C$ . Il est également très soluble dans de nombreux solvants organiques usuels tels que : l'acétone, l'éthanol, l'oxyde de diéthyle... [33]

#### ➤ Utilisation du phénol

Le phénol est principalement utilisé en synthèse organique. Il constitue la matière première pour la production de bisphénol A (2,2-bis-1 hydroxyphénylpropane) utilisé dans la fabrication des résines phénoliques, de caprolactame utilisé dans la fabrication du nylon, d'alkylphénols, d'acide salicylique, de diphényl-éthers de chlorophénols, et autres substances chimiques, telles que l'acide adipique, la phénolphtaléine, l'acide picrique.

Il est aussi utilisé dans de nombreuses applications :

- Plastifiants (esters ignifuges, tels que diphényle crésyl, triphényle, phényle dibutyle et de diphényle phosphates octyle).

- Crésols et xylénols synthétiques (crésol et 2, 6-xylénol, qui sont utilisés pour plastiques et résines).
- Les produits pharmaceutiques : Il est aussi utilisé, dans une moindre mesure, en tant que composant dans des cosmétiques et des médicaments.
- Colorants.
- Fabrication de pesticides; parfums; lubrifiants et solvants; peintures; d'adhésifs; d'explosifs; de textile; des matériaux isolants.

## *Chapitre II*

*« Matériels et méthodes »*



Après l'extraction des composés phénoliques par différents solvants effectué dans la partie d'ingénierat, nous avons intéressées par l'identification quantitative de ces composés par la technique chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les deux molécules ciblées dans ce présent travail sont : l'acide gallique et le phénol. Basant sur leurs importances.

## II-1 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

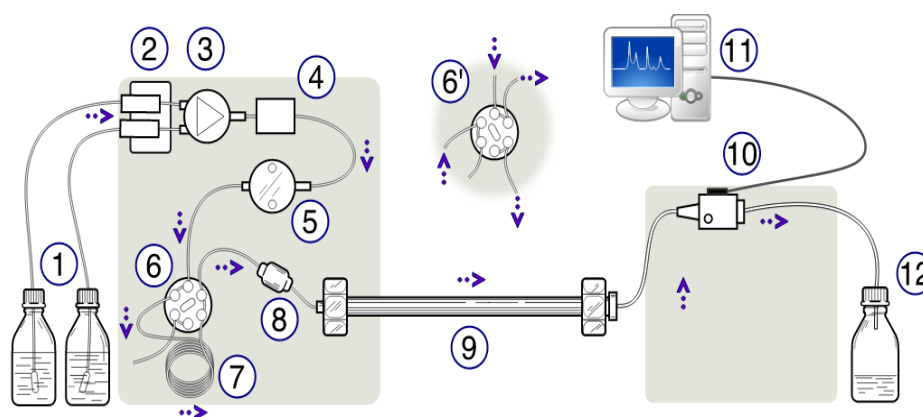
La chromatographie est une technique analytique dont les premières expériences, celles de TSWETT, datent de **1903**. Elle permet la séparation d'un ou plusieurs composés d'un mélange pour leur identification et leur quantification.

### II-1-1 Principe [34, 35]

La chromatographie en phase liquide est une méthode physico-chimique basée sur des différences d'interaction. Les molécules des produits à séparer (solutés) sont mises en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire contenue dans la colonne chromatographique. Ces interactions provoquent des échanges qui aboutissent à la séparation désirée. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt en permanence le système chromatographique, dont fait partie la colonne.

Les composés en solution se répartissent suivant leur affinité, entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Le schéma suivant représente une installation de base en **HPLC**.



**Figure II.1 : Schéma de base d'une chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

1. Réservoirs des solvants
2. Dégazeur,
3. Valve de gradient d'éluion,
4. Doseur de phase mobile (ou éluant),
5. Pompe à haute pression,
6. - Vanne d'injection en position « Inject »,  
- Vanne d'injection en position « Load »,
7. Boucle d'injection d' l'échantillon.
8. Pré-colonne (éventuelle),
9. Colonne analytique,
10. Détecteur,
11. Acquisition du signal,
12. Décharge rejets.

### II-1-2 Le matériel et les conditions chromatographique :

#### ➤ Le matériel utilisé

- Appareil HPLC Agilent S1100,
- Pompe: binaire avec un débit maximal : 5 ml/min, 400 Bar (pression que le système peut supporter),
- Injection: automatique Rhéodyne 7725 muni d'une boucle ( $V_{(injection) \max} = 100 \mu\text{L}$ ),
- Dégazeur d'eau: Traditionnel waters IN-LINE degasser.
- Détecteur: DAD (Diode Array Detector).
- Logiciel: Agilent Chemstation.
- Phase stationnaire:  $C_{18}$ \_15 cm fixé sur  $\text{SiO}_2$ .

#### ➤ Conditions chromatographique

Nous avons développé une méthode pour l'analyse des polyphénols après plusieurs tests effectués au niveau du laboratoire d'analyse de l'industrie pharmaceutique **BEKER**. L'appareil utilisé est montré dans la **Figure II.2**. On a abouti aux conditions de travail suivantes :

- **Débit:** 1 ml/min.
- **Volume d'injection:** 5  $\mu\text{L}$ .
- **Température de la colonne :**  $22 \pm 2$  °C.
- **Temps d'injection** = 20 min.
- **Solvant A :** Méthanol : 60% (v/v).
- **Solvant B :** Eau/ACN (Acetonitrile), 20 : 20 (v/v).
- **UV** de détection 254 nm.
- **Spectre d'absorption** 190-400 nm.



Figure II.2 : Appareil HPLC utilisé pour le dosage des polyphénols.

## II-2 Méthodes de calcul

### II-2-1 Concentration en polyphénol dans les extraits

La concentration en composés phénolique dans les extraits se calcule par la relation suivante :

$$\text{Concentration de l'échantillon} = \frac{\text{Surface}_{\text{pic de l'échantillon}} * \text{Concentration}_{\text{standard}}}{\text{Surface}_{\text{standard}}}$$

## *Chapitre III*

*« Résultats et discussion »*

### III-1 Dosage et analyse des composés phénolique par HPLC

L'analyse quantitative par chromatographie liquide haute performance est essentiellement une méthode comparative, elle est basée sur la relation reliant l'aire ou la hauteur du pic de l'analyte à sa concentration.

#### III-1-1 Préparation des solutions standards

En premier lieu, nous avons pris nos références (standards) :

1. Solution de l'acide gallique standard pour une concentration de **0,016 g/l**.
2. Solution du phénol standard pour une concentration de **0,016 g/l**.

En deuxième lieu, en analysant ces deux derniers par **HPLC**. Nous avons développé une méthode pour l'analyse des polyphénols précités dans le chapitre **II** paragraphe **II-1-2**.

Les analyses des deux étalons nous a permis d'obtenir les chromatogrammes présentés dans les figures suivantes :

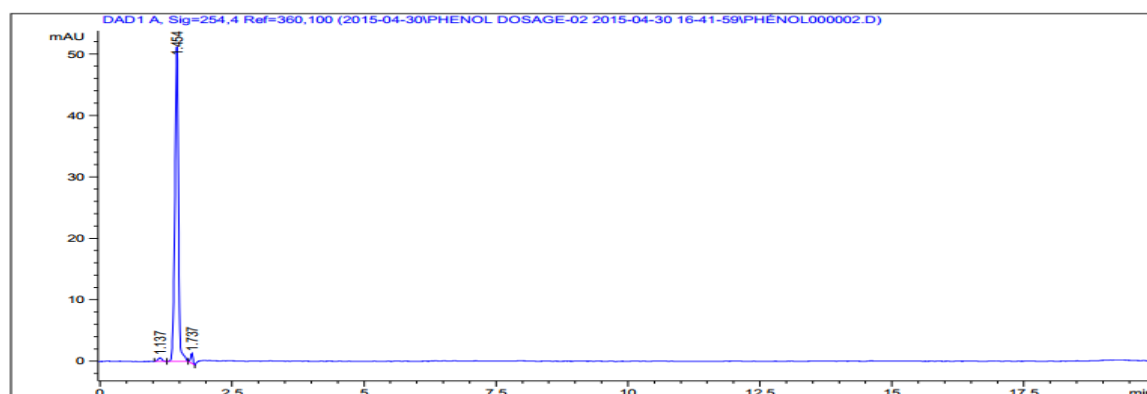


Figure III.1 : HPLC - Pic de l'acide gallique standard

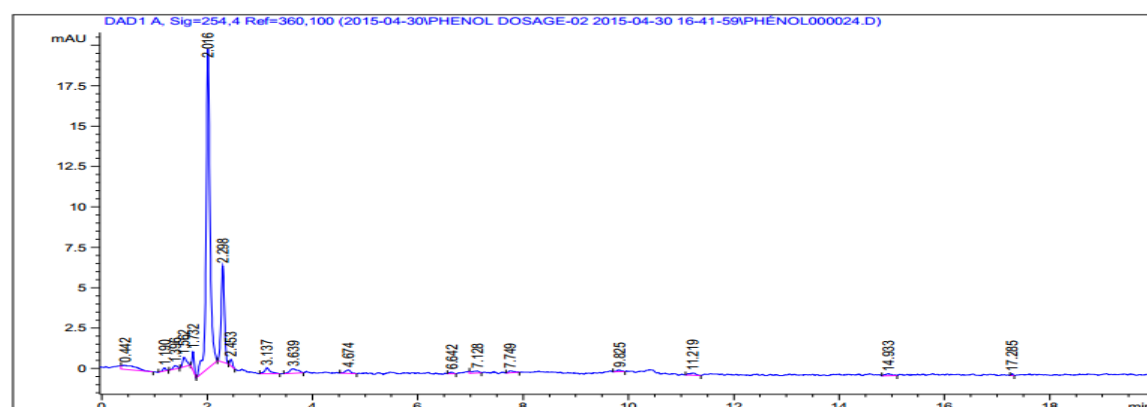


Figure III.2 : HPLC - Pic du phénol standard

On a utilisé ces deux standards parce qu'ils sont disponibles dans notre laboratoire, les grignons d'olives et les margines contiennent plusieurs composés phénoliques ; dans notre cas d'étude nous avons basé sur l'identification de l'acide gallique et le phénol basant sur leurs importances et utilités dans différents domaine.

D'après les chromatogrammes obtenus on peut citer les données chromatographiques sur les deux standards utilisé :

**Tableau III.1 : Données chromatographiques des standards utilisé**

	Concentration (g/l)	Temps de rétention (min)	Surface du pic (mAU*s)
<b>Acide gallique</b>	0,016	1,454	241,40453
<b>Phénol</b>	0,016	2,016	102,27415

Les résultats cités dans le **tableau III.1** nous permettent de calculer les différentes concentrations des extraits de nos échantillons.

Nous avons effectué une analyse quantitative et qualitative par HPLC sur quelques échantillons issus du procédé d'extraction par **SOXLHET** des grignons d'olives et par **DISTILLATION** celle des margines pour identifier l'acide gallique et le phénol.

Les chromatogrammes des différents extraits obtenus sont montrés dans (**l'annexe 05-06**). Dans laquelle on compare les pics et le temps de rétention des solutions standards avec les échantillons analysés ; pour calculer la concentration et le rendement d'extraction de ce dernier. D'après (**l'annexe 05-06**) la présence des pics montre la présence des polyphénols leur quantité dépend de la taille des pics.

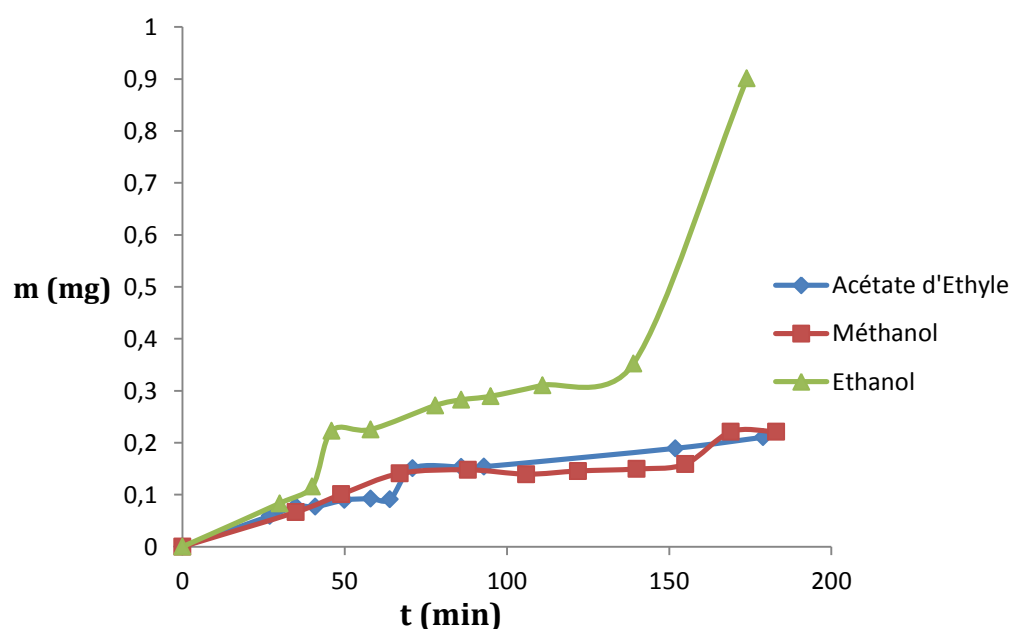
### **III-1-2 Les grignons d'olives**

#### **III-1-2-1 Quantification de l'acide gallique**

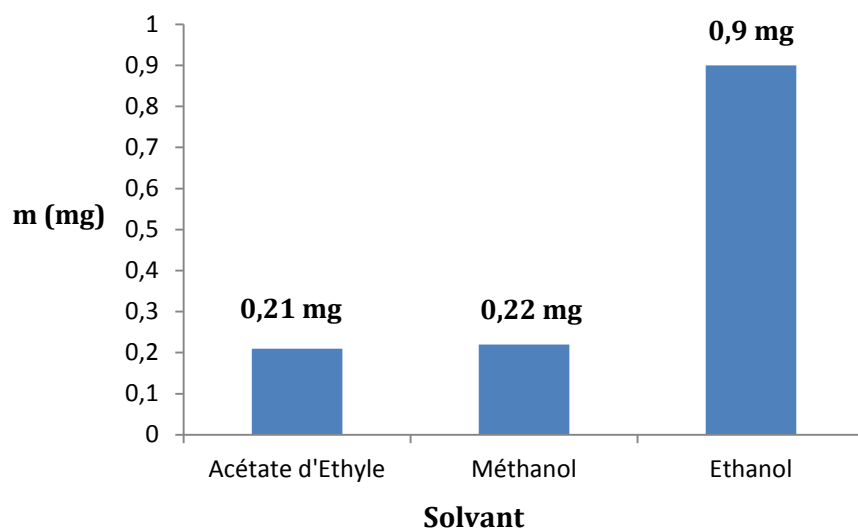
Les résultats obtenus par l'analyse HPLC de l'extraction de l'acide gallique par l'éthanol, méthanol et l'Acétate d'éthyle sont mentionnés dans le **tableau III.2** ci-dessous et présentés dans la **figure III.3**.

**Tableau III.2: Résultats de l'analyse par HPLC ainsi que la quantité en acide gallique calculé (grignon)**

Ethanol												
t (min)	0	30	40	46	58	78	86	95	111	139	174	
S (mAU*s)	0	6,308	8,828	17,115	17,466	21,239	22,28	23,023	24,926	28,526	73,621	
C (g/l)	0	4E-04	6E-04	0,0011	0,0012	0,0014	0,0015	0,0015	0,0017	0,0019	0,0049	
m (mg)	0	0,083	0,116	0,223	0,225	0,271	0,282	0,290	0,310	0,310	<b>0,901</b>	
Méthanol												
t (min)	0	35	49	67	88	106	122	140	155	169	183	
S (mAU*s)	0	5,032	7,68	10,823	11,45	10,905	11,486	11,89	12,778	17,896	18,089	
C (g/l)	0	3E-04	5E-04	0,00072	0,00075	0,00073	0,00076	0,00078	0,0008	0,0011	0,0012	
m (mg)	0	0,066	0,100	0,141	0,147	0,139	0,1457	0,149	0,159	0,221	<b>0,222</b>	
Acétate d'Ethyle												
t (min)	0	27	35	41	50	58	64	71	86	93	152	179
S (mAU*s)	0	4,474	5,915	5,9145	6,9545	7,209	7,209	12,014	12,309	12,468	15,468	17,367
C (g/l)	0	3E-04	4E-04	0,00039	0,00046	0,00047	0,0005	0,00079	0,00081	0,00083	0,001	0,0012
m (mg)	0	0,059	0,077	0,0771	0,0898	0,092	0,0912	0,151	0,153	0,189	0,1893	<b>0,210</b>



**Figure III.3 : Evolution de la quantité d'extraction par SOXLHET de l'acide gallique par différents solvants (grignon)**



**Figure III.4 : Quantité extraite en acide gallique par SOXLHET en fonction de solvants (grignon)**

Les trois solvants utilisés l'éthanol, méthanol et l'acétate d'éthyle sont de polarités très différentes. Les résultats montrent que le rendement d'extraction par l'éthanol est le plus élevé qui donne une quantité maximale en acide gallique : **0,9 mg** (voir la Figure III.4). Ce résultat est probablement dû au fait que l'acide gallique est beaucoup plus soluble dans l'éthanol que dans les deux autres solvants.

### III-1-2-2 Quantification du phénol

Les résultats obtenus par l'analyse HPLC de l'extraction du phénol par l'éthanol, méthanol et l'Acétate d'éthyle sont mentionnés dans le **tableau III.3** ci-dessous et présentés dans la **figure III.5**.



Tableau III.3: Résultats de l'analyse par HPLC ainsi que la quantité en phénol calculé (grignon)

Ethanol											
t (min)	0	30	40	46	58	78	86	95	111	139	174
S (mAU*s)	0	0	1,25	1,65278	2,464	3,2316	3,91325	4,65005	7,38974	7,80756	8,7081
C (g/l)	0	0	2E-04	0,00026	4E-04	0,00051	0,00061	0,00073	0,00116	0,00122	0,00136
m (mg)	0	0	0,038	0,0508	0,0751	0,0976	0,117	0,138	0,217	0,227	<b>0,251</b>
Méthanol											
t (min)	0	35	49	67	88	106	122	140	155	169	183
S (mAU*s)	0	1,7	1,865	2,10233	2,203	2,53308	5,2897	5,98706	6,85831	7,61649	8,3081
C (g/l)	0	3E-04	3E-04	0,00033	3E-04	0,0004	0,00083	0,00094	0,00107	0,00119	0,0013
m (mg)	0	0,053	0,057	0,064	0,067	0,076	0,158	0,177	0,201	0,222	<b>0,240</b>
Acétate d'Ethyle											
t (min)	0	27	35	41	50	58	64	71	93	152	179
S (mAU*s)	0	12,48	18,85	21,105	24,94	28,2906	30,6416	34,4454	39,1171	39,6907	40,0792
C (g/l)	0	0,002	0,003	0,0033	0,004	0,00443	0,00479	0,00539	0,00612	0,00621	0,00627
m (mg)	0	0,390	0,584	0,649	0,760	0,855	0,917	1,022	1,087	1,140	<b>1,146</b>

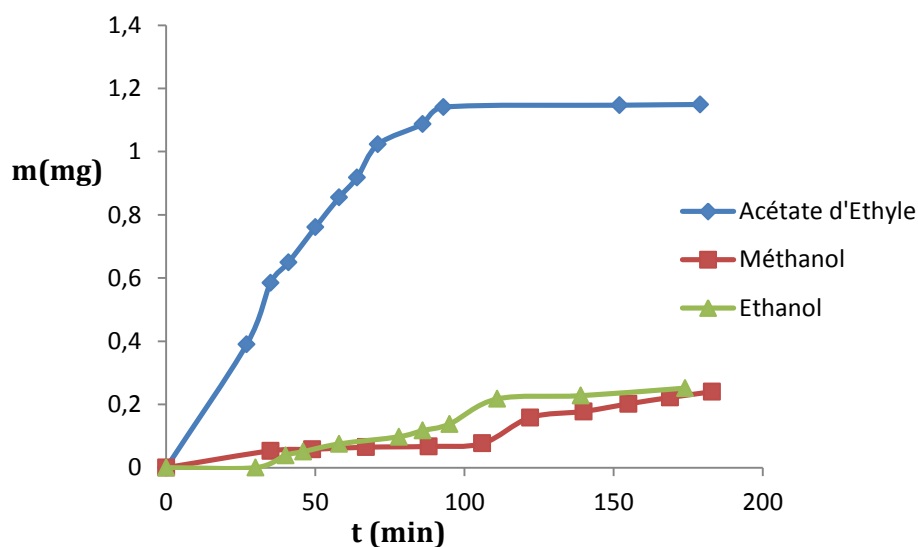
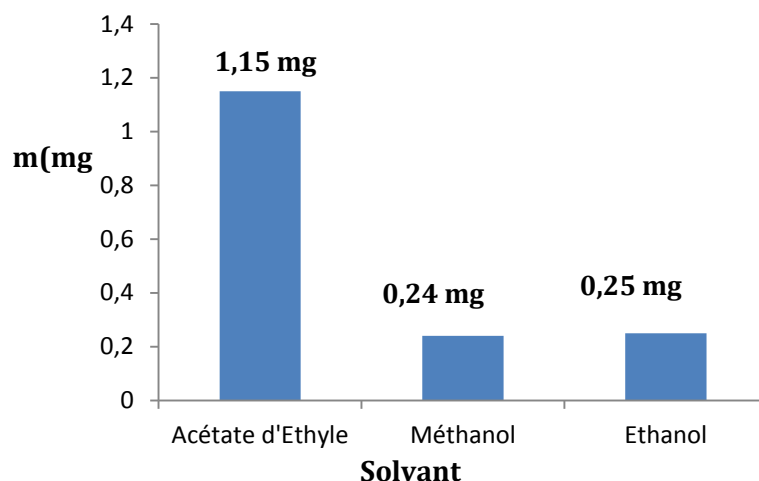


Figure III.5 : Evolution de la quantité d'extraction par SOXLHET du phénol par différents solvants (grignon)



**Figure III.6 : Quantité extraite en phénol par SOXLHET en fonction de solvants (grignon)**

On observe sur la figure III.5 que quantité en phénol croit avec le temps d'extraction. D'après la figure III.6 il en ressort que le rendement d'extraction par l'acétate d'éthyle est le plus élevé qui donne une quantité en phénol : **1,15 mg**. Ceci est simplement dû aux facteurs influençant le transfert de matière, et la solubilité du phénol est très élevée dans l'acétate d'éthyle que dans les deux autres solvants. Les deux autres solvants donnent des rendements faible en phénol on peut dire que le phénol n'est pas très soluble dans ces deux derniers.

On peut conclure que les grignons d'olives ont des quantités importantes en polyphénols tels que : l'acide gallique et le phénol.

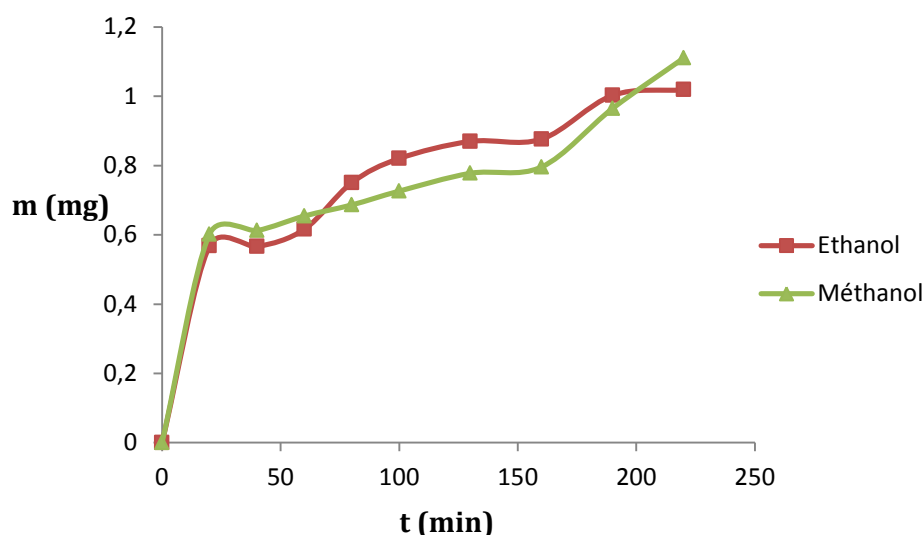
### III-1-3 Les margines

#### III-1-3-1 Quantification de l'acide gallique

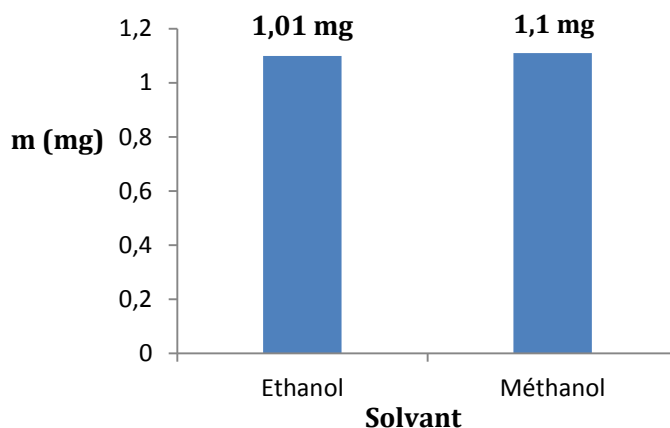
Les résultats obtenus par l'analyse HPLC de l'extraction de l'acide gallique par l'éthanol et le méthanol sont mentionnés dans le **tableau III.4** ci-dessous et présentés dans la **figure III.7**.

**Tableau III.4 : Résultats de l'analyse par HPLC ainsi que la quantité en acide gallique calculé (margine)**

Ethanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
S (mAU*s)	0	42,842	43,0661	47,2814	58,0915	64,06057	68,5295	69,6503	80,4234	82,4698
C (g/l)	0	0,0028	0,00285	0,003134	0,00385	0,004246	0,00454	0,00462	0,00533	0,00547
m (mg)	0	0,567	0,566	0,616	0,750	0,820	0,869	0,876	1,002	<b>1,018</b>
Méthanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
S (mAU*s)	0	45,404	46,5879	50,21586	53,1325	56,7143	61,2711	63,2615	77,3971	89,8794
C (g/l)	0	0,003	0,00309	0,003328	0,00352	0,003759	0,00406	0,00419	0,00513	0,00596
m (mg)	0	0,601	0,612	0,654	0,686	0,726	0,777	0,795	0,964	<b>1,11</b>



**Figure III.7 : Evolution de la quantité d'extraction par DISTILLATION de l'acide gallique par les deux solvants (margine)**



**Figure III.8 : Quantité extraite de l'acide gallique par DISTILLATION en fonction de solvants (margine)**

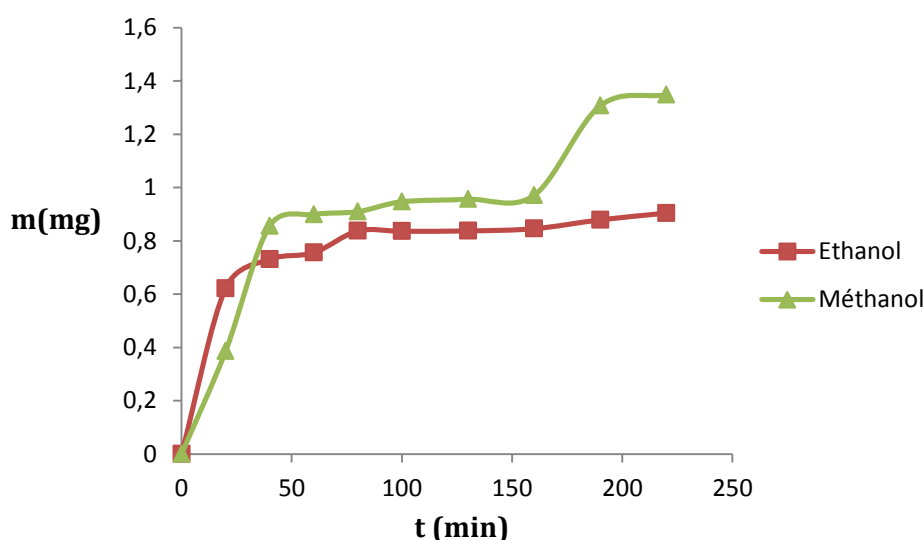
D'après la figure III.7 : nous observons que les deux courbes ont la même allure. Plus nous augmentons le temps d'extraction, plus le rendement en acide gallique augmente jusqu'à ce qu'il atteigne un maximum. D'après la figure III.8 il en ressort que le rendement est presque le même pour les deux solvants, qui donne une quantité : **1,01 mg** pour l'éthanol et **1,1 mg** celle du méthanol, et ça dû à la grande solubilité de l'acide gallique dans ces deux solvants.

### III-1-3-2 Quantification du phénol

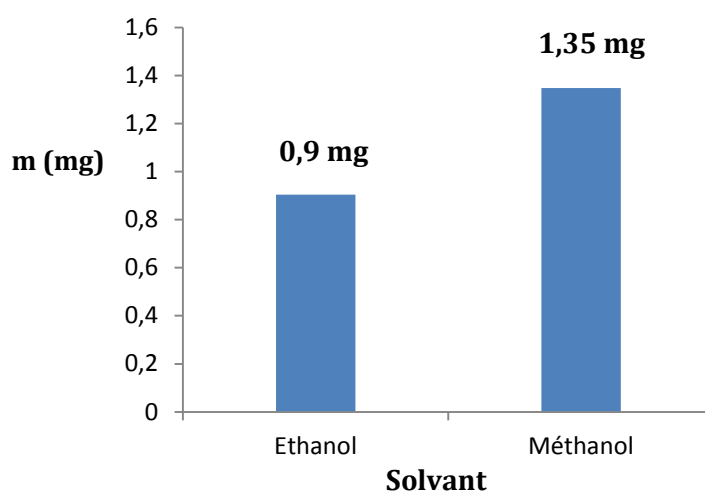
Les résultats obtenus par l'analyse HPLC de l'extraction du phénol par l'éthanol et le méthanol sont mentionnés dans le **tableau III.5** ci-dessous et présentés dans la **figure III.9**.

**Tableau III.5 : Résultats de l'analyse par HPLC ainsi que la quantité en phénol calculé (margine)**

Ethanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
S (mAU*s)	0	19,879	23,5573	24,57035	27,4618	27,6587	27,9549	28,4832	29,8672	31,0076
C (g/l)	0	0,0031	0,00369	0,003844	0,0043	0,004327	0,00437	0,00446	0,00467	0,00485
m (mg)	0	0,621	0,730	0,755	0,837	0,835	0,837	0,845	0,878	<b>0,904</b>
Méthanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
S (mAU*s)	0	12,328	27,5868	29,23078	29,8355	31,32381	31,9145	32,7072	44,4098	46,2407
C (g/l)	0	0,0019	0,00432	0,004573	0,00467	0,0049	0,00499	0,00512	0,00695	0,00723
m (mg)	0	0,385	0,855	0,899	0,909	0,946	0,956	0,971	1,306	<b>1,348</b>



**Figure III.9 : Evolution de la quantité d'extraction par DISTILLATION du phénol par les deux solvants (margine)**



**Figure III.10 : Quantité extraite du phénol par DISTILLATION en fonction de solvants (margine)**

L'étude de l'évolution la quantité en fonction du temps montre que celui-ci augmente progressivement dans le temps pour atteindre un palier pour l'éthanol, ce qui n'a pas le cas pour le méthanol qui atteint une quantité maximale de **1,35 mg** après **3h-30min** d'extraction, et ça dû principalement à l'affinité entre le méthanol et le phénol et la grande solubilité dans ce dernier.

On voit bien sur les deux figures que le méthanol est de loin le plus efficace que l'éthanol pour extraire le phénol. Ça peut être expliqué par l'influence des facteurs de transfert de la matière, nous citons l'affinité et la solubilité du phénol dans le méthanol.

On peut conclure que les margines ont des quantités très importantes en polyphénols tels que : l'acide gallique et le phénol.

*« Conclusion générale et perspectives »*

Ce travail s'articule autour de l'identification quantitative et qualitative des polyphénols de sous-produits agroalimentaires issus des industries oléicoles (les grignons d'olive et les margines), par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

L'extraction des polyphénols à partir de sous-produits oléicoles et la quantification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), ont permis de mettre en relief la présence de composés phénoliques dans nos échantillons par la présence de différents pics.

L'ensemble des résultats qualitatifs obtenus par HPLC confirment ceux obtenus par colorimétrie (effectués dans la partie d'ingénierat).

Cette technique nous a permis d'identifier deux composés phénoliques : tel que l'acide gallique et le phénol avec des quantités importantes. La présence d'autres pics nécessite d'autres solutions étalon ; cela n'est pas fait car nous n'avons pas tous les étalons qu'il faut. Cependant, dans les chromatogrammes analysés il y avait des pics importants qui n'ont pas été reconnus.

Les meilleurs résultats en terme de quantité d'extraction de l'AG à partir des grignons est de **0,9 mg** avec l'éthanol comme solvant d'extraction, et de **1,15 mg** celle du phénol avec l'acétate d'éthyle comme solvant.

Les meilleurs résultats en terme de quantité d'extraction de l'AG à partir les margines est de **1,1 mg** avec le méthanol comme solvant d'extraction, et de **1,348 mg** celle du phénol avec le méthanol comme solvant.

Donc ces résultats confirment que les rejets d'huileries contiennent différents composés phénoliques importantes qui peuvent être valorisé. Donc l'analyse par HPLC reste la méthode la plus appropriée pour la détection et la quantification de chaque composé phénolique qui permet d'obtenir des bons résultats.

### **Perspectives :**

Nous proposons également de tester plusieurs étalons, pour déterminer toutes les molécules polyphénoliques contenus dans les sous produits oléicoles, puis la quantification de toutes ces molécules.

*« Références bibliographiques »*



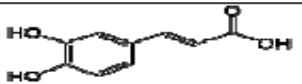
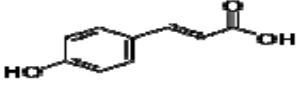
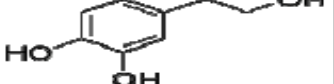
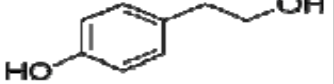
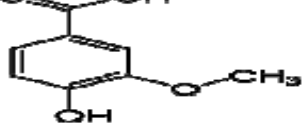
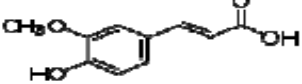
- [1]. International Olive Oil Council. Site web: <http://www.internationaloliveoil.org/>.
- [2]. **Djadoun S. (2012).** « *influence de l'hexane acidifié sur l'extraction de l'huile de grignons d'olive assistée par micro-ondes* ». Thèse doctorat. Université de Mammeri, Tizi-Ouzou.
- [3]. **Visioli F, Romani A, Mulinacci N, Zarini S, Conte D, Vincieri F et Galli C., (1999).** « *Antioxidants and other biological activities of olive mill waste waters* ». Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, pp 3397-3401.
- [4]. **Mulinacci N, Romani A, Galardi C, Pinelli P, Giaccherini C et Vincieri., (2001),** «*Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples*». Journal of Agricultural Food and Chemistry, 49, pp 3509-3514.
- [5]. **Hamdi M, Garcia J.L et Ellouz R., (1991).** Integrated biological process for olive wastewaters treatment. Bioprocess. Eng., 8, 79.
- [6]. **Benyahia N, Zein K., (2003),** *analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées*. Contribution spéciale de « Sustainable Business Associates » à l'atelier «Pollution and Development issues in the Mediterranean Basin», 2<sup>ème</sup> Conférence Internationale « Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries » (SESEC II) Lausanne, Suisse.
- [7]. **Nefzaoui A., (1991).** *Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits*, option méditerranéennes série séminaire N°16, pp 101-108, Ecole Supérieure d'horticulture Sousse, Tunisie,
- [8]. **Trigui A., (2008)** « *Etude en vue de l'élaboration d'un plan d'action pour l'utilisation énergétique des sous-produits de l'oliveraie tunisienne* ». Projet 00058134.
- [9]. **Sansoucy R., (1991).** Problèmes généraux de l'utilisation des sous-produits agroindustriels en alimentation animale dans la région méditerranéenne.
- [10]. (Centre d'activités régionales pour la production propre), Catalogue, prévention de la pollution dans la production de l'huile d'olive, plan d'action pour la méditerranée, (2000).
- [11]. **Nefzaoui A., (1987).** *Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits*, OLIVAE IV Tunisie.
- [12]. **Trigui A., (2008).** PNUD-Tunisie/ANME, « *Etude en vue de l'élaboration d'un plan d'action pour l'utilisation énergétique des sous-produits de l'oliveraie tunisienne* », Projet 00058135.
- [13]. **Chouchene A., (2010)** « *Etude expérimentale et théorique de procédés de valorisation de sous-produits oléicoles par voies thermique et physico-chimique* », thèse doctorat, L'UNIVERSITE DE HAUTE-ALSACE, pp 15.
- [14]. **J, Rivas. F, Beltran. B, Acedo. O, Gimeno., (2000).** Two step waste water treatment: Sequential ozonation –Aerobic biodegradation. Ozone Science and Engineering, 22, pp 617-636.
- [15]. **Vercauteren J, Cheze C, Triaud J., (1998).** Polyphenols. 18<sup>th</sup> international conference on polyphenols, N°87. Ed. IRNA.
- [16]. **Francesco GL., (1993).** *Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie*. Olivae. 74, pp 15-20.
- [17]. **Fiorentino A, Gentili A, Isidori M, Monaco P, Nardelli A, Parrella A, Temussi F., (2003).** Environmental effects caused by olive mill Waste waters : toxicity comparison of lowmolecular-weight phenol Components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 : pp 1005-1009.
- [18]. **Achat S., (2013)** « *Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et*

*interactions avec des ions métalliques* », thèse doctorat, UNIVERSITE A. MIRA-BEJAIA.




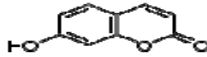

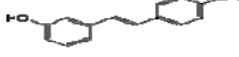
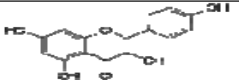
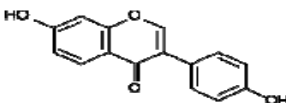
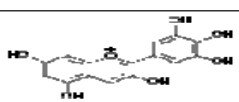

- [19]. **Mecheix J.J, Fleuriet A et Jay-Allemand C. (2005).** *Les composés phénoliques des végétaux* (Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique). Edition technique et documentation, Lavoisier.
- [20]. **Ribereau- Gayon P. (1968).** *Les composés phénoliques des végétaux*. Edition Dumond, Paris.
- [21]. **Harbone J B., (1989),** general procedures and measurement of total phenolic. In Harbone J B plant phenolic, Academic press, Landers, pp 1-28.
- [22]. **Belaid C, Kallel M, et Elleuch B., (2002).** *Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive (margines)*. Déchets sciences & technique, 27, pp 30-34.
- [23]. **Ross R., (1999).** Atherosclerosis, an inflammatory disease. New England Journal of Medicine. 340 (2), pp 115-126.
- [24]. **Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P & Ghadirian P., (2003).** Assessment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: a case-control study. International Journal of Epidemiology. 32 (2) pp 200- 209.
- [25]. **Kratz M, Cullen P, Kannenberg F, Kassner A, Fobker M, Abuja PM, Assmann G et Wahrburg U., (2002).** Effect of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low density lipoprotein. European Journal of Clinical Nutrition. 56 (1), pp 72-81.
- [26]. **Rotondo S et De Gaetano G., (2000).** Protection from cardiovascular disease by wine and its derived products. Epidemiological evidence and biological mechanisms. World Review of Nutrition and Dietetics. 87, pp 90-113
- [27]. **Viera O, Laranjinha J, Madeira V et Almeida L., (1998).** Cholesteryl ester hydroperoxyde formation in myoglobin-catalysed low density lipoprotein oxidation: concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate. Biochemical Pharmacology. 55 (3), pp 333-340
- [28]. **Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C., (2005).** *Les composés phénoliques des végétaux* (Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique). Edition technique et documentation, Lavoisier.
- [29]. **Lakhtar H., (2009).** *Culture du Lentinula edodes (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines*, thèse doctorat, université paul cézanne, aix marseille III. pp 13
- [30]. <http://www.food-info.net/fr/products/olive/olive05.htm>
- [31]. **Ghazi A., (2014),** « *Essai de synthèse d'un conjugué acide gallique-inuline et étude in vitro de leurs activités anti-oxydante et prébiotique* », thèse magister, UNIVERSITE Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. pp-19-20.
- [32]. **Pichard P., (2005).** Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: phénol. INERIS
- [33] **Jargot D, Lafon D, Bonnard N, Brondeau M.-T, Schneider O et Miraval S., (2006).** Fiche toxicologique. INRS.
- [34] **Srisuwan G., (1988)** « *Extraction solide-liquide en colonne puisée à disque et couronnes : Modélisation et application au cas des tanins* ». Thèse doctorat. INP, Toulouse.
- [35] **Rouessac F, Rouessac A., (1992).** Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes -Ed Masson.

« *Annexes* »

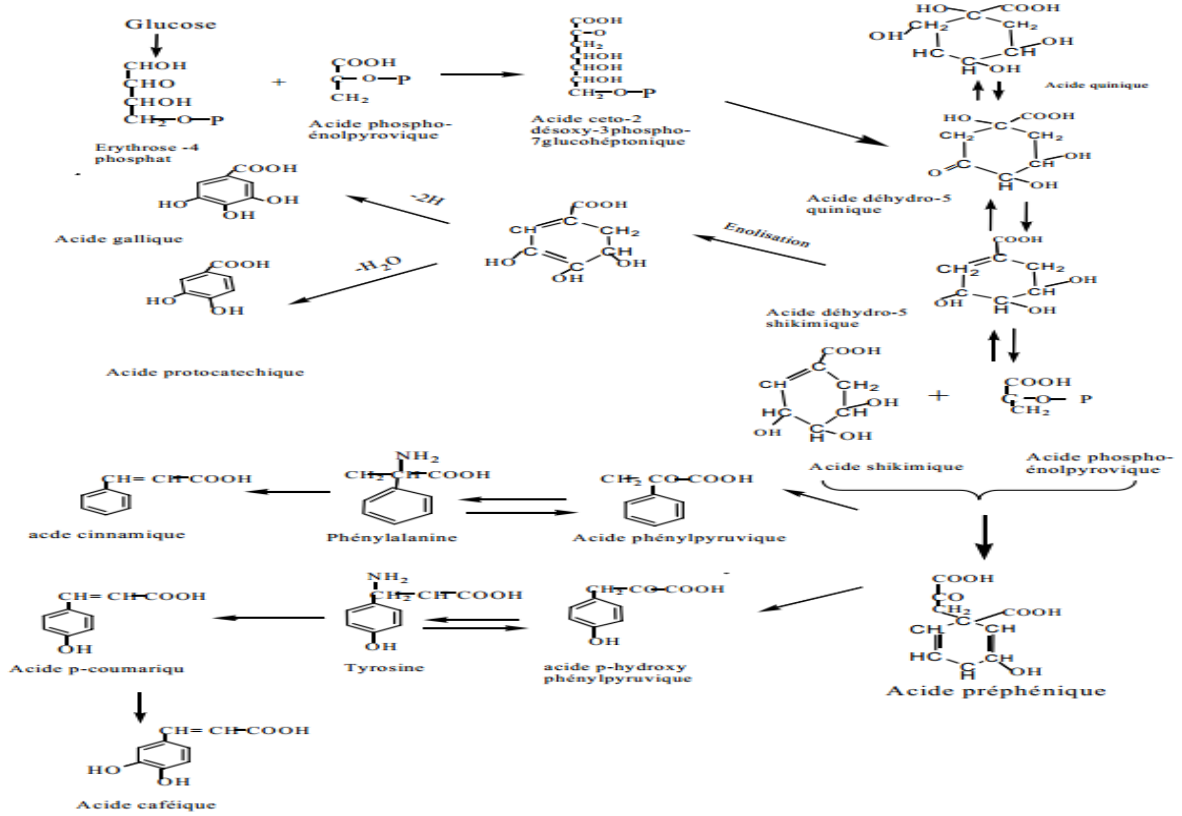
## Annexe 01 : Les principaux polyphénols des rejets d'huileries. [29]

Composés phénoliques	structure	teneurs
Acide caféique (Mm.l <sup>-1</sup> )		0.32 - 1.36
Acide p-coumarique (Mm.l <sup>-1</sup> )		0.19 - 0.57
Hydroxytyrosol (mg.l <sup>-1</sup> )		37.9 - 143.34
tyrosol (mg.l <sup>-1</sup> )		8.51 - 9.43
Acide vanillique (mg.l <sup>-1</sup> )		20
Acide ferrulique (mg.l <sup>-1</sup> )		95

## Annexe 02 : Structure et origine de quelques polyphénols [21].

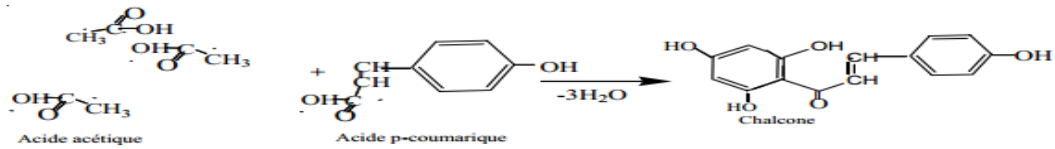
Classe	Exemple	Formule	Origine
Phénols simples	Hydroquinone		Busserole
Acides hydroxybenzoïques	acide p-hydroxybenzoïque		Epices, fraises
Acides hydroxycinnamiques	acide p-coumarique		Tomates, ail
Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
Naphtoquinones	Juglone		Noix
Stilbénoides	trans-resvératrol		Raisin
Flavonoïdes	Kaempférol		Fraises
Isoflavonoïdes	Daidzéine		Graines de soja
Anthocyanes	Delphinidol		Raisin Cabernet-Sauvignon
Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales

**Annexe 03 : Biosynthèse de composés phénoliques par voie d'acide Shikimique. [20]**

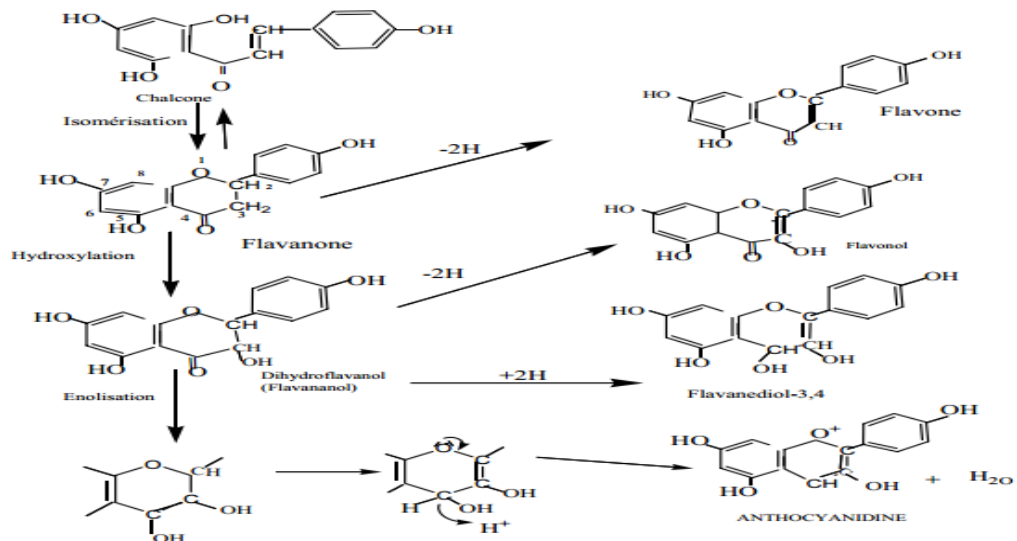


**Annexe 04 : [20]**

**1. Formation d'une chalcone à partir d'acide acétique et l'acide p-coumarique :**



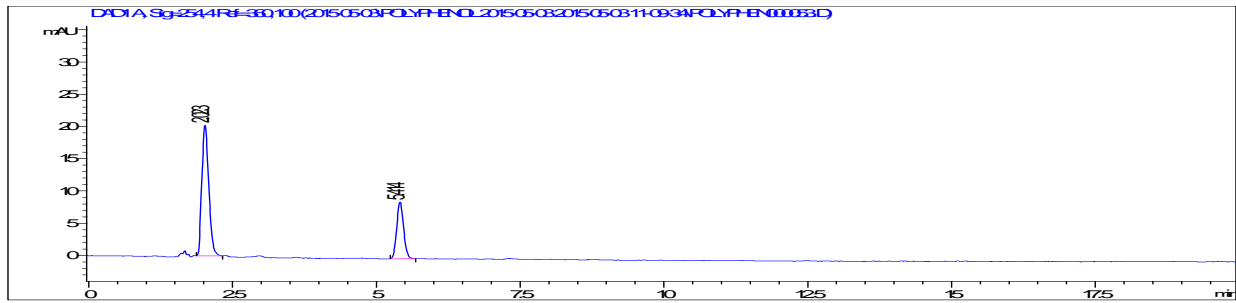
**2. Formation des différents flavonoïdes à partir des chalcones :**



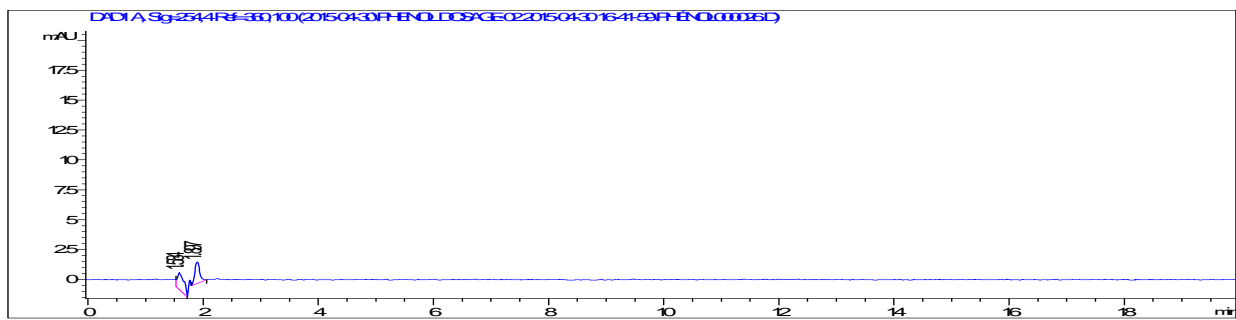
## Annexe 05 :

Quelques résultats des différentes analyses par HPLC pour les différents prélèvements de l'extraction par SOXLHET des grignons d'olive.

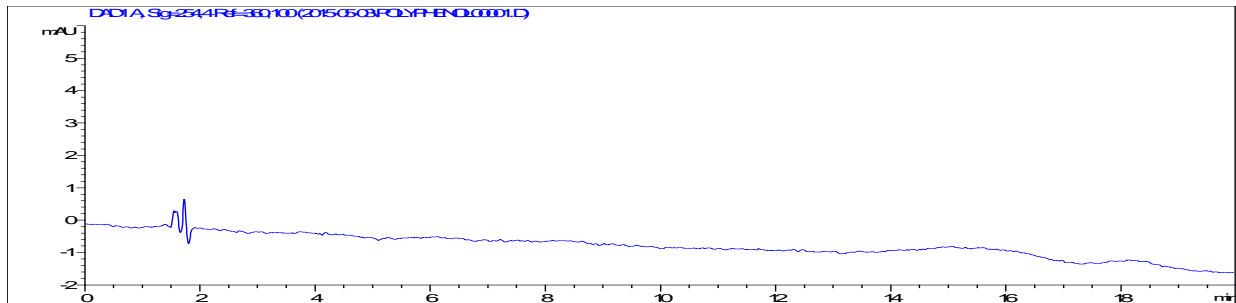
### BLANC Acétate :



### BLANC Ethanol :

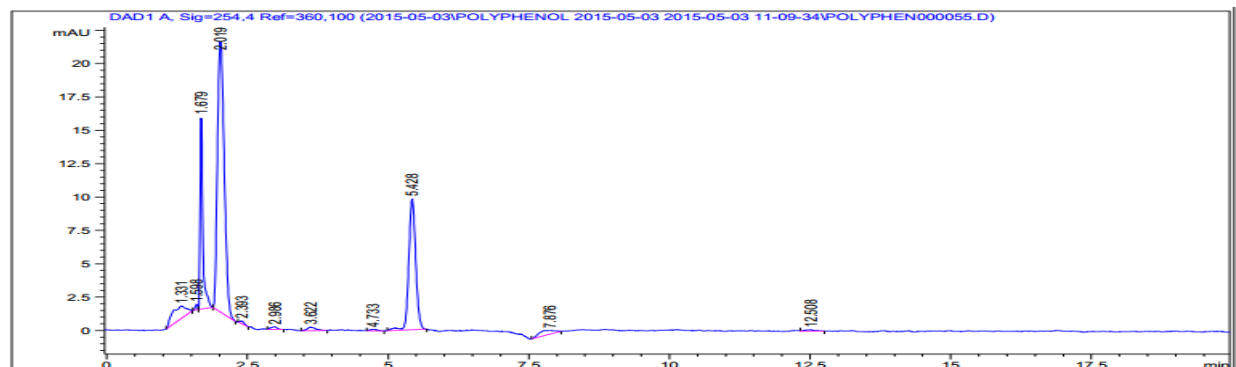


### BLANC Méthanol :

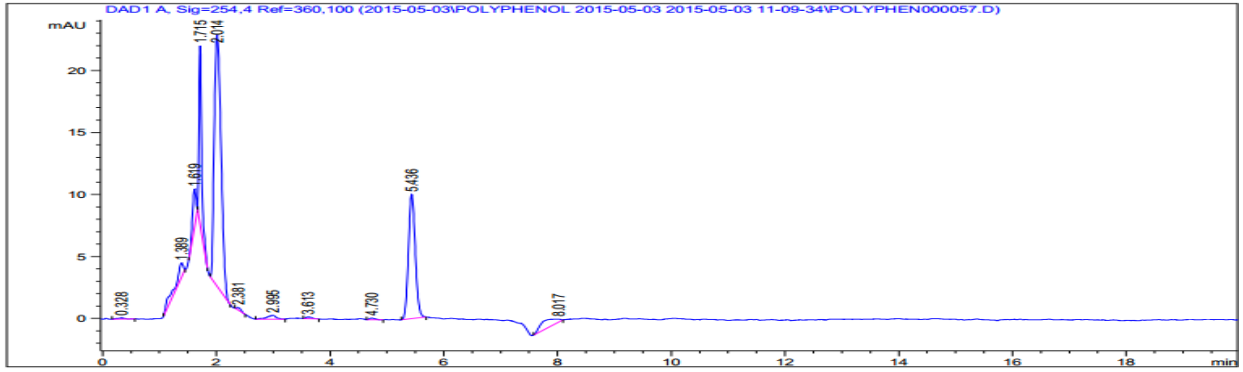


## 1. Les chromatogrammes des extraits dans l'Acétate d'Ethyle :

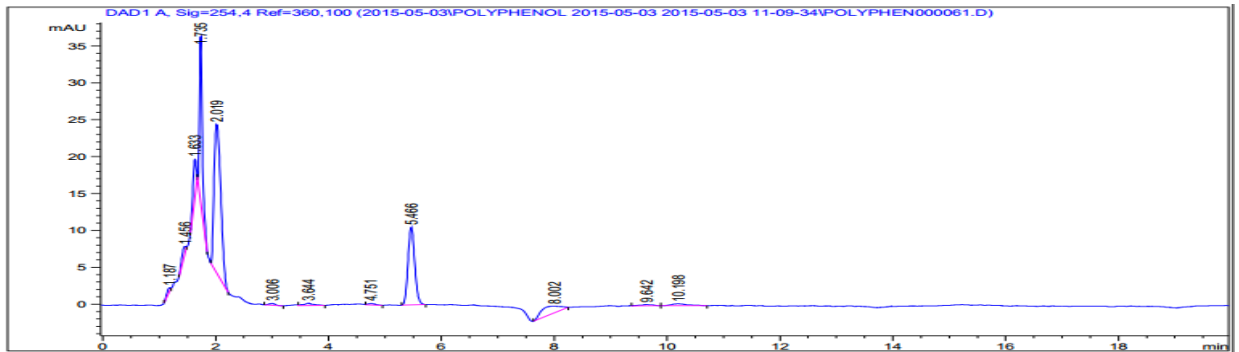
Echantillon 1 : t = 27 min



Echantillon 2 : t = 71 min.

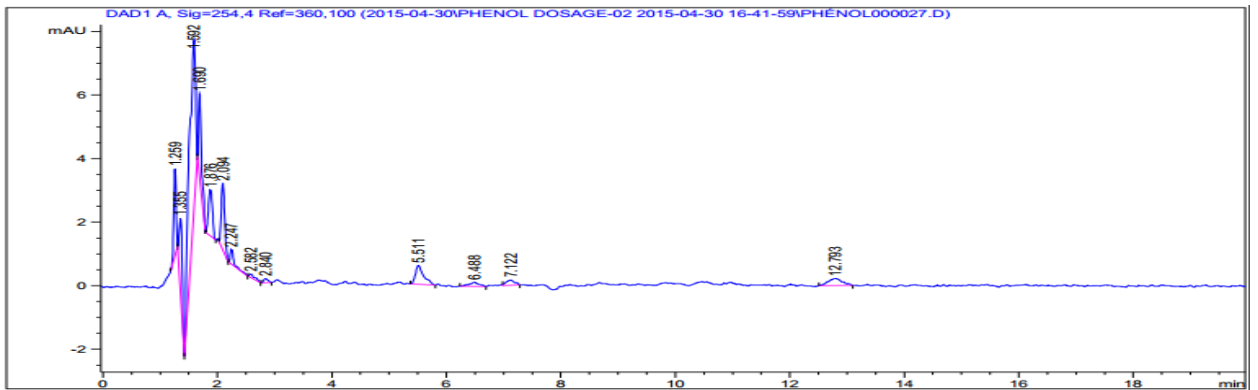


Echantillon 3 : t = 179 min.

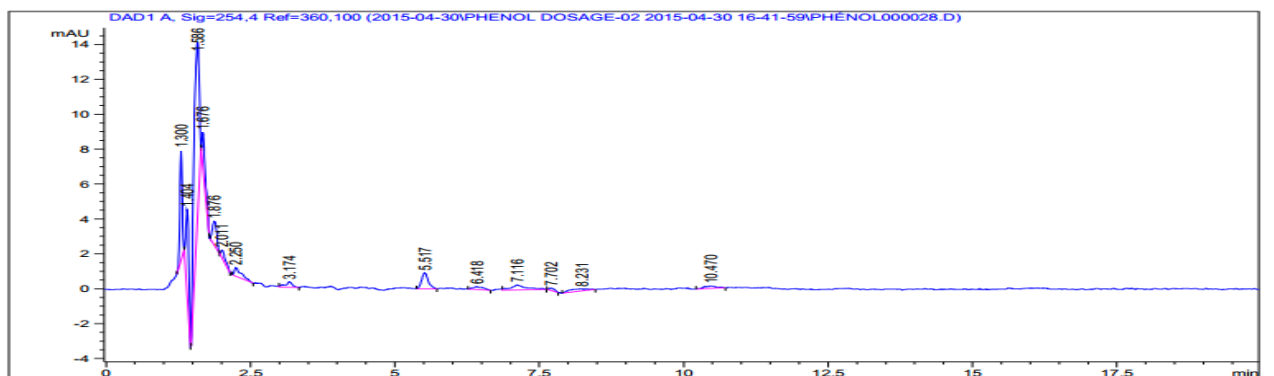


## 2. Les chromatogrammes des extraits dans l'Ethanol :

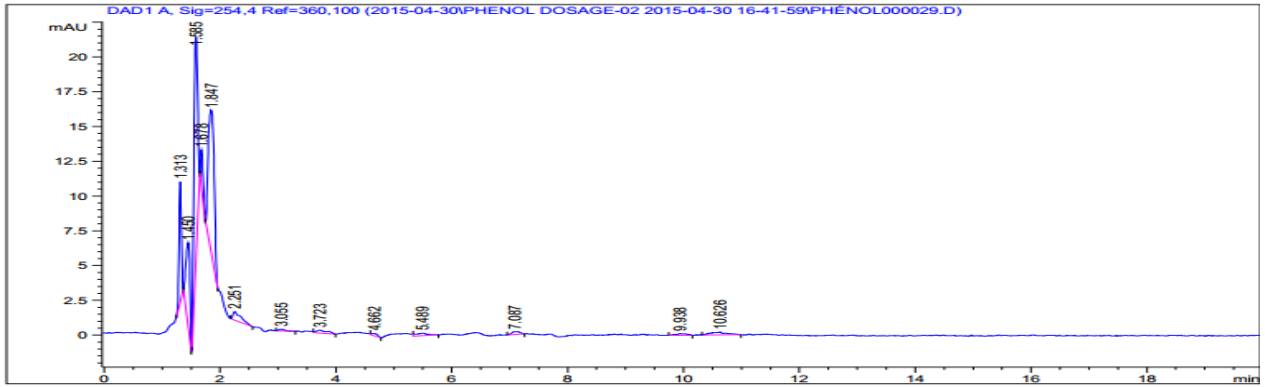
Echantillon 1 : t = 30 min.



Echantillon 2 : t = 86 min.

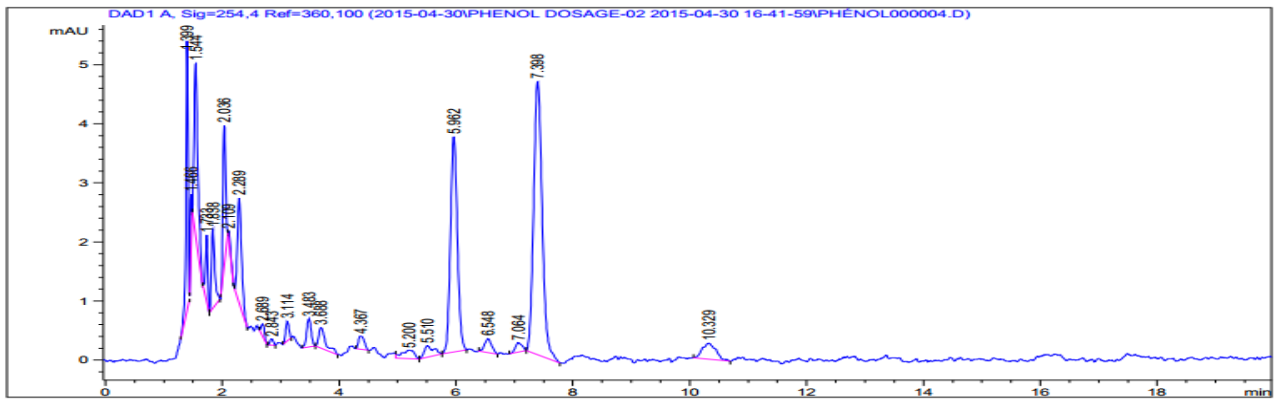


**Echantillon 3 : t = 164 min.**

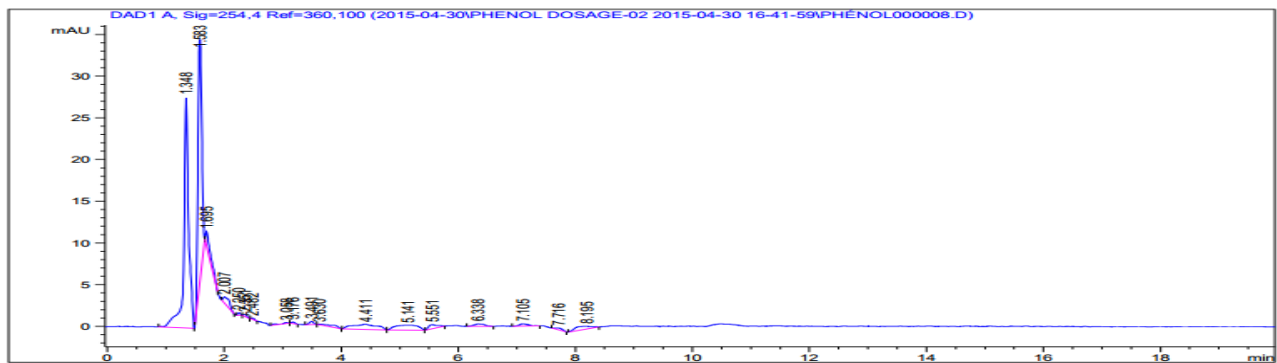


**3. Les chromatogrammes des extraits dans le Méthanol :**

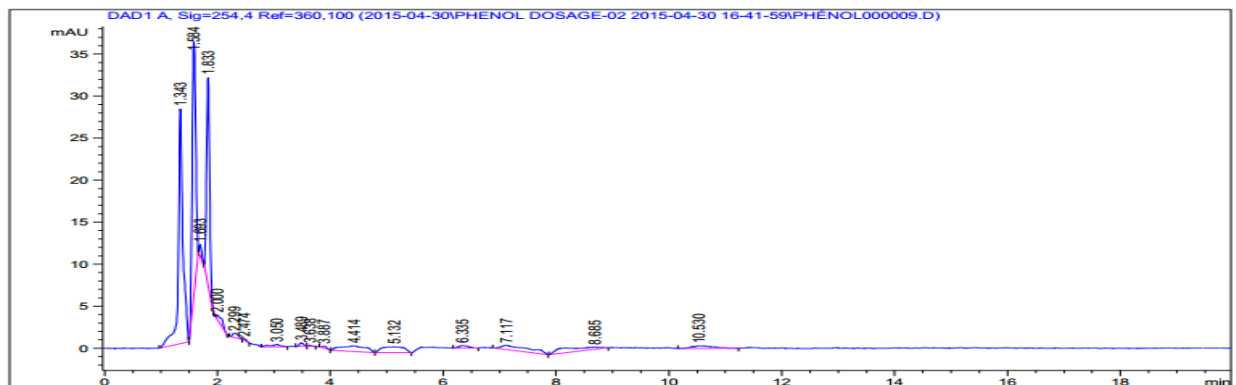
**Echantillon 1 : t = 35 min**



**Echantillon 2 : t = 88 min**



**Echantillon 3 : t = 183 min**



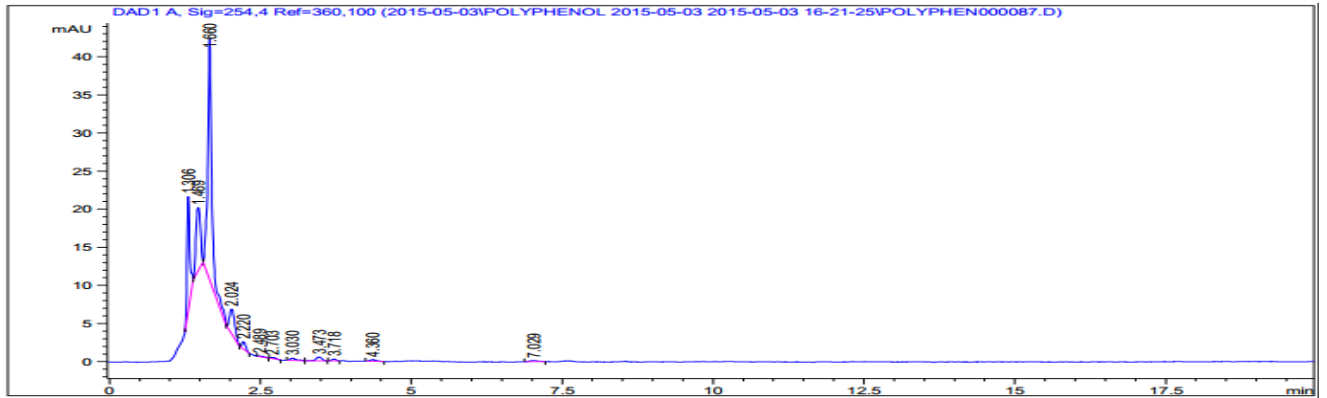


## Annexe 06 :

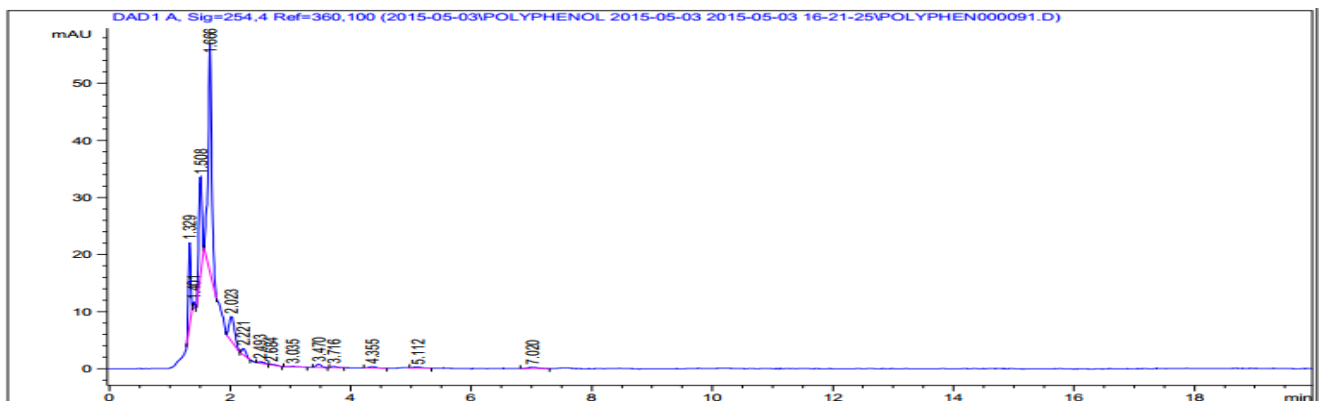
Quelques résultats des différentes analyses par HPLC pour les différents prélèvements de l'extraction par DISTILLATION des margines.

### 1. Les chromatogrammes des extraits dans l'Ethanol :

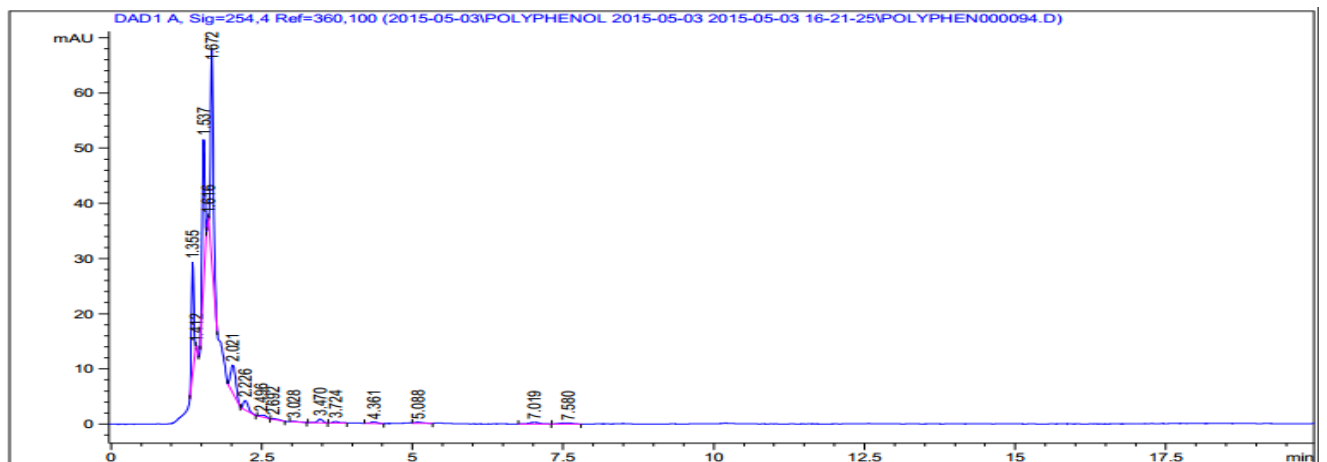
Echantillon 1 : t = 30 min



Echantillon 2 : t = 90 min

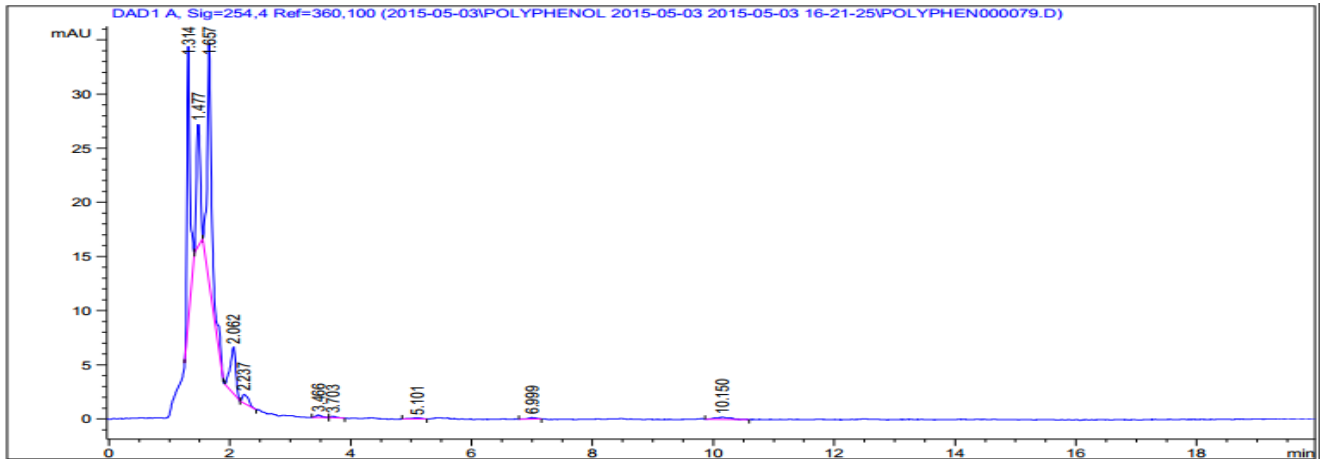


Echantillon 3 : t = 320 min

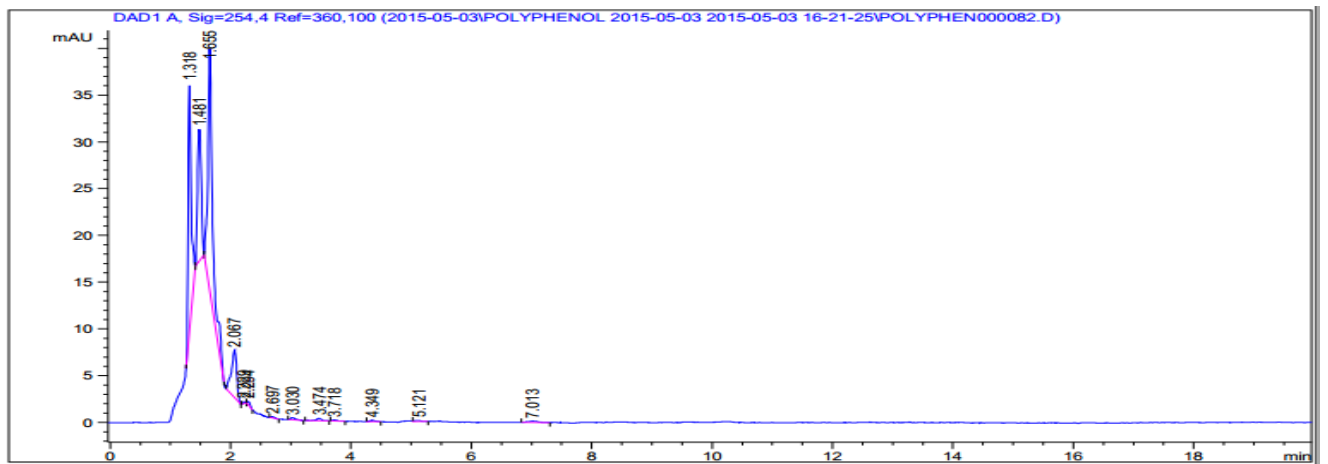


## 2. Les chromatogrammes des extraits dans le Méthanol :

### Echantillon 1 : t = 30 min



### Echantillon 2 : t = 90 min



### Echantillon 3 : t = 320 min

