

LAVALEF

Département : Génie Chimique

Laboratoire de Valorisation des Energies Fossiles

Mémoire de projet de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état en Génie Chimique

**Optimisation de l'extraction des antioxydants hydrosolubles
de feuilles d'olivier**

Linda AMAOUZ et Zoubir KAKACHI

Sous la direction de Mme. S. TOUAZI Maitre de conférences B

Présenté et soutenu publiquement le (19/06/2019)

Composition du Jury :

Président	M. E. H. BENYOUSSEF	Professeur	ENP
Promotrice	Mme S. TOUAZI	Maitre de conférences classe B	ENP
Examinateur	M. T. AHMED-ZAID	Professeur	ENP
Examinatrice	Mme Y. TCHOULAK	Maitre assistante classe A	ENP

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

École Nationale Polytechnique



LAVALEF

Département : Génie Chimique

Laboratoire de Valorisation des Energies Fossiles

Mémoire de projet de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état en Génie Chimique

**Optimisation de l'extraction des antioxydants hydrosolubles
de feuilles d'olivier**

Linda AMAOUZ et Zoubir KAKACHI

Sous la direction de Mme. S. TOUAZI Maitre de conférences B

Présenté et soutenu publiquement le (19/06/2019)

Composition du Jury :

Président	M. E. H. BENYOUSSEF	Professeur	ENP
Promotrice	Mme S. TOUAZI	Maitre de conférences classe B	ENP
Examinateur	M. T. AHMED-ZAID	Professeur	ENP
Examinatrice	Mme Y. TCHOULAK	Maitre assistante classe A	ENP

ENP 2019

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À ceux qui m'ont donné sans rien en retour, À ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles, Et ceux à qui je dois tant :

A ma très chère mère

À celle qui par mérite et par excellence, représente le symbole de la bonté, de la tendresse et du dévouement.

Celle qui par sa simple présence, a fait de mon existence un chemin jonché de fleurs, en dépit des épines. Celle qui par son incommensurable générosité et par son amour inconditionnel, donne sans modération et sans nulle attente de reconnaissance.

A mon très cher père

Mon éternel étoile polaire, mon modèle de persévérance et de résilience, qui grâce à lui, je ne me suis jamais sentie seule, égarée ou abandonnée !

Celui pour qui, tous les hommages et les remerciements du monde, ne suffiront guère à lui rendre son dû !

Toute ma gratitude et ma reconnaissance à tous les deux !

A mes frères et sœur

Ahcène, Youcef et Maya, ceux qui me donnent la force et le courage

A toute ma famille

Grandes-mères, tantes et oncles, cousins et cousines, et en particulier Myna, Merieme et Sarah.

A la mémoire de mes grands-pères

A mes chers (es) amis (es)

A toutes les mains qui m'ont été tendues.

Linda

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance...

A ma très chère mère : Goucem BELLAL KAKACHI

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour elle. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A mon très cher père : Mohamed KAKACHI

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquents sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

A mes grands-parents, et principalement ma grand-mère que j'ai perdue au cours de mon cursus universitaire

A ma sœur Lynda et à mon frère Nassim

A tous mes amis

Zoubir

Remerciements

Ce projet de fin d'étude a été réalisé au sein du Laboratoire de Valorisation des Energies Fossiles, département du Génie Chimique de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, sous la direction de Mme S. TOUAZI, Maitre de conférences classe B à l'Ecole Nationale Polytechnique.

"Après l'effort, le réconfort !" Partant de ce principe, la recherche qui a été menée pour réaliser ce modeste travail, nous a été utilitaire pour comprendre la valeur inestimable de la motivation, la nécessité de l'appui apporté par les formateurs et l'entourage et l'importance de la qualité de la formation dispensée. Et à plusieurs égards, nous tenons d'abord, à rendre grâce à Dieu, le tout puissant qui nous a été d'un grand secours pour surmonter les difficultés et avancer avec confiance et détermination.

Nos vifs remerciements vont vers toutes les illustres personnes citées ci-dessous, il va de soi.

Nous remercions donc, Mme S. TOUAZI, Maitre de conférences classe B à l'Ecole Nationale Polytechnique, de nous avoir encadré et dirigé tout au long de ce travail.

Nous tenons par ailleurs à remercier, Mr. E-H. BENYOUSSEF, Professeur à l'École Nationale Polytechnique, de nous avoir fait honneur d'accepter la présidence du jury.

Nous remercions également Mr. T. AHMED-ZAID, Professeur à l'École Nationale Polytechnique et Mme Y. TCHOULAK, Maitre assistante classe A à l'Ecole Nationale Polytechnique, d'avoir accepté d'examiner et juger notre travail.

Nous remercions Mme. F.Mohellebi, chef de département Génie Chimique, de nous avoir consacré de son temps et aidé à faire nos analyses par spectrophotométrie UV-visible.

Nous remercions très chaleureusement Mr. M. OULD-HAMOU, chef de Département Génie Minier, Melle A. MERCHICHI, responsable du laboratoire du Génie Minier et Melle H. BENAGROUBALA technicienne de ce laboratoire pour nous avoir bien reçu et nous avoir permis de réaliser nos analyses par spectrophotométrie UV-visible.

Nous tenons aussi à remercier notre ingénieure du département Génie Chimique Melle R. BENGHOULIS, pour toutes les facilitations qu'elle nous a accordées.

Nos plus sincères remerciements s'adressent également, à l'ensemble des enseignants du département du Génie Chimique pour leur dévouement, pour nous avoir conseillé, orienté et soutenu et surtout pour l'enseignement de qualité dont ils nous ont fait part durant ces trois dernières années.

Enfin, un hommage et une gratitude particuliers à nos parents et ami(e)s que nous remercions vivement, qui ont chapeauté en apothéose et qui ont mis de leur sien.

Quelques lignes ne pourront jamais exprimer la reconnaissance que nous éprouvons envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué, par leurs conseils et leurs encouragements.

Merci

استمثال استخراج المواد المضادة للأكسدة من اوراق شجرة الزيتون البرية

ملخص: هذا العمل يهدف إلى تحديد أبسط طريقة لتحسين ظروف استخلاص مضادات الأكسدة لشجرة الزيتون البرية و المتواجدة في منطقة الجرائر. لقد تم البحث عن القيم الحدية للمعايير الرئيسية لهذه العملية من خلال إستعمال برنامج بوكس بنكن.

تم تحديد المعايير المستعملة و المتمثلة في إجمالي محتوى البوليفينول، محتوى الفلافونويد و كذا قوة مضادات الأكسدة عن طريق اختبار فولان سيوكالتو، تراي كلوريد الألومنيوم و DPPH على التوالي. و تم الاستعانة بنموذج متعدد الحدود من الدرجة الثانية المتحصل عليه لوصف كل إستجابات النظام. و لقد اظهر التحليل الإحصائي أنها تصف بدقة سلوك النظام المدروس و تم كذلك تحديد شروط العمل بواسطة نماذج رياضية و في الأخير تم تمثيل هذه الأخيرة في مساحات الإجابة. الكلمات الدالة: شجرة الزيتون البرية، استخلاص، الاستمثال، البوليفينول، الفلافونويد، قوة مضادات الأكسدة.

Optimization of the extraction of water-soluble antioxidants from olive leaves

Abstract: The work presented in this thesis aims to define a simple method for optimizing the extraction conditions of antioxidants from olive leaves (*Olea Europaea Sylvestris*) from the Algiers region. The search for optimal values of the main parameters of this process is carried out by adopting a Box-Behnken design. The content of total polyphenols, the content of flavonoids and the antioxidant power of the extracts being the optimization criteria. The determination of these was made by Folin-Ciocalteu assay, $AlCl_3$ and DPPH free radical trapping respectively. A second-order polynomial model was used to describe each of the responses of the system. Statistical analysis of established models, using the MINITAB18 software, has shown that they correctly describe the behavior of the studied system. The optimal operating conditions were determined from the equations of the mathematical models and illustrated by the response surfaces.

Key words: *Olea Europaea Sylvestris*, optimization, extraction, total polyphenols, flavonoids, antioxidant activity.

Optimisation de l'extraction des antioxydants hydrosolubles de feuilles d'olivier

Résumé : Le travail présenté dans ce mémoire vise à définir une méthode simple pour l'optimisation des conditions d'extraction des antioxydants de feuilles d'olivier sauvage (*Olea Europaea Sylvestris*) provenant de la région d'Alger. La recherche des valeurs optimales des principaux paramètres de ce procédé, a été menée en adoptant un plan de Box-Behnken. La teneur en polyphénols totaux, la teneur en flavonoïdes et le pouvoir antioxydant des extraits étant les critères d'optimisation. La détermination de ces derniers a été effectuée par les méthodes de dosage de Folin-Ciocalteu, d' $AlCl_3$ et du piégeage du radical libre DPPH respectivement. Un modèle polynomial du second ordre a été utilisé pour décrire chacune des réponses du système. L'analyse statistique des modèles établis, menée à l'aide du logiciel MINITAB18, a montré qu'ils décrivent correctement le comportement du système étudié. Les conditions opératoires optimales ont été déterminées à partir des équations des modèles mathématiques et illustrées par les surfaces de réponse.

Mot clés : *Olea Europaea Sylvestris*, optimisation, extraction, polyphénols totaux, flavonoïdes, activité antioxydante.

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION	14
Chapitre 1: Revue Bibliographique	17
1.1. L'Olivier (<i>Olea europaea L</i>)	18
1.1.1. Historique	18
1.1.2. Classification botanique de l'Olivier	18
1.1.3. Composition chimique	19
1.1.4. Les voies de valorisation des feuilles d'olivier	21
1.2. Composés phénoliques	22
1.2.1. Généralités	22
1.2.2. Classification et structure phénolique	23
1.2.3. Propriétés thérapeutiques et biologiques des composés phénoliques	29
1.2.4. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier	31
1.3. Radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants	31
1.3.1. Les radicaux libres	31
1.3.2. Le stress oxydant	32
1.3.3. Les antioxydants	32
1.4. Extraction Solide - Liquide	37
1.4.1. Principe et mécanisme de l'extraction Solide - Liquide	37
1.4.2. Cinétique de l'extraction Solide - Liquide	37
1.4.3. Paramètres influençant l'extraction Solide - Liquide	37
1.4.4. Méthodes d'extraction Solide - Liquide	38
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	43
2.1. La matière végétale	44
2.1.1. Cueillette	44
2.1.2. Prétraitements	44
2.2. Extraction des composés désirés d'<i>Olea Europaea Sylvestris</i>	45
2.2.1. Choix du solvant	45
2.2.2. Dispositif expérimental de l'extraction en mode batch	45
2.2.3. Protocole expérimental	46
2.2.4. Produits chimiques utilisés	46
2.3. Dosage des composés phénoliques	46

2.3.1.	Dosage des polyphénols totaux	46
2.3.2.	Dosage des flavonoïdes	47
2.4.	Evaluation de l'activité antioxydante	48
2.5.	Plan d'expérience et modélisation mathématique	49
2.5.1.	Terminologie	50
2.5.2.	Coordonnées centrées réduites	53
2.5.3.	Notion de modèle mathématique	53
2.5.4.	Plans de Box-Behnken	53
2.5.5.	Tests de validité des modèles	55
2.5.6.	Logiciel MINITAB18	56
Chapitre 3 :	Résultats et Discussion	57
3.1.	Taux d'humidité	58
3.2.	Evaluation cinétique de l'extraction des composés hydrosolubles de feuilles d'<i>Olea europaea sylvestris</i>	58
3.2.1.	Cinétique d'extraction des antioxydants	58
3.2.2.	Mise en œuvre de la cinétique d'extraction	60
3.3.	Elaboration du plan d'expérience pour l'extraction des composés hydrosolubles de feuilles d'<i>Olea Europaea Sylvestris</i>	62
3.3.1.	Choix des paramètres et des critères d'optimisation	62
3.3.2.	Choix du plan d'expérience et du modèle mathématique	63
3.3.3.	Domaine d'étude	63
3.4.	Modélisation	63
3.4.1.	Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire	63
3.4.2.	Modélisation de la teneur en polyphénols totaux	65
3.4.3.	Modélisation de la teneur en flavonoïdes	66
3.5.	Validation des modèles mathématiques	67
3.5.1.	Test de Fisher	67
3.5.2.	Valeur-p pour la validation des coefficients	67
3.5.3.	Diagrammes de Pareto	68
3.6.	Optimisation	70
3.6.1.	Diagrammes des effets directs	70
3.6.2.	Surfaces de réponse	72
3.6.3.	Diagrammes de contour	74
CONCLUSION GENERALE		76
BIBLIOGRAPHIE		79

WEBOGRAPHIE

91

ANNEXE

Tableau 1-1 : Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimée en g par 100 g) selon plusieurs auteurs.	20
Tableau 1-2 : Composition en acides aminés des feuilles d'olivier fraîches (exprimée en g par Kg d'azote total).....	20
Tableau 1-3 : Composition en minéraux des feuilles d'olivier (exprimée en g par Kg de matière sèche).....	21
Tableau 1-4 : Revue bibliographique sur les utilisations des feuilles d'olivier.	22
Tableau 2-1 : Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs.	54
Tableau 3-1 : Taux d'humidité de feuilles d' <i>Olea europaea sylvestris</i>	58
Tableau 3-2 : Le pourcentage d'inhibition, la Teneur en polyphénols totaux (PT) et en flavonoïdes en fonction du temps.....	60
Tableau 3-3 : Niveaux inférieurs, central et supérieurs des paramètres à optimiser.	63
Tableau 3-4 : Valeurs des IC ₅₀ et des IAA des extraits de feuilles d' <i>Olea Europaea Sylvestris</i>	64
Tableau 3-5 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits de feuilles d' <i>Olea europaea sylvestris</i>	65
Tableau 3-6 : Teneur en flavonoïdes dans les extraits de feuilles d' <i>Olea europaea sylvestris</i>	66
Tableau 3-7 : Résultats du test de Fisher pour la modélisation des IAA, des composés polyphénols totaux et des flavonoïdes.	67
Tableau 3-8 : Coefficients du modèle et leurs valeur-p pour les IAA, les composés polyphénols totaux et les flavonoïdes.	67

Figure 1-1 : Les feuilles et les fleurs d'olivier	19
Figure 1-2 : Classification des polyphénols.	23
Figure 1-3 : Structure de base des flavonoïdes.	23
Figure 1-4 : Exemples des structures chimiques des flavonols.....	24
Figure 1-5 : Exemples des structures chimiques des flavones.....	24
Figure 1-6 : Exemples des structures chimiques des flavanones.....	25
Figure 1-7 : Exemples des structures chimiques des flavan-3-ols.....	25
Figure 1-8 : Exemples des structures chimiques des isoflavones.....	26
Figure 1-9 : Exemples des structures chimiques des anthocyanes.....	26
Figure 1-10 : Structure de l'acide gallique (A) et de l'acide ellagique (B)	27
Figure 1-11 : Exemple de structure d'un tanin condensé	27
Figure 1-12 : Structure de l'acide cinnamique(A) et de l'acide benzoïque (B).....	27
Figure 1-13 : Exemples d'acide hydroxycinnamique.....	28
Figure 1-14 : Exemples des structures chimiques des coumarines.....	28
Figure 1-15 : Exemples des structures chimiques des stilbènes.....	29
Figure 1-16 : Effets biologiques des polyphénols.....	29
Figure 1-17 : Différentes classes d'antioxydants	33
Figure 1-18 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques	33
Figure 1-19 : Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre).....	36
Figure 1-20 : Diphenylpicrylhydrazyl (réduit).....	36
Figure 1-21 : Évolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide.....	40
Figure 2-1 : Schéma du dispositif expérimental utilisé lors de l'extraction Solide - Liquide.....	45
Figure 2-2 : Réduction du radical DPPH.....	48
Figure 2-3 : Domaine du facteur.....	50
Figure 2-4 : Espace expérimental.....	51
Figure 2-5 : Domaine d'étude d'un plan 2^2	51
Figure 2-6 : Domaine d'étude d'un plan 2^3	52
Figure 2-7 : Surface de réponse pour un plan à trois facteurs.....	52
Figure 2-8 : Représentation graphique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs.....	54
Figure 3-1 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du DPPH.....	58
Figure 3-2 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique.....	59
Figure 3-3 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en quercétine.....	59
Figure 3-4 : Cinétique d'extraction des antioxydants de feuilles d' <i>Olea Europaea Sylvestris</i>	60
Figure 3-5 : Courbe cinétique d'extraction des polyphénols totaux de feuilles d' <i>Olea Europaea Sylvestris</i>	61
Figure 3-6 : Courbe cinétique d'extraction des flavonoïdes de feuilles d' <i>Olea Europaea Sylvestris</i>	62
Figure 3-7 : Diagramme de Pareto des effets normalisés pour la modélisation des IAA.....	69
Figure 3-8 : Diagramme de Pareto des effets normalisés pour la modélisation de l'extraction des polyphénols totaux.....	69

Figure 3-9 : Diagramme de Pareto des effets normalisés pour la modélisation de l'extraction des flavonoïdes. 70

Figure 3-10: Graphique des effets directs de l'IAA. 70

Figure 3-11: Graphique des effets directs pour la teneur en polyphénols totaux. 71

Figure 3-12: Graphique des effets directs pour la teneur en flavonoïdes. 71

Figure 3-13: Surfaces de réponse des différents facteurs pour l'IAA. 72

Figure 3-14: Surfaces de réponse des différents facteurs pour la teneur en polyphénols totaux. 73

Figure 3-15: Surfaces de réponse des différents facteurs pour la teneur en flavonoïdes. 73

Figure 3-16: Diagrammes de contour pour l'activité antiradicalaire. 74

Figure 3-17: Diagrammes de contour pour la teneur en polyphénols totaux. 75

Figure 3-18: Diagrammes de contour pour la teneur en flavonoïdes. 75

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
AGPI :	Acides gras polyinsaturés.
AlCl₃ :	Trichlorure d'aluminium.
Ca :	Calcium.
Cu :	Cuivre.
DE :	Domaine d'Etude.
DPPH:	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
Fe:	Fer.
FRAP:	Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter.
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène.
H₃PMO₁₂O₄₀ :	Acides phosphomolybdiques.
H₃PW₁₂O₄₀ :	Acide phosphotungstique.
I :	Pourcentage d'inhibition.
IAA :	L'indice d'activité antiradicalaire.
IC₅₀ :	Concentration inhibitrice médiane.
K :	Potassium.
Mg :	Manganèse.
Mn :	Magnésium.
Na₂CO₃:	Carbonate de sodium.
NO· :	Monoxyde d'azote.
NO:	Oxyde d'azote.
NO₂:	Dioxyde d'azote.
O₂⁻:	Anion superoxyde.
OH:	Hydroxyles.
ONOOH:	Nitroperoxyde.
ORAC:	Oxygen Radical Absorbance Capacity.
·OH:	Radical hydroxyle.
P:	Phosphore.
RO· :	Radical alkoxyle.

Liste des abréviations et nomenclatures

ROO· :	Radical peroxy.
PT :	Polyphénols totaux.
TF :	Teneur en flavonoïde
TEAC:	Trolox equivalence antioxidant capacity.
UV :	Ultraviolet.
UV-Vis :	Ultraviolet/Visible.
VCR :	Variables centrées réduites.
Zn :	Zinc.

INTRODUCTION GENERALE

Pendant des milliers d'années, les plantes ont été utilisées non seulement pour aromatiser les aliments, mais aussi en tant que médicaments. Elles ont été reconnues comme une source précieuse de composés antioxydants, y compris les substances phénoliques (Roberta et Benvenuto, 2014). Ces derniers sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, telles que les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Elles sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres (Dugas et al., 2000).

Au cours des dernières années, des études sur les activités antioxydantes des plantes ont vu le jour. Parmi ces plantes : l'*Olea Europaea* L. Cet arbre couvrant une superficie de 9 500 000 hectares dans le monde (Verdier, 2003) est une espèce largement cultivée dans le bassin méditerranéen. Ce dernier, reste une zone privilégiée par rapport au reste du monde, grâce à son climat adéquat, tant au niveau de la température, qu'au niveau de l'hydrométrie (Ghedira, 2008).

L'utilisation la plus connue de l'olivier, est sans nul doute, la production de l'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles. En effet, Certains composés phénoliques extraits à partir de ces dernières par diverses méthodes, tels que l'extraction Solide - Liquide traditionnelle ou assistée par ultrasons ou bien par solvant pressurisés, ont fait l'objet de plusieurs recherches scientifiques, afin de déterminer leurs effets biologiques qui les rendent très utiles dans divers domaines. Cet arbre est considéré donc, comme étant une plante aromatique et médicinale ; réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques et dénués de tout effet adverse.

Jusqu'à présent, ces travaux de recherches effectués sont focalisés sur l'olivier cultivé, par contre, peu d'études ont été réalisées sur l'olivier sauvage, particulièrement en Algérie. De ce fait, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antioxydante des feuilles d'olivier de ce dernier, avec l'objectif d'optimiser l'extraction des antioxydants, des composés phénoliques ainsi que des composés flavonoïdes de cette espèce végétale. La recherche des valeurs optimales des trois principaux paramètres du procédé d'extraction Solide - Liquide, en l'occurrence, la température, l'hydromodule et la durée d'extraction, est menée par planification des expériences, les critères d'optimisation étant la teneur en polyphénols totaux, la teneur en flavonoïdes et le pouvoir antioxydant des extraits.

Ce présent travail s'articule autour de trois chapitres :

- Le premier chapitre de ce mémoire est une étude bibliographique relative à la matière végétale, objet de cette étude, aux antioxydants et aux composés phénoliques et flavonoïques ainsi qu'au procédé d'extraction Solide - Liquide.
- Le second chapitre porte sur la préparation de la matière végétale, préalable à l'extraction de ces composés antioxydants, l'installation d'extraction, la démarche expérimentale adoptée, ainsi que les différentes méthodes d'analyse, les réactifs et les outils utilisés.

• Le troisième et dernier chapitre, regroupe les résultats des essais d'extraction, réalisés dans le cadre de l'optimisation par le plan Box-Benhken à trois niveaux. Les modèles mathématiques élaborés pour chacun des trois critères d'optimisation, leur validation statistique, à l'aide du logiciel MINITAB18, et les valeurs optimales des paramètres étudiés y sont également présentés.

CHAPITRE 1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. L'Olivier (*Olea europaea* L)

1.1.1. Historique

L'olivier fait partie intégrante de l'histoire et on le retrouve au fil des siècles à travers différents mythes et croyances. De tout temps cet arbre a été associé à des vertus telles que la sagesse, la paix, la victoire, la richesse et la fidélité. (Besnard et Berville, 2005). Les premiers vainqueurs des jeux olympiques se voyaient remettre des rameaux d'olivier et des jarres d'huile d'olive en récompense de leurs performances.

L'origine de l'olivier se trouve précisément dans les pays en bordure du berceau méditerranéen (Miner, 1995), l'hypothèse de De Candolle est la plus fréquemment retenue ; elle désigne la Syrie et l'Iran comme les premiers foyers de *Olea europaea* L. L'expansion de sa culture est faite de l'Est vers l'Ouest de la méditerranée grâce aux Grecs et aux Romains, durant leur conquêtes (Loussert et Brousse, 1978 ; Breton et al., 2006).

En Algérie, la culture de l'olivier remonte à la plus haute antiquité. Nos paysans s'y consacraient avec art durant plusieurs siècles (Alloum, 1974). Ses produits constituaient l'une des bases essentielles des activités économiques de nos populations rurales. L'huile d'olive faisait l'objet d'un commerce intense entre l'Algérie et Rome, durant l'époque romaine. Et depuis, son histoire se confond avec l'histoire de l'Algérie et les différentes invasions qui ont eu un impact sur la répartition géographique de l'olivier dont nous avons hérité à l'indépendance du pays (Mendil et Sebai, 2006).

1.1.2. Classification botanique de l'Olivier

L'olivier fait partie de la famille des *oléacées*, du latin « *Olea* » (Wagner, 1999).

Selon Bruneton (1999), l'olivier est un arbre typiquement méditerranéen de 6 à 8 mètres de hauteur, il est toujours verts (sempervirents), ses feuilles sont blanches argentées à la face inférieure, vertes grisâtre à la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces, lancéolées. Son tronc est tortueux à écorce grisâtre crevassée. Ses fleurs s'épanouissent en petites grappes blanches figure 1-1, chaque grappe donnera un seul fruit. Son fruit ovoïde (drupe) a un noyau fusiforme.

D'après Pagnol (1975), l'olivier présente la classification suivante :

- Règne : *Plantae*
- Sous-règne : *Tracheobionta*
- Classe : *Dicotylédones (ou Thérébinthales)*
- Sous-classe : *Astéridées (ou Gamopétales)*
- Ordre : *Gentianales (ou Lingustrales)*
- Famille : *Oleacées*
- Genre : *Olea*
- Espèce : *europaea*



Figure 1-1 : Les feuilles et les fleurs d'olivier (Haddou, 2017).

L'espèce *Olea europaea L.* a été nommée par Linné en raison de son aire géographique, c'est l'unique espèce représentative du genre *Olea*. Ce dernier regroupe 30 espèces différentes, la plupart sont des arbustes ou des arbres, originaires des régions chaudes (Zohary, 1995).

On distingue deux sous-espèces *Olea europaea L.* en Afrique, l'olivier cultivé ou olivier commun (*Olea europaea sativa.*) et l'olivier sauvage ou oléastre (*Olea europaea sylvestris*) (Kohler, 1887).

Olea europaea L. var. sativa (var. communis) (Loussert et Brousse, 1978) ou olivier domestique est constitué par un grand nombre de variétés améliorées, ayant une diversité phénotypique importante (Ouazzani et al., 1995 ; Belaj et al., 2001) et qui donnent plus d'intérêt.

Olea oléaster (Beddiar et al., 2007) à laquelle appartiennent les oliviers sauvages et qui proviendraient de la dissémination spontanée, est un arbre très rameux et épineux à branches quadrangulaires et à feuilles très petites. Ses fruits sont petits et produisent peu d'huile (Beddiar et al., 2007).

1.1.3. Composition chimique

Des études récentes ont montré que les olives contiennent des antioxydants en abondance (jusqu'à 16g/kg), représentés par les actéosides, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et les acides phénylpropioniques ainsi que d'autres composés (Owen et al., 2004).

Quant aux feuilles fraîches d'olivier, elles sont caractérisées par une matière sèche aux alentours de 50%. Le tableau 1-1 met en évidence sa composition chimique globale selon différents auteurs qui varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations (Nefzaoui, 1995).

Elles sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tel que les tannins) et principalement par des polysaccharides (tel que les celluloses, hémicelluloses).

La teneur en protéine est faible dans les feuilles d'olivier. Le tableau 1-2 présente sa composition en acides aminés, dans sa diversité.

Les composés minéraux de ces feuilles sont présentés dans le tableau 1-3 ; le minéral le plus abondant est le fer, avec une concentration de 273 g/Kg de matière sèche.

Tableau 1-1 : Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimée en g par 100 g) selon plusieurs auteurs.

Composition (%)	Boudhriou a et al., 2009	Erbay et Icier, 2009	Martin-Garcia et al., 2006	Garcia-Gomez et al., 2003	Fegeros et al., 1995
Eau	46.2-49.4 a	49.8a	41.4 a	ND	44.0 a
Protéines	5.0-7.6 a	5.4 a	7.0 b	ND	ND
Lipides	1.0-1.3 a	6.5 a	3.2 b	6.2 b	ND
Minéraux	2.8-4.4 a	3.6 a	16.2 b	26.6 b	9.2 b
Carbohydrates	37.1-42.5 a	27.5 a	ND	ND	ND
Fibres brutes	ND	7.0 a	ND	ND	18.0 b
Cellulose	ND	ND	ND	19.3 b	11.4 b
Hémicellulose	ND	ND	ND	25.4 b	13.3 b
Lignine	ND	ND	ND	30.4 b	14.2 b
Polyphénols totaux	1.3-2.3 b	ND	2.5 b	ND	ND
Tannins solubles	ND	ND	ND	ND	0.3 b
Tannins condensés	ND	ND	0.8 b	ND	1.0 b

a : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse fraîches des feuilles d'olivier.

b : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier.

ND : valeur non déterminée.

Tableau 1-2 : Composition en acides aminés des feuilles d'olivier fraîches (exprimée en g par Kg d'azote total) (selon Martin-Garcia et Molina-Alcoide, 2008).

Acides aminés	Concentration (g/ Kg d'azote total)
Acide Asoartique	27,5
Acide Glutamique	35.1
Serine	44.5
Glycine	79.6
Histydine	25.4
Arginine	162.0
Threorine	46.8
Alanine	73.8
Proline	84.2
Tyrosine	32.3
Valine	74.8
Méthionine	5.3
Cystéine	1.6
Isoleucine	58.8
Leucine	104
Phénylalanine	51.8
Lysine	19.1
Acides aminés essentiels	547
Acides aminés non essentiels.	379
Acides aminés totaux (sans tryptophane).	926

Tableau 1-3 : Composition en minéraux des feuilles d'olivier (exprimée en g par Kg de matière sèche) (selon Fegeros et al., 1995).

Minéraux	Concentration (g/Kg de matière sèche)
Calcium (Ca)	12.7
Phosphore (P)	2.1
Manganèse (Mg)	1.9
Potassium (K)	6.3
Fer (Fe)	273.0
Cuivre (Cu)	10.7
Zinc (Zn)	21.3
Magnésium (Mn)	50.0

1.1.4. Les voies de valorisation des feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier, biomasse produite en grande quantité dans les pays méditerranéens, constituent une richesse dans divers domaines.

De nombreux travaux ont été réalisés pour essayer d'utiliser ce sous-produit en vue d'améliorer la rentabilité du secteur oléicole.

Historiquement, ces feuilles étaient totalement orientées vers l'alimentation animale. Toutefois, elles sont aussi utilisées en phytothérapie traditionnelle pour le traitement de certaines maladies entre autre la malaria et l'hypertension.

Dans le cadre de la phytothérapie moderne, des compléments alimentaires à base de feuilles d'olivier sont apparus sur le marché. Ces produits sont disponibles en feuilles sèches, en poudres, en extrait de gélules ou d'ampoules buvables.

Avec l'évolution de la technologie et l'amélioration des connaissances, les domaines d'utilisation des feuilles d'olivier ont été élargis et diversifié. Elles sont utilisées aussi pour l'extraction des composés d'intérêt tel que le mannitol, les stérols, les alcools gras, les composés phénoliques, principalement l'oleuropéine, les flavonoïdes et les composés triterpéniques.

Outre, les propriétés radio-protectrices et antiviellissement, qui caractérisent les feuilles d'olivier sont prédestinées à l'usage cosmétique. Dans ce domaine, comme ingrédient dans la formulation des produits cosmétiques et diététiques, entre autre ; les savons, les crèmes etc.

Les feuilles d'olivier ont également trouvé des applications dans l'industrie alimentaire. Elles sont principalement utilisées pour l'amélioration de la qualité et la conservation des aliments.

D'autres voies de valorisation des feuilles d'olivier, récemment démontrées, concernent le domaine de la dépollution, de la sidérurgie et de la synthèse biochimique. Le tableau 1-4 représente une revue bibliographique sur les différentes utilisations des feuilles d'olivier.

Tableau 1-4 : Revue bibliographique sur les utilisations des feuilles d'olivier.

Domaine	Applications	Références
Alimentation animale	Utilisation dans l'alimentation ovine ; Utilisation dans l'alimentation des chèvres ; Utilisation dans l'alimentation de la volaille pour améliorer la qualité de leurs viandes.	Fegeros et al., 1995. Yanez et al., 2004. Botsoglou et al., 2010 ; Govaris et al., 2010.
Thérapeutique	Consommation humaine d'infusion des feuilles d'olivier qui est bénéfique pour la santé	Giao et al., 2007.
Pharmaceutique	Extraction des composés phénoliques, notamment l'oleuropéine. Production d'hydroxytyrosol. Extraction des flavonoïdes.	Japan-Lujian et al., 2006. De Leonardis et al., 2008 ; Bouaziz et Sayadi, 2005 ; Briante et al., 2004 ; Briante et al., 2002. Yuhong et al., 2006.
Cosmétique	Utilisation dans la formulation des produits cosmétiques	Tadashi, 2006 ; Thomas et al., 2006 ; Akemi et al., 2001 (brevet).
Industrie Agro-Alimentaire	Stabilisation de l'huile de tournesol. Préparation de feuille d'olivier sèche en poudre pour faire une tisane	Farag et al., 2007. Uematsu, 2003.
Biochimie	Biosynthèse de nanoparticules d'or	Khalil et al., 2010
Sidérurgie	Inhibition de corrosion acide de l'acier.	El-Etre et al., 2007.

1.2. Composés phénoliques

1.2.1. Généralités

Les polyphénols sont caractérisés, comme leurs noms l'indiquent, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont le produit du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs et les feuilles de tous les végétaux (Boizot et Charpentier, 2006). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans ces derniers varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement.

Les composés phénoliques englobent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques. Ces molécules présentent toutes un point commun : la présence d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones (phénol) lui-même porteur d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH).

On distingue plusieurs familles de molécules dont : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines et stilbènes (Beta et al., 2005).

Depuis quelques années, ces composés phénoliques suscitent l'intérêt de plusieurs chercheurs à cause de leurs propriétés antioxydantes (Delattre et al, 2005).

1.2.2. Classification et structure phénolique

Les polyphénols peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbone comme l'indique la figure 1-2.

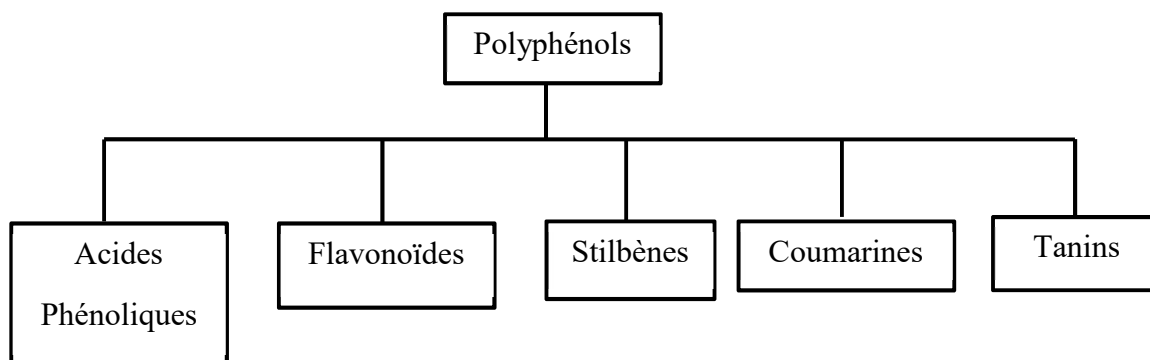


Figure 1-2 : Classification des polyphénols.

. Flavonoïdes C6-C3-C6

Les flavonoïdes, regroupés en 6000 composés naturels environ, sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005). Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (figure 1-3) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (Tapas et al., 2008).

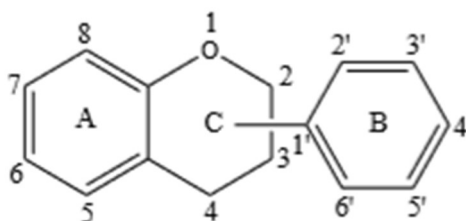


Figure 1-3 : Structure de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes (Sadasivam et Thayumanavan, 2003), ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.

a- Flavonols

Les flavonols sont parmi les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, elles sont essentiellement représentées par la quercétine, le kaempférol et l'isorhamnétine (figure 1-4). Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjuguée glycosylée (Fraga, 2009).

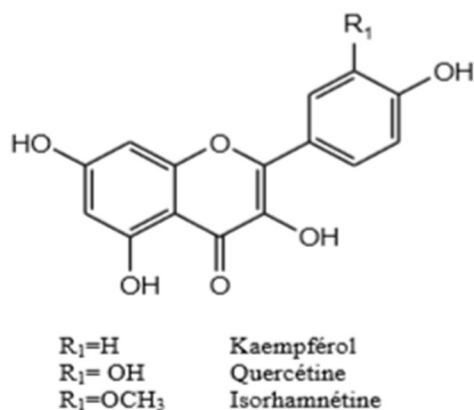


Figure 1-4 : Exemples des structures chimiques des flavonols.

b-Flavones

Les flavones (figure 1-5) sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent, leur apport alimentaire est très faible (Fraga, 2009).

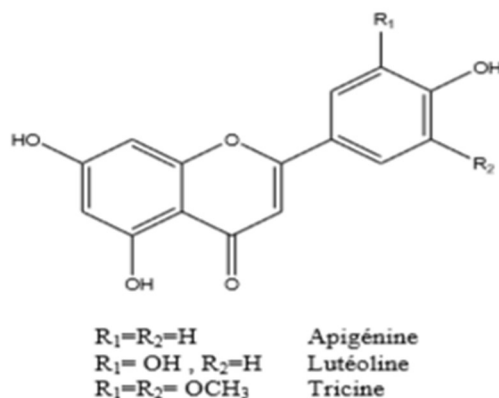


Figure 1-5 : Exemples des structures chimiques des flavones.

c-Flavanones

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en C2,C3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position C2 (figure 1-6), chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée (Portet, 2007).

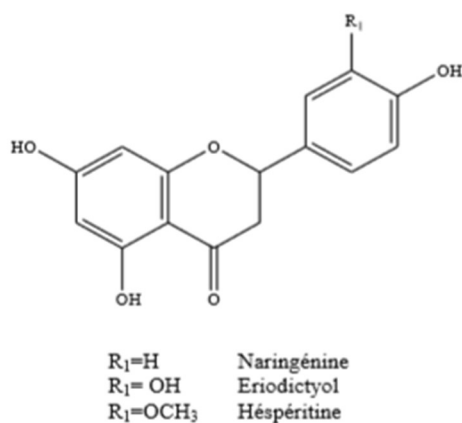


Figure 1-6 : Exemples des structures chimiques des flavanones.

La principale source des flavanones reste les agrumes qui sont caractérisés par l'accumulation des montants élevés dans ses composés. Ils incluent les oranges amères, les citrons, les pamplemousses, les mandarines, les clémentines et les oranges douces (Tomas-Barberan et al., 2000).

d-Flavan-3-ols ou flavanols

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4 (figure 1-7). Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondants dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins,... (Fraga, 2009).

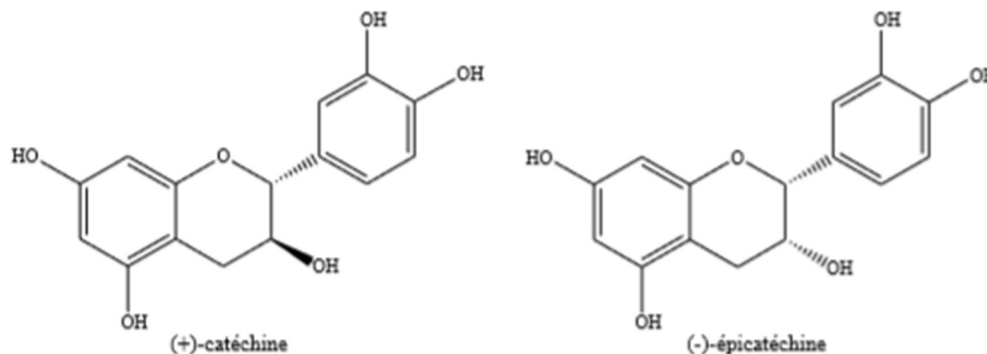


Figure 1-7 : Exemples des structures chimiques des flavan-3-ols.

e-Isoflavones

Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distincte des flavonoïdes (Bouheroum, 2007). Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt qu'à la position C2 (figure 1-8). Ces composés ont une distribution très limitée dans le règne végétal (Fraga, 2009).

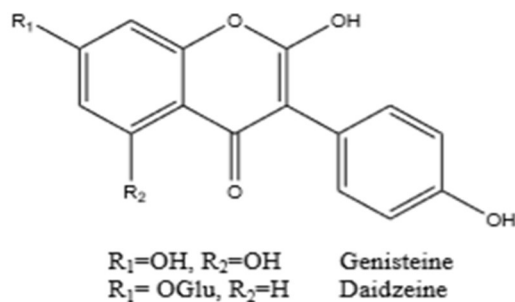


Figure 1-8 : Exemples des structures chimiques des isoflavones.

f-Anthocyanes

Les anthocyanes (en grec Anthos signifie fleur, et kyanos signifie bleu) sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces (Kong et al., 2003). Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylium (figure 1-9). Ils sont accumulés dans les vacuoles cellulaires (Kerio et al., 2012), ils sont responsables des couleurs rouges, violettes et bleues dans les fruits, les légumes, les fleurs et les graines et ils jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes et dans la dispersion des graines (Shipp et al., 2010).

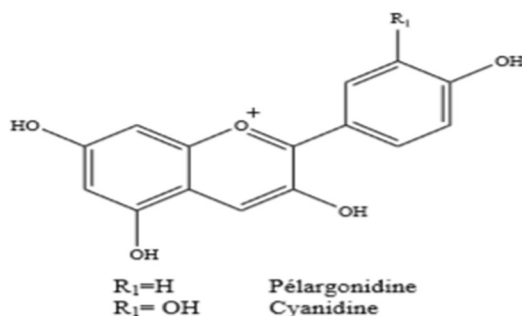


Figure 1-9 : Exemples des structures chimiques des anthocyanes.

Les anthocyanes sont stabilisés dans les plantes par des interactions avec des acides aminés, des tanins et des 4-oxo-flavonoïdes (Vierling, 2008).

. Tanins

Les tanins sont des polyphénols polaires d'origine végétale, existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines (Redondo et al., 2014). Ils forment des complexes avec les protéines et aussi les polysaccharides par des forces non spécifiques ; les liaisons hydrogènes et hydrophobes (Okuda et Ito, 2011). On distingue deux groupes de tanins différents par leur structure et par leur origine biogénétique.

a-Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables ou acides tanniques sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitannins (figure 1-10) (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999).

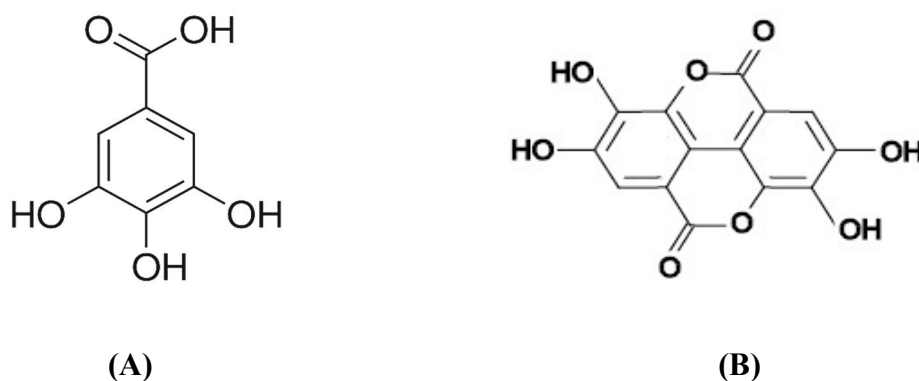


Figure 1-10 : Structure de l'acide gallique (A) et de l'acide ellagique (B) (Derbel et Ghedira, 2005 ; Nicholson et Vermerris, 2006).

b-Tanins condensés

Les tanins condensés (tanins catechiques) ou bien proanthocyanidols (figure 1-11) se différencient fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Ils sont constitués d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (Bruneton, 1999).

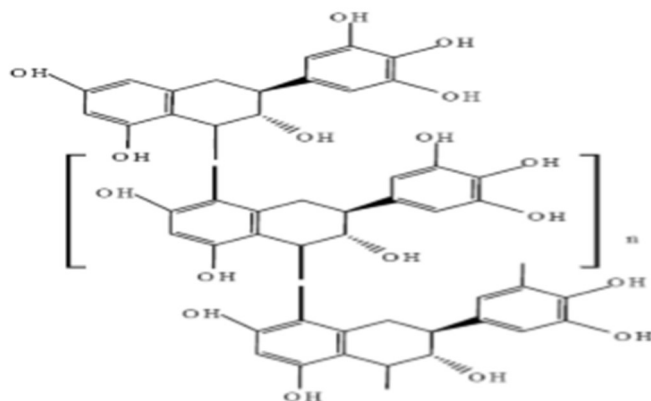


Figure 1-11 : Exemple de structure d'un tanin condensé (Macheix et al., 2006).

. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques non-flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux classes principales, qui sont des dérivés d'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique (figure 1-12).

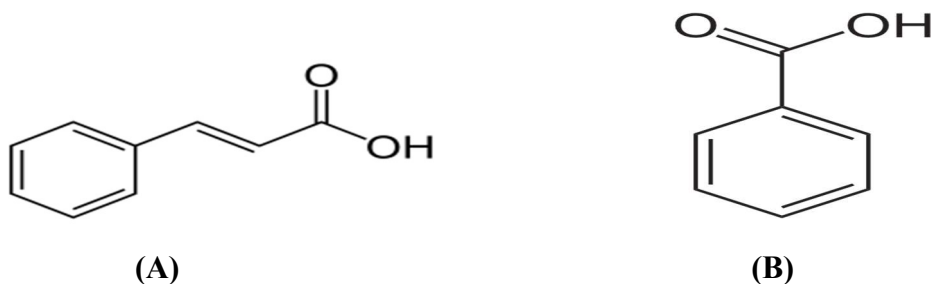


Figure 1-12 : Structure de l'acide cinnamique(A) et de l'acide benzoïque (B).

Les acides phénoliques se trouvent dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová et al., 2003). Ils ont des effets antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires et chélateurs (Mandal et al., 2014).

. Acides hydroxycinnamiques C6-C3

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 qui dérive de celle de l'acide cinnamique (figure 1-13). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (cis ou Z et trans ou E) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Les formes trans sont cependant naturellement prépondérantes (Concellon et al., 2004).

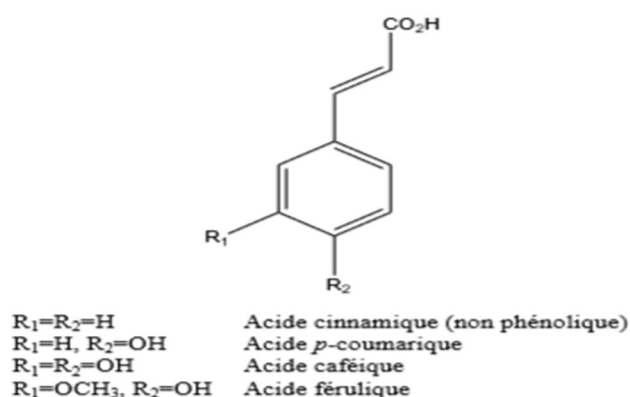


Figure 1-13 : Exemples d'acide hydroxycinnamique.

Les acides hydroxycinnamiques sont retrouvés dans toutes les parties des fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mûr.

. Coumarines

Les coumarines (figure 1-14) sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Elles ont été isolées pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata* (Lacy et O'Kennedy, 2004). Ce sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux.

Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (Cowan, 1999).

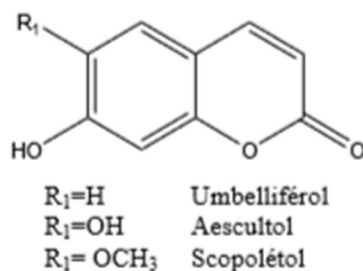


Figure 1-14 : Exemples des structures chimiques des coumarines.

. Stilbènes C6-C2-C6

Les stilbènes présentent une structure en C6-C2-C6, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para. Les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison, formant un système conjugué (figure 1-15). Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons π sur la totalité de la molécule. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine (Belkheiri, 2010). Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques (Jean-Denis, 2005). Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (Crozier et al., 2006).

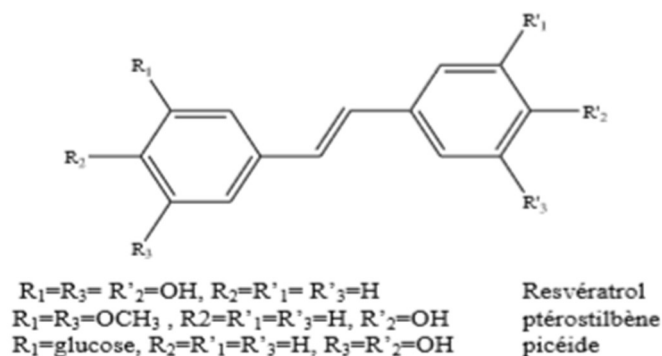


Figure 1-15 : Exemples des structures chimiques des stilbènes.

1.2.3. Propriétés thérapeutiques et biologiques des composés phénoliques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergiques, anti-arthérogéniques, anti-inflammatoires, hépatoprotectives, antimicrobiennes, antivirales, antibactériennes, anticarcinogéniques, anti-thrombotiques, cardioprotectives et vasodilatatoires (figure 1-16) (Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant, grâce à leurs propriétés redox qui jouent un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt et al., 2001).

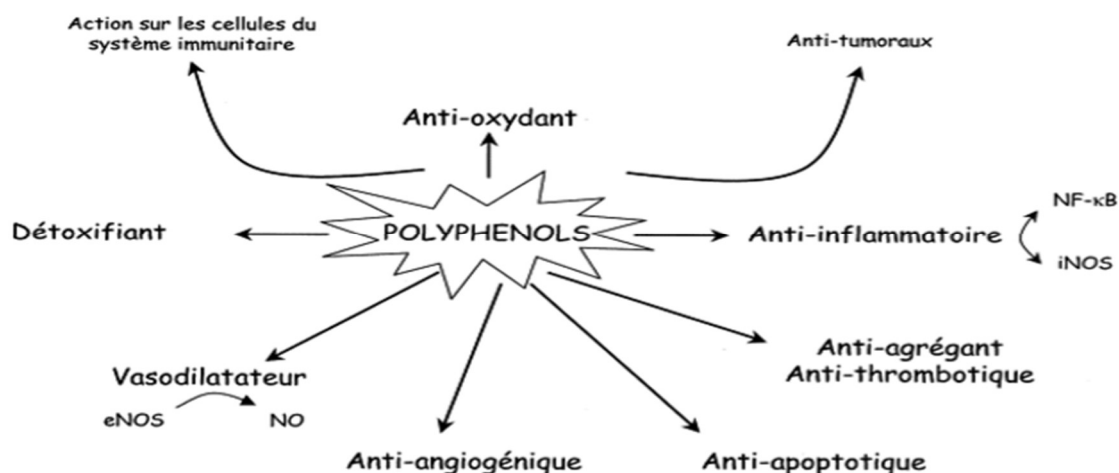


Figure 1-16 : Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les effets bénéfiques des polyphénols ciblent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002).

D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et les soins de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hennebelle et al., 2004).

- **Les flavonoïdes** possèdent de nombreuses activités biologiques qui sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels (Fuhrman et al., 1995). Ils sont considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Brown, 1998 ; Dacosta, 2003), comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+), essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique, et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés comme de très bons agents antimicrobiens (Harborne et Williams, 2000).

- **Les tanins** jouent le rôle d'anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie (Chung et al., 1998). Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (*chêne, Quercus spp.*). Les pro-anthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus spp.*) seraient de bons sédatifs cardiaques (Hennebelle et al., 2004). Les tanins possèdent aussi un pouvoir antioxydant très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou tri-hydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 di-hydroxyles sur le cycle A. Les tanins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (Rahman et al., 2006), ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages in vitro (Yoshida et al., 1999).

- **Les coumarines** sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (Hennebelle et al., 2004). Elles ont une capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Elles préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (Anderson et al., 1996).

- **Les acides phénols et ces dérivés** sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (Hennebelle et al., 2004). Les composés possédant les activités antioxydantes et anti-radicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (Bossokpi, 2002). Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (Cowan, 1999), l'acide gallique a la capacité de réduire la viabilité des cellules cancéreuses du

poumon chez les souris in vitro, L'associer à des médicaments anticancéreux tels la cisplatine s'avère efficace pour ce type de cancer (Kawada et al., 2001 in Rangkadilok et al., 2007).

Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exercer une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux (Lee et al., 2005).

- **Les quinones**, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. On les trouve dans la bourdaine (*Rhamnus frangula L.*), les sénés (*Cassia spp.*) et les aloès (*Aloe spp.*). D'autres activités antidépressives (*hypericin*), anti-protazoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites. (Bruneton, 1993 ; Hennebelle et al., 2004).

1.2.4. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier

Les composés phénoliques dans les feuilles d'olivier sont très divers et leurs structures sont très variées. Leurs teneurs ont fait l'objet de nombreuses études :

Altiok et al., (2008), ont trouvé que la teneur en composés phénoliques dans les feuilles d'olivier est de 2,8 mg/g de matière sèche, de 44,3 mg/g de matière sèche dans le travail effectué par Boudhrioua et al., (2009) et elle peut même dépasser les 250 mg/g de matière sèche selon Mylonaki et al., (2008).

Ces variations dépendent de la variété de l'olivier, des conditions climatiques, de l'époque de prélèvement des échantillons et de l'âge des plantations. En plus de ces facteurs de variabilité, il s'ajoute l'effet de la méthode de préparation des feuilles d'olivier (déshydratation et broyage) du procédé et des techniques d'analyses qualitative et quantitative des composés phénoliques.

1.3. Radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent généralement dans les familles des thiols et des phénols.

1.3.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié (électrons célibataires). Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Une fois transformées, elles deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne (Dacosta, 2003).

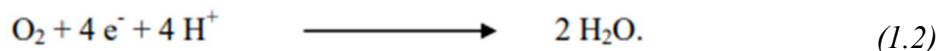
On distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote ($NO\cdot$), le radical peroxyde ($ROO\cdot$) et le radical alkoxyde ($RO\cdot$).

Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003).

1.3.1.1. Origine des radicaux libres

1.3.1.1.1. Origine endogène

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, la plupart d'entre eux se forment au cours de métabolisme de l'oxygène (réduction de l'oxygène moléculaire en eau) dans les mitochondries. Le passage d'une molécule d'oxygène à deux molécules d'eau nécessite l'action de quatre électrons selon l'équation (1.2).



Cependant, et jusqu'à 5 % des cas, on peut assister à une réduction incomplète de l'oxygène en eau. Celle-ci aboutit à la production de l'anion superoxyde (O_2^-). La dismutation de dernier va donner naissance au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis indirectement au radical hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) (Pincemail et al., 2002 ; Valko et al., 2006).

1.3.1.1.2. Origine exogène

Les rayonnements UV (par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants) et les radiations ionisantes induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que O^{2-} , $\text{OH}\bullet$ et de molécules génératrices de radicaux libres.

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2), des toxiques présents dans notre environnement (suie, goudron, tabac, polluants industriels) sont également responsables de la synthèse de radicaux libres. Ils sont à l'origine d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des alvéoles pulmonaires (Favier, 2003).

1.3.2. Le stress oxydant

La production physiologique des radicaux libres est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydante/prooxydante est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé Stress oxydatif (Favier, 2003).

1.3.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances qui, à faible concentration, préviennent ou retardent significativement l'oxydation d'un substrat (Halliwell, 1990). Un nouveau concept plus général a défini les antioxydants comme "une substance qui retarde, empêche ou élimine les dommages oxydatifs à une molécule cible" (Gutteridge et Mitchell, 1999 ; Medina-Navarro et al., 2010). Un antioxydant idéal devrait être aisément absorbé, susceptible d'éliminer les radicaux libres et chélater les métaux redox à des niveaux physiologiquement appropriés (Rahman, 2007).

Il existe de nombreux systèmes de défense antioxydantes endogènes ou exogènes, enzymatiques ou non (Rezaie et al., 2007) (figure 1-17). Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate) et ils peuvent par contre être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, flavonoïdes, certaines huiles essentielles) (White, 1994).

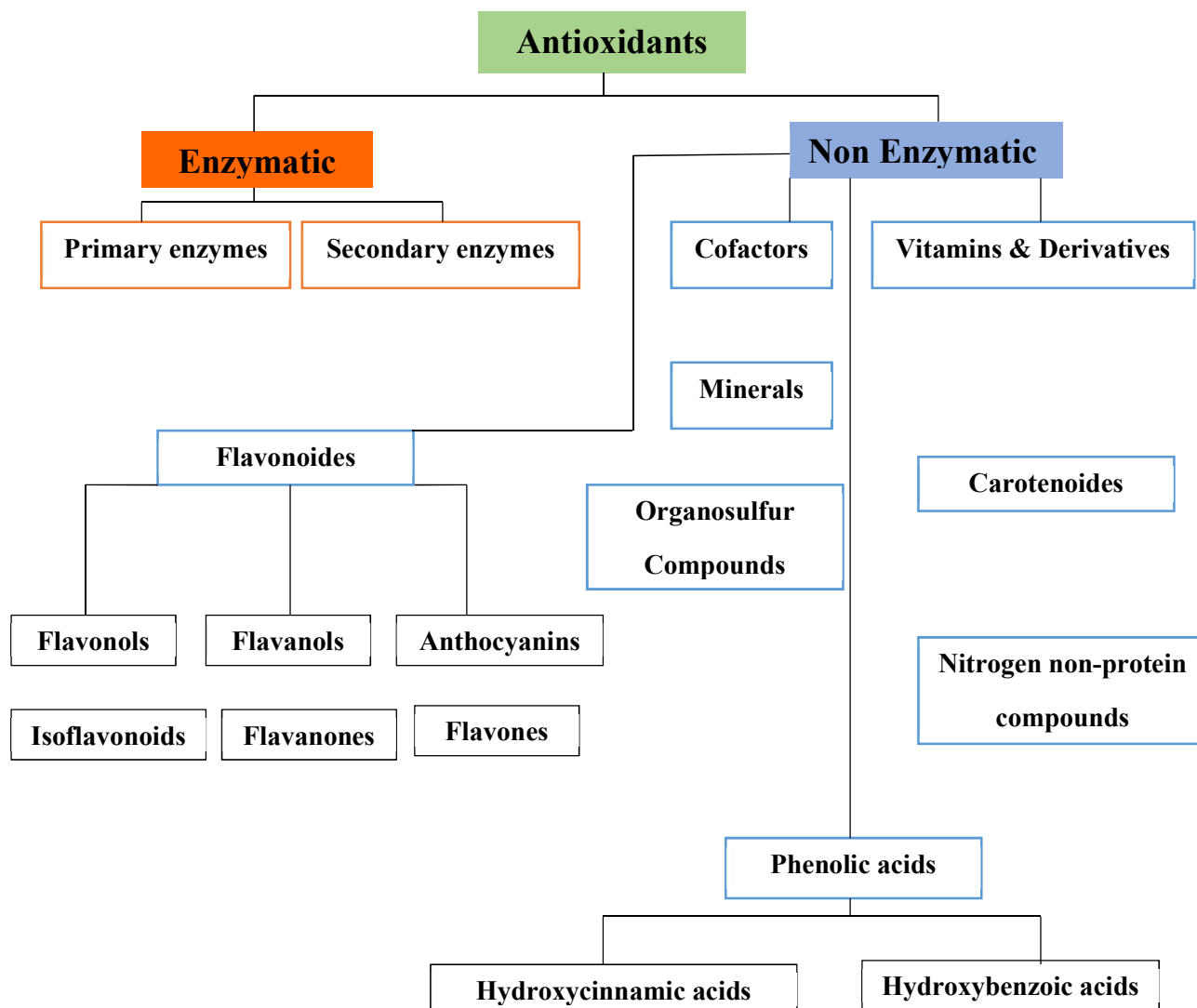


Figure 1-17 : Différentes classes d'antioxydants. (Pietta, 2000 ; Ratnam et al., 2006 ; Godman et al., 2011).

1.3.3.1. Mécanisme d'action des antioxydants

Le processus d'oxydation est de type radicalaire : les antioxydants vont intervenir comme "capseurs" de radicaux libres. Ceux de type phénolique réagissent selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un intermédiaire radical stabilisé de par ses structures mésomères conjuguées (figure 1-18).

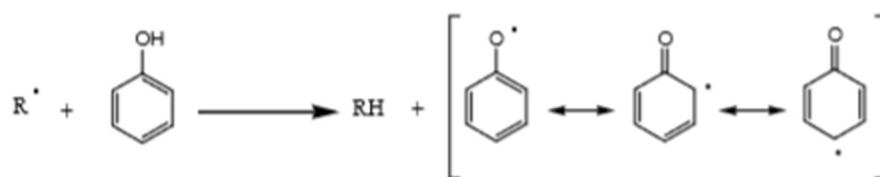


Figure 1-18 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques (Sherwin, 1976).

1.3.3.2. Classification des antioxydants

1.3.3.2.1. Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (groupe I) ou en épurant les radicaux libres oxygénés formés (groupe II).

. Les antioxydants primaires (Groupe I)

Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation par leur apport au processus d'oxydation et de conversion des radicaux libres vers leurs formes inactives. Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire (Fränkel et Meyer, 2000 ; Huang et al., 2005).

. Les antioxydants secondaires (Groupe II)

Les antioxydants secondaires englobent une large gamme de différentes substances chimiques chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydants et destructeurs des hydroperoxydes. Parfois, quelques antioxydants peuvent exercer plusieurs fonctions antioxydatives, par exemple, l'acide ascorbique peut être un piègeur du radical libre dans une solution aqueuse et effectivement régénérateur du tocophérol. Plusieurs flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres et chélateurs de métaux (Miller et al., 1996).

1.3.3.2.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique

. Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques, ils sont utilisés depuis longtemps, mais beaucoup d'études récentes ont porté sur leur toxicité élevée (Pelli, 2003 ; Moghaddam, 2015). Le besoin de réduire leur utilisation favorise le marché des antioxydants naturels et stimule la recherche (Penchev, 2010).

. Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, les vitamines (C, E, P...), les composés phénoliques. (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

a-Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules. Ils sont présents dans les carottes, les fruits rouges et jaunes, les légumes verts et les tomates (Marc et al., 2004). Les principaux caroténoïdes sont le β -carotène, le lycopène, la lutéine et l' α -carotène. L'activité anti-oxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses liaisons doubles conjuguées au sein de leur structure (Mortensen et al., 2001). Elles sont particulièrement efficaces pour neutraliser l'oxygène singulet et jouent le rôle de bouclier contre la photo initiation de réactions radicalaires par les rayonnements UV. Le rôle biologique des caroténoïdes est, entre autres, complémentaire de celui de la vitamine E, elle-même régénérée par la vitamine C, d'où l'intérêt de consommer une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes variés pour bénéficier des nombreux effets de synergie entre

micronutriments (Miller et al., 1996). Différents systèmes *in vitro* ont confirmé le rôle protecteur de ces molécules. Cependant, les études effectuées *in vitro* sont peu nombreuses et le rôle antiradicalaire des caroténoïdes reste à préciser.

b- La vitamine C

La vitamine C ou l'acide ascorbique est un antioxydant puissant hydrosoluble, à des concentrations très faibles, il est capable de piéger / neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (Carr et Frei, 1999 ; Césarini, 2004). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, la vitamine C passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui sera régénérée par le glutathion. Celle-ci est capable de capter certaines espèces radicalaires (Pokorny et al., 2000).

c-La vitamine E

La vitamine E désigne une famille de molécules liposoluble. Il en existe quatre isomères (α -, β -, γ -, δ - tocophérol) dont l'activité antioxydante est fortement tributaire à la structure. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. En effet, son activité antioxydante est extrêmement efficace et l'on estime qu'une molécule d' α -tocophérol peut inhiber la peroxydation de 1000 molécules d'acide gras polyinsaturé. Aux concentrations élevées, il peut jouer le rôle de prooxydant. Il semble que parmi les quatre principaux tocophérol, l' α -tocophérol est plus rapidement oxydé à l'air et formerait un excès de radicaux libres tocophéroxyles susceptibles de relancer le mécanisme de l'autoxydation (Cillard et al., 1980). La vitamine E est présente dans les huiles végétales telles que l'huile de colza, ainsi que les noix, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes.

d-Les composés phénoliques

Les polyphénols principalement, flavonoïdes, acide phénolique, tanins, constituent une richesse largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Les relations structure-activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation.

1.3.3.3. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests *in vitro*

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygène Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphenyl-picrylhydrazyle).

.Test ORAC

Ce test a été développé en 1994 et mesure le taux d'inhibition du radical libre peroxyde d'hydrogène. Il est basé sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). Le produit à tester peut-être capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant.

C'est le seul qui combine à la fois le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et la longueur dans le temps de celle-ci en une seule mesure. Son avantage majeur est de proposer une mesure standardisée et largement acceptée (Agrobio, 2009).

• Test CAET

Il est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical $ABTS^+$ de coloration bleu-vert en le transformant en $ABTS^+$ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester. Le résultat est donné en μM ou mM d'équivalent Trolox par g de produit ou par mL s'il s'agit d'un liquide (Agrobio, 2009).

• Test DPPH

Il est basé sur la réduction du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (α, α -diphényl- β -picrylhydrazyl) ; DPPH. Le radical libre DPPH (figure 1-19) est stable grâce à la délocalisation de son électron autour de la molécule, qui donne une couleur violette caractérisée par une absorption dans l'éthanol ou méthanol dans une bande comprise entre 515 nm et 520 nm. Un antioxydant aura la capacité de donner un atome d'hydrogène au radical libre DPPH et le transformer à un état réduit (figure 1-20) avec la perte de la couleur violette et l'apparition d'une couleur jaune.

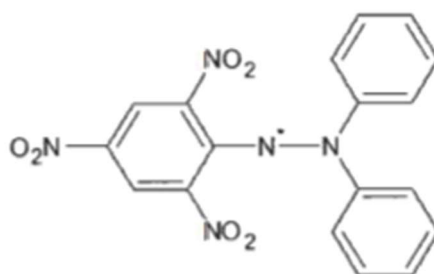


Figure 1-19 : Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)

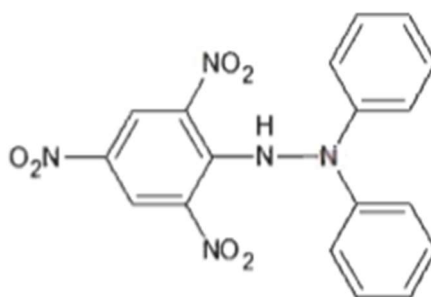


Figure 1-20 : Diphenylpicrylhydrazyl (réduit).

Cette méthode est utilisée actuellement pour l'étude des extraits végétaux et alimentaires. Elle permet de mesurer la capacité antioxydante totale et de faire une comparaison des activités antioxydantes. Son avantage majeur par rapport aux autres méthodes est la solubilité du DPPH dans les solvants aqueux et organique (polaire et non polaire).

1.4. Extraction Solide - Liquide

1.4.1. Principe et mécanisme de l'extraction Solide - Liquide

L'extraction solide - liquide est une opération de transfert de matière entre une phase solide, qui contient la substance à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction (Leybros et Frémeaux, 1990). Suite au contact entre le solvant et le solide hétérogène, les substances ayant une affinité pour le solvant sont solubilisées et passent de la phase solide à la phase liquide. Le transfert de matière se réalise par diffusion moléculaire et par convection.

Généralement, l'extraction n'est pas très sélective. En plus des molécules d'intérêt, d'autres substances sont également co-extraites à partir de la phase solide vers le solvant. La source solide épuisée après l'extraction contient très peu ou pas de soluté, elle est appelée raffinat ou résidu et la solution obtenue est appelée extrait. La matière solide obtenue après évaporation du solvant est aussi appelée extrait ou extrait sec. Ce dernier peut être conservé longtemps et utilisé comme ingrédients dans des industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Au cours de l'extraction plusieurs étapes successives peuvent être distinguées :

- Pénétration du solvant dans la matrice solide ;
- Dissolution du soluté dans le solvant ;
- Diffusion du soluté vers l'extérieur de la matrice solide ;
- Transfert du soluté vers le cœur de la phase liquide (par diffusion ou convection).

La durée de l'extraction solide - liquide est déterminée par l'étape la plus lente qui contrôle la vitesse de l'opération. Le plus souvent il s'agit de l'étape de diffusion interne dans la matrice végétale.

1.4.2. Cinétique de l'extraction Solide - Liquide

La vitesse d'extraction peut être exprimée en termes de masse de solutés dissous par unité de temps ou par la variation de la fraction de ces molécules dans le solide par unité de temps.

La vitesse de transfert, mesurée par le flux de matière transférée par unité de temps et par unité de surface d'interface, dépend directement des écarts à l'équilibre, appelés potentiels de transfert globaux ou potentiels d'échange. Le potentiel de transfert propre à chaque phase s'exprime par la différence positive entre la concentration moyenne du soluté dans la phase considérée et sa concentration à l'interface (D'Alessandro, 2013).

1.4.3. Paramètres influençant l'extraction Solide - Liquide

1.4.3.1. Nature du solvant

La nature du solvant est très importante pour pouvoir extraire les molécules d'intérêt et, si possible, de façon sélective. Le solvant doit avoir une affinité importante pour les molécules ciblées et possède une grande capacité de dissolution.

Une faible viscosité facilitera la pénétration du solvant dans la matrice solide ainsi que le transfert de matière au sein de la phase liquide. Une température d'ébullition peu élevée permettra de séparer les molécules extraites et le solvant en utilisant moins d'énergie. Il est toujours préférable d'utiliser des solvants ininflammables et non explosifs (D'Alessandro, 2013).

1.4.3.2. Taille des particules

La source végétale est souvent découpée ou broyée au préalable pour faciliter l'extraction. La réduction de la taille des particules augmente la surface d'échange et ainsi la vitesse d'extraction (Bucic-Kojic et al., 2007).

La diffusion interne est aussi plus rapide dans le cas de particules fines. Cependant les particules de taille très fine posent des problèmes technologiques comme, le tassement du lit de solides provoquant une diminution de la perméabilité du lit au solvant et l'établissement de courants préférentiels et d'endroits du lit où le solvant ne circule pas (Mafart et Béliard, 1992). Les particules très fines sont également plus difficiles à séparer de l'extrait liquide à la fin de l'extraction.

1.4.3.3. Température

L'augmentation de la température accroît la solubilité et la diffusivité dans la solution et réduit sa viscosité. La chaleur facilite l'extraction, car elle augmente la perméabilité des parois cellulaires. Cependant cela peut provoquer une diminution de la sélectivité de l'extraction. Une température excessive peut provoquer une dénaturation des produits à extraire (D'Alessandro, 2013).

1.4.3.4. Agitation

L'agitation mécanique des particules dans le solvant permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu. Elle a un effet favorable sur l'opération car elle permet de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface solide-liquide (couche limite) et d'augmenter le coefficient de transfert. Si l'agitation est très intense et/ou maintenue durant une longue période, elle peut favoriser des chocs entre les différentes particules et permet ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans le milieu (Dibert et Cros, 1989 ; Leybros et Frémeaux, 1990).

1.4.3.5. Rapport Solvant - Solide

Le rapport solvant-solide a également un effet sur le rendement d'extraction, lorsque le ratio entre le solvant et le solide est grand, la quantité totale des composés extraits est plus élevée. Cependant, même si les rendements sont plus grands dans les cas du rapport solvant ; - solide, l'utilisation de grandes quantités de solvant n'est pas souhaitable car les concentrations des molécules d'intérêt dans les extraits sont faibles, d'avantage d'énergie est nécessaire pour éliminer le solvant et obtenir l'extrait sec (Sparr Eskilsson et Björklund, 2000). Une optimisation de ce paramètre est donc nécessaire.

1.4.3.6. Temps d'extraction

Le temps de contact entre les deux phases est aussi un des paramètres les plus importants à maîtriser. Ce paramètre est étroitement lié à la cinétique de l'extraction. La connaissance de la cinétique permettra d'arrêter l'extraction lorsque le rendement souhaité est atteint et de ne pas continuer l'opération au-delà. Par soucis d'économie d'énergie et de main d'œuvre.

1.4.4. Méthodes d'extraction Solide - Liquide

Il existe plusieurs techniques d'extraction des biomolécules à partir de sources végétales. Les techniques d'extraction à pression atmosphérique, sans ou avec agitation et/ou chauffage utilisées depuis longtemps sont considérées comme techniques classiques (conventionnelles). Les techniques plus récentes sont appelées alternatives.

Dans les techniques alternatives, on trouve des opérations sous pression (en utilisant comme solvants liquides pressurisés ou fluides supercritiques), ainsi que des techniques permettant d'intensifier l'extraction (par assistance d'ultrasons ou micro-ondes, par exemple).

1.4.4.1. Méthodes classiques

. Extraction Soxhlet

L'extraction Soxhlet, utilisée pendant des décennies, est une technique standard qui sert de référence pour évaluer les résultats d'autres méthodes d'extraction solide - liquide.

C'est la technique qui permet d'avoir les meilleurs rendements parmi les techniques classiques (Luque de Castro et Garcia-Ayuso, 1998). L'utilisation de différents solvants donne lieu à des extraits ayant différentes compositions (Zarnowski et Suzuki, 2004).

. Extraction en mode batch

Dans ce mode d'extraction, la matrice végétale est immergée dans le solvant pendant un temps suffisamment lent pour atteindre l'équilibre. L'extrait est ensuite collecté pour être purifié (Chung-Hung et al., 2014). L'avantage majeur de l'extraction en mode batch par agitation est la possibilité de travailler facilement avec des mélanges de solvants (par exemple diverses proportions alcool-eau) et de contrôler la température d'extraction, en évitant le risque de destruction des composés thermolabiles. C'est une méthode simple et efficace mais qui exige des procédures postérieures de filtration et de concentration relativement longues (Chung-Hung et al., 2014).

. Macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste à la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, habituellement à température ambiante. L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles. Pour être efficace, une macération sans agitation, peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est de l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut se faire dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et, dans certains cas, maintenu dans un réfrigérateur (Groubert, 1984 ; Leybros et Frémeaux, 1990).

. Infusion

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinaux. Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées des plantes : feuilles, fleurs, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles (Baba-Aïssa, 2000 ; Kraft et Hobbs, 2004).

. Décoction

Elle convient pour l'extraction de matières végétales dur ou très dur : bois, écorce, racines, ou des plantes à constituants peu solubles (ex : l'acide silicique). Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour bien extraire les principes médicinaux (Baba-Aïssa, 2000 ; Kraft et Hobbs, 2004).

1.4.4.2. Méthodes alternatives

Actuellement, il y a une demande croissante concernant la mise au point de nouvelles techniques d'extraction permettant des temps d'extraction plus courts, une réduction de la consommation d'énergie et de solvants organiques et une réduction de la pollution. Ces opérations sont considérées comme des éco-extractions (green extractions). Généralement ce type d'éco-procédés sont aussi appelés procédés durables ou procédés propres. Certaines techniques alternatives d'extraction comme l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction accélérée par solvant et l'extraction par fluide supercritique sont considérées comme des éco-extractions.

. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction par sonication est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Cette technique utilise des ondes sonores à fréquence supérieure à 20 kHz. La vibration se propage dans le milieu en transportant de l'énergie mécanique sous forme de rapides variations de pression. Le milieu de propagation de l'onde ultrasonore est soumis à une succession de compressions et de décompressions provoquant la formation de bulles (Poux et al. 2010). Les ultrasons entraînent de très fortes modifications de la température et de la pression à l'intérieur des bulles. Au moment où la dimension critique est atteinte, les bulles implosent (figure 1-21). Ce processus est appelé « cavitation » (Masson 1996).



Figure 1-21 : Évolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide (Kim et al., 2010).

Les effets mécaniques des ultrasons induisent une plus grande pénétration du solvant dans les matrices végétales et améliorent le transfert de matière. La « pulsation » du milieu permet d'améliorer les coefficients de transfert de matière. Les ultrasons peuvent également provoquer la rupture des parois cellulaires, facilitant ainsi la libération de leur contenu. La destruction des parois cellulaires favorise l'extraction des composés d'intérêt vers le solvant.

Ainsi l'application des ultrasons accélère l'extraction à partir de sources végétales et dans certains cas permet aussi d'augmenter les rendements (Vinatoru, 2001 ; Poux et al., 2010 ; Vilku et al., 2008).

. Extraction assistée par micro-ondes

Dans cette technique d'extraction alternative, la matrice solide est immergée dans un solvant chauffé par micro-ondes (Poux et al., 2010). Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques. Leur assistance permet de chauffer le solvant très rapidement et en utilisant peu d'énergie. Cette technique a été brevetée par Paré et Bélanger en 1990 pour l'extraction de produits naturels (Paré et Bélanger, 1990).

En général, les échantillons sont homogénéisés et mélangés avec un solvant et la suspension est irradiée à plus de 2000 MHz pour une courte période de temps. Le chauffage est généralement répété plusieurs fois avec des périodes de refroidissement pour éviter l'ébullition.

L'efficacité de cette technique s'approche de celle de l'extraction classique Soxhlet, mais avec l'avantage de pouvoir être réalisée beaucoup plus rapidement (Pan et al., 2003 ; Poux et al., 2010). Les inconvénients de cette technique sont la nécessité de maîtriser parfaitement le temps de chauffage par micro-ondes, l'inhomogénéité du chauffage par les micro-ondes et le fait qu'elle ne peut pas être utilisée pour l'extraction de composés thermosensibles (vitamines, protéines, anthocyanines etc). Il faut aussi bien connaître les propriétés diélectriques des molécules dans le système (Poux et al., 2010).

. Extraction par liquide pressurisé

L'extraction par liquide pressurisé est également connue comme extraction par solvant sous pression, extraction par solvant sous-critique ou extraction accélérée par solvant. C'est une technique alternative d'extraction est réalisée à pression élevée. Cela permet d'augmenter la température d'ébullition du solvant et de réaliser l'extraction à températures plus élevées qu'à pression ambiante. La haute pression appliquée, le plus souvent comprise entre 4 et 20 MPa, assure que le solvant se maintient à l'état liquide à la température appliquée (Ramos et al., 2002). Les températures élevées d'extraction favorisent le transfert de matière et augmentent les taux d'extraction, parce qu'elles impliquent généralement :

- Une augmentation de la capacité des solvants pour la solubilisation de solutés ;
- Une augmentation des taux de diffusion ;
- Une meilleure rupture des liaisons soluté-matrice ;
- Une diminution de la viscosité du solvant et
- Une diminution de la tension superficielle (Ramos et al., 2002, Richter et al., 1996).

Même si cette technique est très efficace, elle nécessite des équipements spécifiques pour travailler sous pression et elle n'est pas adaptée pour l'extraction de substances thermosensibles.

. Extraction par fluides supercritiques

L'extraction par fluides supercritiques utilise comme solvants des fluides en état supercritique (l'état du fluide lorsque sa température et sa pression sont supérieures à la température et à la pression critiques de ce fluide). Les propriétés des fluides supercritiques sont intermédiaires entre celles des gaz et des liquides (Taylor, 1996).

Cette extraction est principalement utilisé avec le CO₂ supercritique, car celui-ci est peu coûteux (sous-produit de l'industrie), non-inflammable, largement présent dans l'atmosphère, facile à éliminer et nécessite des conditions critiques faciles à atteindre (T = 31.1°C, P = 73.8 bars).

Cependant le CO₂ supercritique est hydrophobe, il est souvent ajouté à un solvant polaire (éthanol, méthanol) pour extraire les composés polaires.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1. La matière végétale

2.1.1. Cueillette

La matière végétale utilisée est la feuille d'olivier sauvage. La récolte a été effectuée à l'école nationale polytechnique d'Alger, au nord de l'Algérie lors de la période de floraison entre février et mars 2018.

Les plantes ont été identifiées au département botanique de l'Ecole nationale supérieure d'Agronomie comme étant l'« *Olea Europaea Sylvestris* ».

2.1.2. Prétraitements

2.1.2.1. Lavage

La matière végétale a été triée de manière à ne garder que les feuilles. Celles-ci ont été par la suite lavées à l'eau distillée à plusieurs reprises afin d'éliminer toute trace de pollution extérieure.

2.1.2.2. Séchage

La plante fraîche renferme une importante proportion d'eau, celle-ci varie suivant la nature des organes considérés (plante entière, tige, fleurs, racines, graines etc.). De plus, la plante comme tout organisme vivant contient de nombreuses enzymes qui, une fois déracinée, ces composants vont entraîner de nombreuses réactions de dégradation, qui ne seront plus compensées par des synthèses au sein de la cellule végétale, il s'ensuit donc une détérioration rapide du contenu cellulaire et par voie de conséquence une altération des principes actifs s'y trouvant.

Dans notre cas, un séchage en deux temps a été fait durant 15 jours. Dans un premier temps, l'échantillon a été séché à l'air libre, à température ambiante, puis il a subi un deuxième séchage à l'étuve à une température de 40°C, sans détériorer ses composants.

2.1.2.3. Broyage et tamisage

Le broyage vise à diviser la matière pour augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant d'extraction et à faciliter l'extraction de l'intérieur des tissus végétaux par cassure des tissus et des parois cellulaires (Groubert, 1984).

Les feuilles ont donc été broyées grâce à un broyeur à lames, puis tamisées afin de ne garder que les particules ayant un diamètre inférieur à 1 mm.

2.1.2.4. Détermination du taux d'humidité

Une masse déterminée de matière végétale a été pesée dans un cristalliseur, ce dernier a été introduit dans une étuve préalablement chauffé à 105° pendant une durée de 24 heures.

La teneur en eau de la matière végétale se calcule selon la relation suivante :

$$H = \frac{M_H - M_S}{M_H} \times 100 \quad (2.1)$$

Avec :

H : le taux d'humidité, en %.

M_H : la masse de la matière végétale sèche, en g.

M_S : la masse de la matière végétale après séchage, en g.

2.1.2.5. Concentration de l'extrait

La concentration en extrait sec en g/mL des extraits obtenus a été déterminée en procédant au séchage à 40°C dans une étuve d'un millilitre de chacun des échantillons jusqu'au poids constant.

2.2. Extraction des composés désirés d'*Olea Europaea Sylvestris*

2.2.1. Choix du solvant

Le choix du solvant d'extraction peut se faire sur la base de ses capacités de pénétration dans la matière végétale, de son pouvoir de solubilisation et de ses propriétés de transfert de matière. Il repose aussi sur sa capacité de pénétration cellulaire et de diffusion dans les organes sécréteurs d'une part, ainsi que de sa sélectivité d'extraction sans avoir une action destructrice sur les molécules aromatiques d'une autre part.

L'eau est souvent utilisée comme solvant pour l'extraction de biomolécules à partir de sources végétales. Sa polarité permet de dissoudre beaucoup de composés phénoliques antioxydants polaires. Pour des antioxydants peu polaires ou apolaires des solvants plus hydrophobes sont mieux adaptés.

Les caractéristiques de l'eau sont les suivantes :

- Masse moléculaire : 18,02 g/mol.
- Point d'ébullition : 100°C à 1 atm.
- Tension de vapeur : 3,20 KPa à 25°C.

2.2.2. Dispositif expérimental de l'extraction en mode batch

Il s'agit d'un dispositif composé d'un ballon Bicol de 500 mL surmonté d'un réfrigérant à reflux et d'un bain marie sur une plaque chauffante.

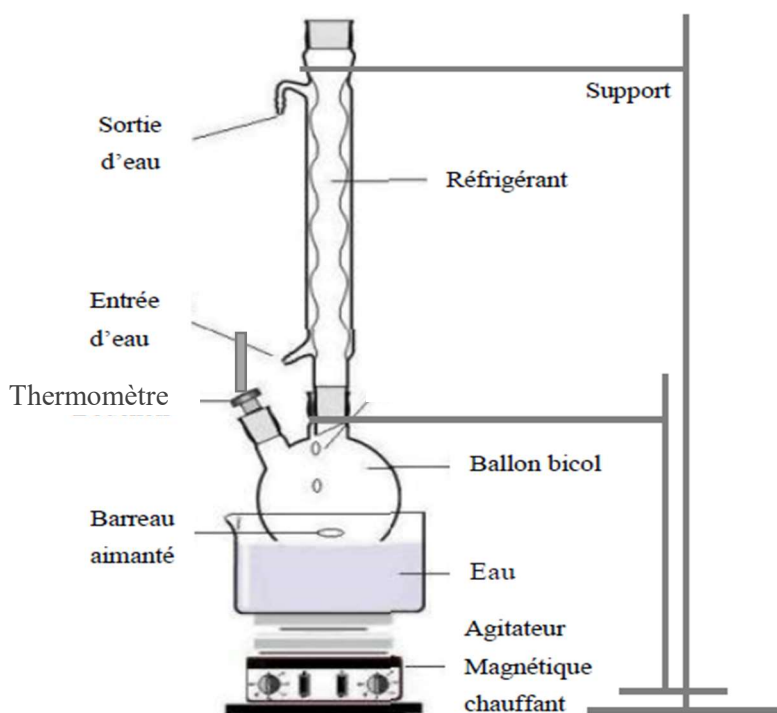


Figure 2-1 : Schéma du dispositif expérimental utilisé lors de l'extraction Solide - Liquide.

L'agitation est réalisée grâce à un barreau aimanté à une vitesse d'agitation constante et la température est contrôlée tout au long du processus d'extraction à l'aide d'un thermomètre mis en contact avec le mélange.

Les expériences qui ont été réalisées grâce à cette technique nous ont permis d'estimer l'influence des paramètres suivants : la température, l'hydromodule (le rapport quantité de matière végétale sur le volume du solvant) et le temps d'extraction. Le schéma du dispositif utilisé est représenté sur la figure ci-dessus (figure 2-1).

2.2.3. Protocole expérimental

L'échantillon de la matière végétale, préalablement pesé, est mis en contact avec le solvant dans le ballon. Le mélange est agité à une vitesse donnée et maintenu à une température fixée, selon les conditions opératoires. Après un temps d'extraction bien déterminé, il est refroidi, puis séparé par filtration sous-vide.

La phase liquide contenant les composés désirés est récupérée et conservée à l'abri de la lumière.

2.2.4. Produits chimiques utilisés

- Réactif de Folin-Ciocalteu (2M, Sigma-Aldrich) ;
- Carbonate de sodium, Na_2CO_3 (99, 5%, Sigma-Aldrich);
- Trichlorure d'Aluminium, AlCl_3 (99, 0%, Merck);
- Méthanol (99,7%, Sigma-Algrich) ;
- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH (Sigma-Aldrich) ;
- Acide gallique (97%, Biochem) ;
- Quercétine (95%, Sigma).

2.3. Dosage des composés phénoliques

2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La quantification de la teneur phénolique totale dans l'extrait a été déterminé en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu, tel que décrite par (Singleton et Rossi, 1965), en utilisant l'acide gallique comme standard.

• Principe de la méthode du Folin-Ciocalteu

Le principe de dosage des phénols totaux repose sur les capacités réductrices des complexes ioniques polymériques formés à partir des acides phosphomolybdiques ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) et phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) (réactif de Folin-Ciocalteu de couleur jaune) par les composés phénoliques (Swain et Hillis, 1959). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait (Boizot et Charpentier, 2006).

. Mise en œuvre pratique

On réalise une gamme d'étalon (allant de 3 jusqu'à 30 µg par mL) avec un polyphénol témoin, en général de l'acide gallique.

Pour réaliser le dosage, un volume de 5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillée) est ajouté à 1mL de l'échantillon. Le mélange est agité et laissé pendant 5 minutes, puis 4mL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) de 75g/L sont versés dans la solution. Les mélanges réactionnels, correspondant à chaque point de gamme et échantillon, sont agités et incubés 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière.

L'absorbance de la solution est mesurée à une longueur d'onde de 760 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible de marque Jenway (6705 UV/Vis).

La concentration en polyphénols totaux, exprimée en mg équivalent d'acide gallique par millilitre de solution à doser, mg EAG/mL, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage donnant l'évolution de l'absorbance, en fonction de la concentration d'acide gallique dans les mêmes conditions que l'extrait.

2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïde, présent dans l'extrait, a été évaluée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) légèrement modifiée cité par (Djeridane et al., 2006 ; Kosalec et al., 2004 ; Bahorun et al., 1997), en utilisant la quercétine comme étalon.

. Principe de la méthode d' AlCl_3

Le principe de dosage des flavonoïdes est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Ce dernier forme un complexe jaune avec les flavonoïdes. En effet, l' AlCl_3 forme des complexes acides stables soit avec le carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, ce réactif peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes. Chang et al ont montré que les complexes formés par l' AlCl_3 avec 15 composés flavonoliques références présentent une absorption maximale à des longueurs d'onde variant entre 415 et 440 nm.

. Mise en œuvre pratique

On réalise une gamme d'étalon (allant de 5 jusqu'à 40 µg par mL) avec un flavonol, à savoir la quercétine.

Pour réaliser le dosage, un volume de 3 mL d'extrait (préparés dans l'eau distillée) avec les dilutions convenables est ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à une température ambiante et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible de marque Jenway (6705 UV/Vis).

La concentration en flavonoïde, exprimés en mg équivalent de quercétine par millilitre de solution à doser (mg EQ/mL), est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage donnant l'évolution de l'absorbance, en fonction de la concentration de quercétine.

2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est évaluée en utilisant la méthode du test DPPH suivant la procédure décrite par (Sanchez-Moreno, 2002).

. Principe de piégeage du radical libre DPPH

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits (Wu, 2007). Le DPPH est initialement violé, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques (Hadbaoui, 2012).

Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec une perte de son absorbance caractéristique à 517 nm. Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu méthanoïque, permettant une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non couteux (figure 2-2).

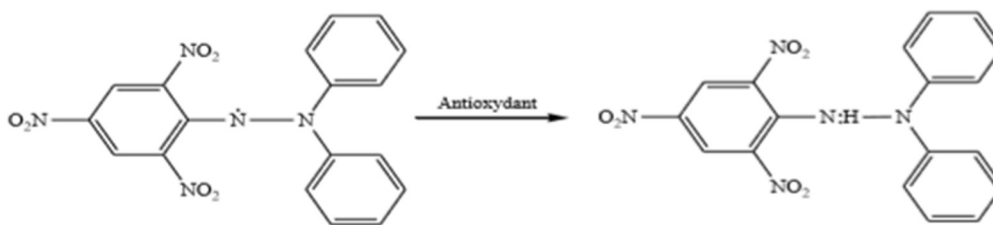


Figure 2-2 : Réduction du radical DPPH.

. Mise en œuvre pratique

Nous avons réalisé une gamme étalon en milieu méthanoïque à partir d'une solution mère de DPPH de 40µg/mL dans l'intervalle de 5 à 40 µg/mL.

La solution méthanoïque de DPPH préparée (de concentration massique de 40µg/mL) a été incubée 2 heures avant d'effectuer les analyses. Cette dernière peut être utilisée pendant une durée maximale de cinq jours, à condition qu'elle soit conservée à une température avoisinant les -5°C et à l'abri de la lumière.

Pour le dosage, un volume de 1 mL de chaque extrait a été ajouté à 9 mL de la solution de DPPH (40µg/ml dans le méthanol préparée précédemment), après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance de ces derniers ainsi que celle du blanc (DPPH + méthanol) servant de calibre ont été mesurées à une longueur d'onde de 517 nm, au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible de marque Jenway (6705 UV/Vis).

. Détermination du pourcentage d'inhibition

Les résultats peuvent être exprimés en tant que pouvoir d'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante (Khoudali et al., 2014).

$$I(\%) = \frac{Abs(blanc) - Abs(échantillon)}{Abs(blanc)} \times 100 \quad (2.2)$$

Avec :

I : Le pourcentage d'inhibition, en %.

Abs (blanc) : absorbance du DPPH dissout dans le méthanol.

Abs (échantillon) : absorbance de l'échantillon (extraits dilués).

Le pourcentage inhibition I (%) renseigne uniquement sur la capacité de l'échantillon à une concentration donnée, de réduire ou non les radicaux du DPPH.

. Détermination des concentrations efficaces (IC₅₀)

L'IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %) aussi appelée EC₅₀ (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Le pouvoir antioxydant est déterminé de façon à ce qu'une quantité de l'extrait d'une concentration bien déterminée neutralise 50% du radical.

Les résultats exprimés en IC₅₀ et calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande (Popovici et al., 2009).

. Détermination de l'indice d'activité antiradicalaire

L'indice d'activité anti-radicalaire, IAA, est défini par le rapport :

$$IAA = \frac{C_{DPPH}}{IC_{50}} \quad (2.3)$$

Avec :

C_{DPPH} : Concentration de la solution DPPH dans la cellule au moment de l'analyse.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %, toutes deux exprimées en µg/ mL (Scherer et Godoy, 2009).

L'indice d'activité antiradicalaire est une constante, indépendante des concentrations du DPPH et de l'échantillon.

Selon Scherer et Godoy (2009), l'échantillon présente une faible activité anti-oxydante, si IAA < 0,5, une activité anti-oxydante modérée, pour des valeurs d'IAA entre 0,5 et 1, une forte activité anti-oxydante, si 1 < IAA < 2 et une très forte anti-oxydante, lorsque la valeur d'IAA est supérieur à 2.

2.5. Plan d'expérience et modélisation mathématique

Un plan d'expériences est une méthode de planification expérimentale scientifique et industrielle dans le but est d'obtenir l'information correspondante à l'objectif fixé préalablement (Pierre, 2005 ; Dagnelie, 2008). Un bon plan permet une diminution notable du nombre d'essais tout en donnant une bonne précision dans la détermination des résultats.

Les plans d'expériences organisent au mieux les essais à des fins scientifiques ou industrielles (Goupy, 2001). Ils sont appliqués dans différents domaines à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt (réponse), y, et des variables (facteur), x_i. Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type : y = f(x_i).

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse (Box, 2005).

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées.

2.5.1. Terminologie

Il est important de bien définir les principaux termes utilisés dans la méthodologie des plans d'expériences pour une meilleure compréhension.

Variable : caractéristique susceptible de prendre plusieurs valeurs d'un ensemble auquel une mesure numérique peut être appliquée (par exemple : revenu, âge, poids). Dans la méthode des plans d'expériences, des variables mathématiques sont mises en correspondance avec des grandeurs physiques (électriques, physiques, thermiques...) supposées intervenir dans le problème (Wahdame, 2006).

Les termes facteurs et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences (Goupy et Creighton, 2009).

- **La réponse** (variable de sortie y) : consiste en une quantification des performances du système étudié (Benoits et al., 1994). Une réponse doit être représentative et la moins dispersée possible pour des variables d'entrées maîtrisées et constantes (Droesbeke et al., 1997).

- **Les facteurs** (variables d'entrée x_i) : sont les paramètres que l'on fait varier au cours des essais, sensés influencer sur la variation de la réponse (les variables que l'on désire étudier) (Goupy, 2006). Ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs, continues ou discrets, contrôlables ou non contrôlables. Les facteurs sont limités par deux bornes, inférieure (bas) et supérieure (haut). On désigne le niveau bas par le signe (-1) et le niveau haut par le signe (+1) (Rousselle, 2003).

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, est appelé domaine de variation du facteur ou plus simplement le domaine du facteur (figure 2-3). S'il y a plusieurs facteurs, chacun d'eux a son domaine de variation (Droesbeke et al., 1997).

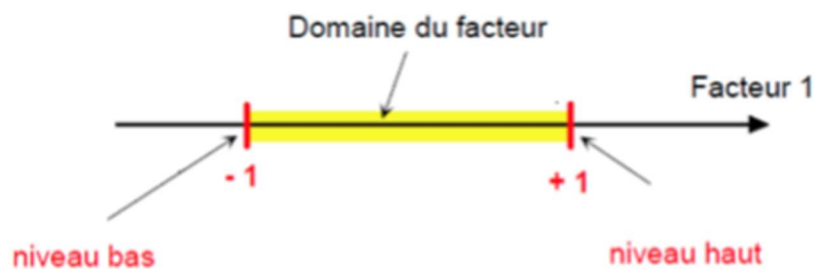


Figure 2-3 : Domaine du facteur.

Chaque facteur est représenté par un axe gradué et orienté. Les axes des facteurs sont orthogonaux entre eux. L'espace ainsi défini est l'espace expérimental (figure 2-4).

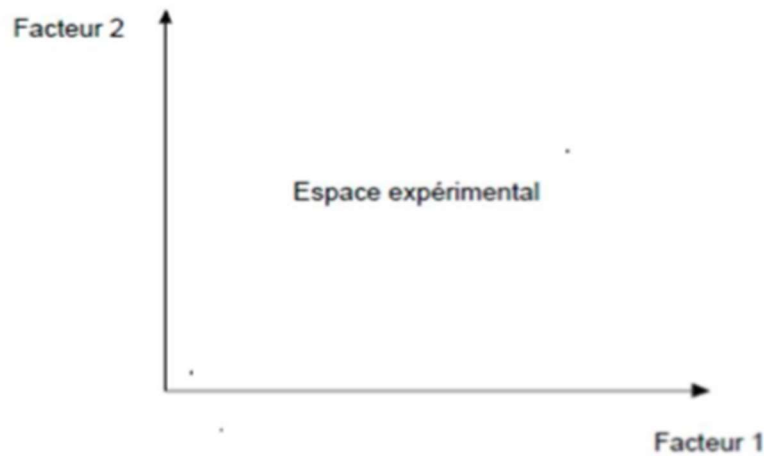


Figure 2-4 : Espace expérimental.

Domaine expérimental ou domaine d'étude : Le domaine expérimental est l'espace défini par les variations des facteurs quantitatifs et / ou par les combinaisons des modalités des facteurs qualitatifs.

Le domaine expérimental ou Domaine d'Etude (DE) peut être défini comme l'ensemble de tous les points de la surface délimitée par les niveaux bas et haut de chaque facteur, un espace k -dimensionnel, dans lequel chaque point représente une combinaison des valeurs possibles pour les k facteurs (Droesbeke, 1996 ; Vigier, 1988).

Lorsque $k = 2$, un carré est obtenu pour le DE. Les points expérimentaux sont alors situés aux quatre sommets du carré (figure 2-5).

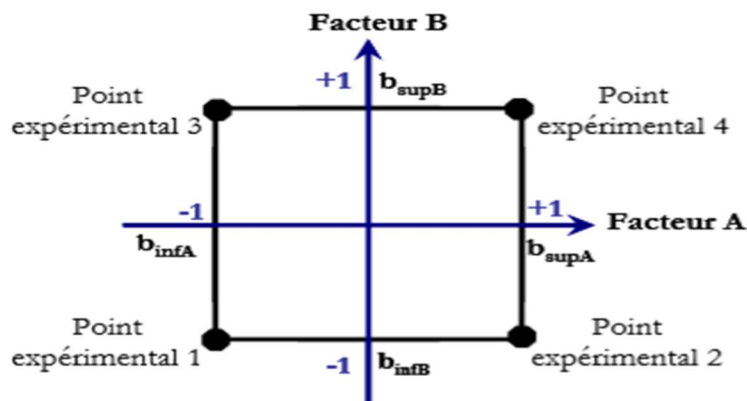


Figure 2-5 : Domaine d'étude d'un plan 2^2 .

Lorsque $k = 3$, nous obtenons un cube dont les huit sommets représentent les huit essais du plan (figure 2-6).

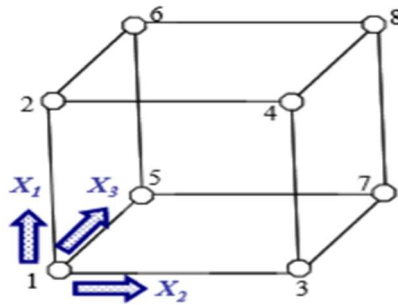


Figure 2-6 : Domaine d'étude d'un plan 2^3 .

Matrice d'expérience : Elle sert à définir et optimiser le nombre d'expériences requis pour faire un plan. Elles contiennent des valeurs codées, issues des valeurs réelles, et qui représentent les différents niveaux de facteurs, mis en jeu dans l'étude. C'est un tableau constitué de n lignes correspondant aux n expériences à réaliser et de k colonnes, correspondant aux k variables étudiées. L'élément X_{ij} de la matrice ainsi formé correspond à la valeur des niveaux que prend la $j^{\text{ième}}$ variable à l' $i^{\text{ième}}$ expérience (Rousselle, 2003).

Surface de réponse : La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un axe orthogonal à l'espace expérimental est alors attribué à la réponse. A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse (figure 2-7) (Goupy et Creighton, 2009).

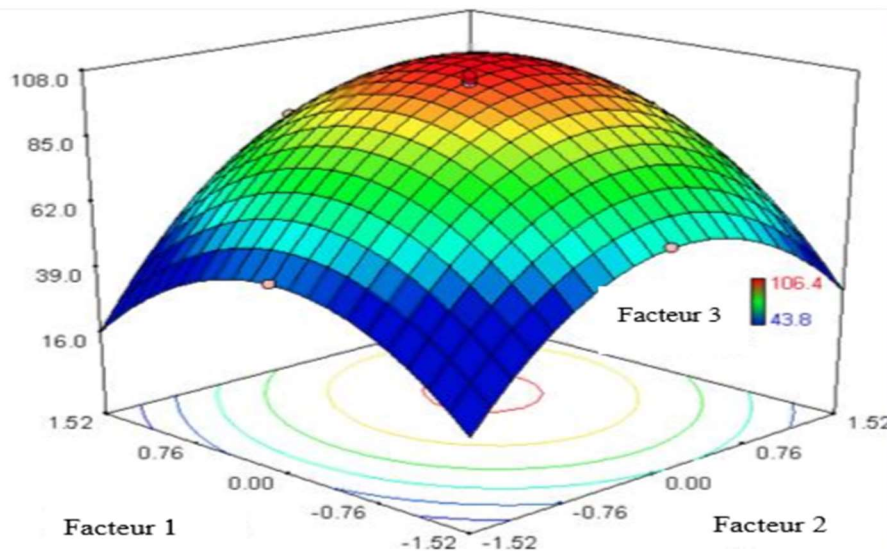


Figure 2-7 : Surface de réponse pour un plan à trois facteurs.

La projection de la surface de réponse sur un plan horizontal, donne un graphique d'iso contours, présenté sur la même figure (figure 2-7), qui affiche des lignes ou des régions colorées basées sur les valeurs de la réponse prévue.

2.5.2. Coordonnées centrées réduites

Lorsqu'on attribue la valeur -1 au niveau bas d'un facteur, la valeur 0 au niveau de base et la valeur +1 au niveau haut, on effectue deux modifications importantes :

- On change l'unité de mesure.
- On déplace l'origine des mesures.

Ces deux modifications entraînent l'introduction de nouvelles variables que l'on appelle variables centrées réduites (V.C.R). Centrées, pour indiquer le changement d'origine, et réduites pour signaler la nouvelle unité. Le passage des variables d'origine, A, aux variables centrées réduites, x, ou inversement, est donnée par la formule suivante :

$$x = \frac{A - A_0}{pas} \quad (2.4)$$

Où A_0 est la valeur centrale entre le niveau haut et le niveau bas et le Pas est égal à la moitié de la différence entre les deux niveaux.

L'intérêt des variables centrées réduites est de pouvoir présenter les plans d'expériences de la même manière quels que soient les domaines d'étude retenus et quels que soient les facteurs. (Goupy et Creighton, 2009).

2.5.3. Notion de modèle mathématique

Un modèle mathématique est une fonction, généralement, un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin, qui relie la réponse aux facteurs. Ses dérivés sont supposées constantes et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots \quad (2.5)$$

Où :

y : est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et est obtenue avec précision donnée.

x_i, x_j : représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai.

a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} : sont les coefficients du modèle mathématique adopté. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer, d'une part, toutes les réponses dans le domaine d'étude sans être obligé de réaliser les expériences et d'autres part, de rechercher l'extremum de la fonction mathématique (Goupy et Creighton, 2009).

2.5.4. Plans de Box-Behnken

Dans cette présente étude nous avons choisi de travailler avec le plan de Box-Behnken dont les variables ne prennent que 3 niveaux (-1, 0, +1). Ce choix est notamment motivé par le faible coût demandé : 15 expériences doivent être faites (tableau 2-1) dont 12 essais sont situés au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (figure 2-8) pour lesquels nous avons ajouté trois essais répétitifs au centre.

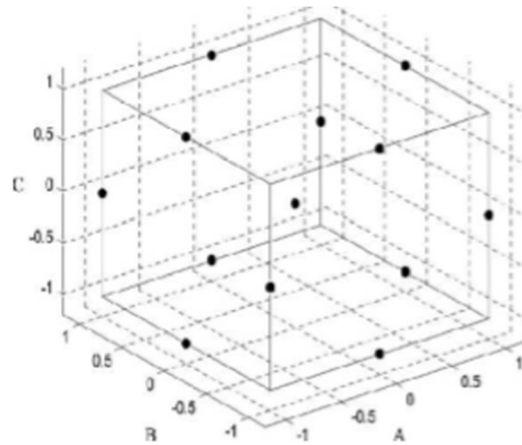


Figure 2-8 : Représentation graphique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs.

Tableau 2-1 : Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs.

N° essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
1	1	1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	-1	-1	0
5	1	0	1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	-1	0	-1
9	0	1	1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	-1	-1
13-15.	0	0	0

Le modèle mathématique obtenu à partir de ce plan comporte 10 coefficients :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2$$

(2.6)

Une fois le modèle établi, on doit procéder à une évaluation statistique pour vérifier sa validité et apprécier les effets individuels et conjugués des paramètres étudiés.

2.5.5. Tests de validité des modèles

2.5.5.1. Test de Fisher

C'est un test statistique qui permet de vérifier la validité d'un modèle mathématique. Le principe est relativement simple, il consiste à comparer la qualité de l'approximation donnée par le modèle, qui est exprimée par la variance résiduelle S^2_{res} à la variance S^2_{rep} relative à la dispersion des résultats autour de leurs valeurs moyennes.

Où la variance résiduelle est :

$$S^2_{\text{res}} = \frac{\sum_1^n (y_i - \bar{y})^2}{n - k} \quad (2.7)$$

Avec :

y_i : sont les valeurs expérimentales des essais répétitifs du système.

\bar{y} : est la moyenne des résultats des essais.

n : nombre d'essai effectué.

k : nombre de coefficient du modèle.

Et la variance de dispersion des résultats est :

$$S^2_{\text{rep}} = \frac{\sum_1^n (y'_i - \bar{y}_0)^2}{N - 1} \quad (2.8)$$

Avec :

y'_i : sont les valeurs expérimentales.

\bar{y}_0 : est la moyenne des résultats des essais répétitifs.

N : nombre d'essai répétitif effectué.

Par la suite, il suffit de calculer le rapport

$$F = \frac{S^2_{\text{res}}}{S^2_{\text{rep}}} \quad (2.9)$$

Et de le comparer à sa valeur critique F_α qui est tabulée (Table de Fisher donnée en Annexe 1).

On obtiendra deux cas de figure :

Si :

$F \leq F_\alpha$: Le modèle est valable

$F > F_\alpha$: Le modèle n'est pas valable

2.5.5.2. Test de la valeur-p

La valeur de p est la probabilité qui mesure le degré de certitude avec lequel il est possible d'invalider l'hypothèse nulle. Des probabilités faibles permettent d'invalider l'hypothèse nulle avec plus de certitude.

Pour déterminer si l'association entre la réponse et chacun des termes du modèle est statistiquement significative, comparer la valeur de p du terme au seuil de signification pour évaluer l'hypothèse nulle.

L'hypothèse nulle a un coefficient du terme égal à zéro, ce qui implique qu'il n'existe aucune association entre le terme et la réponse. En général, un seuil de signification (noté alpha ou α) de 0,05 fonctionne bien. Un seuil de signification de 0,05 indique un risque de 5 % de conclure à tort qu'il existe une association. (Site web [1]).

Valeur de $p \leq \alpha$: l'association est statistiquement significative.

Si la valeur de p est inférieure ou égale au seuil de signification, nous pourrions conclure que l'effet du facteur est significatif

Valeur de $p > \alpha$: l'association n'est pas statistiquement significative.

Si la valeur de p est supérieure au seuil de signification, Nous pourrions conclure que l'effet du facteur est non significatif.

2.5.6. Logiciel MINITAB18

MINITAB18 est un logiciel statistique mis au point, à l'origine, par le Département de Statistique de l'Université de Pennsylvanie (U.S.A.). Il est particulièrement bien adapté à l'analyse statistique de petits tableaux de données bien structurés : statistique descriptive, analyse de la variance, méthodes relatives à la corrélation et à la régression simple et multiple, séries chronologiques, tests d'indépendance, méthodes non paramétriques, analyse en composantes principales, analyse discriminante, contrôle statistique de la qualité, plans expérimentaux, etc (Claustrioux et Delvaux, 1994).

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Taux d'humidité

La détermination du taux d'humidité a été effectuée pour la matière végétale avant l'extraction, le résultat obtenu est représenté dans le tableau 3-1.

Tableau 3-1 : Taux d'humidité de feuilles d'*Olea europaea sylvestris*.

<i>Olea europaea sylvestris</i>	
Taux d'humidité (%)	8

3.2. Evaluation cinétique de l'extraction des composés hydrosolubles de feuilles d'*Olea europaea sylvestris*.

3.2.1. Cinétique d'extraction des antioxydants

3.2.1.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage des antioxydants

Afin de déterminer le pourcentage d'inhibition (I (%)) et l'indice d'activité antiradicalaire (IAA), nous avons utilisé une courbe d'étalonnage, établie au préalable, donnant l'évolution de l'absorbance des solutions méthanoïques du DPPH, en fonction de sa concentration, dans le domaine variant de 5 à 40 µg/mL. La courbe obtenue est représentée sur la figure 3-1.

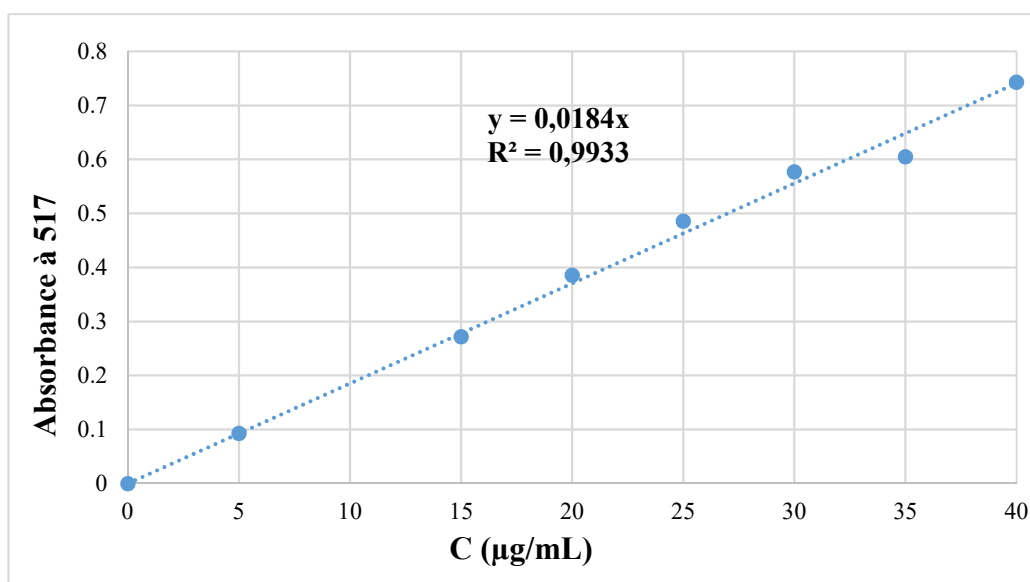


Figure 3-1 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du DPPH.

La courbe d'étalonnage dont l'équation $A = 0,0184.C_{DPPH}$, est utilisée pour l'estimation de la concentration finale de la solution du DPPH dans la cellule, au moment de la mesure de l'absorbance.

Avec : C_{DPPH} la concentration massique du DPPH exprimée en µg/mL.

3.2.1.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques

Pour le dosage des polyphénols totaux, une courbe d'étalonnage a été établie, donnant la variation de l'absorbance, en fonction des concentrations des solutions diluées d'acide gallique, allant de 3 à 30 µg/mL (figure 3-2).

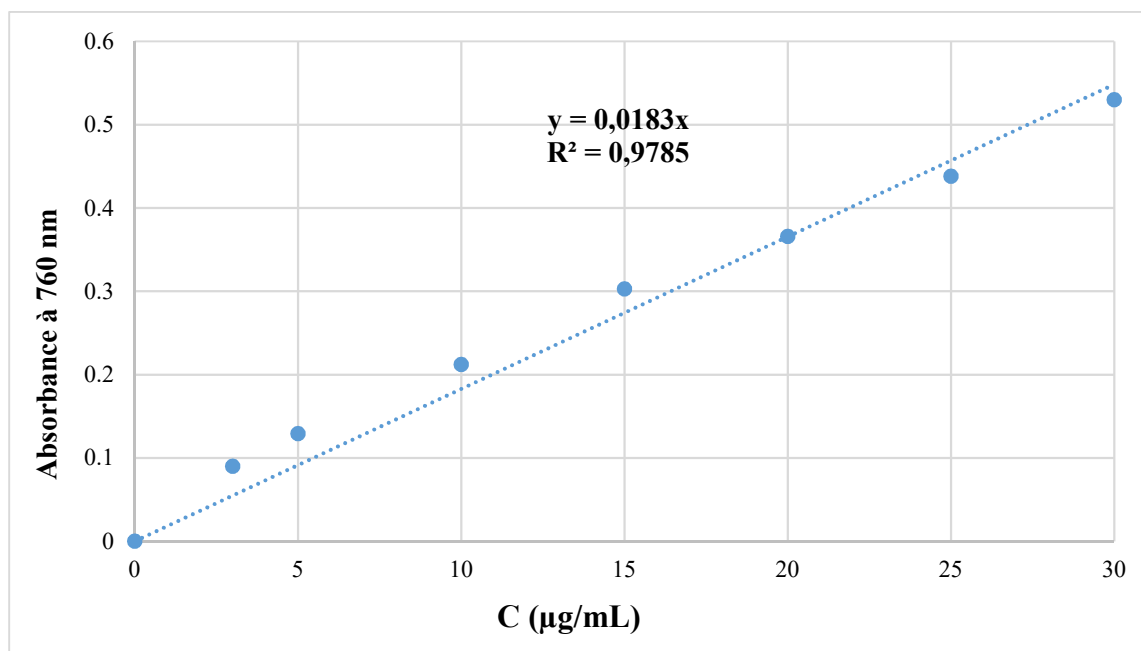


Figure 3-2 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique.

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique : $A = 0,0183C_{AG}$.

Avec : C_{AG} la concentration massique de l'acide gallique exprimée en $\mu\text{g/mL}$.

3.2.1.3. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

De même que pour les antioxydants et les polyphénols totaux, une courbe d'étalonnage a été établie, donnant la variation de l'absorbance, en fonction des concentrations des solutions diluées de quercétine, allant de 5 à 40 $\mu\text{g/mL}$ (figure 3-3).

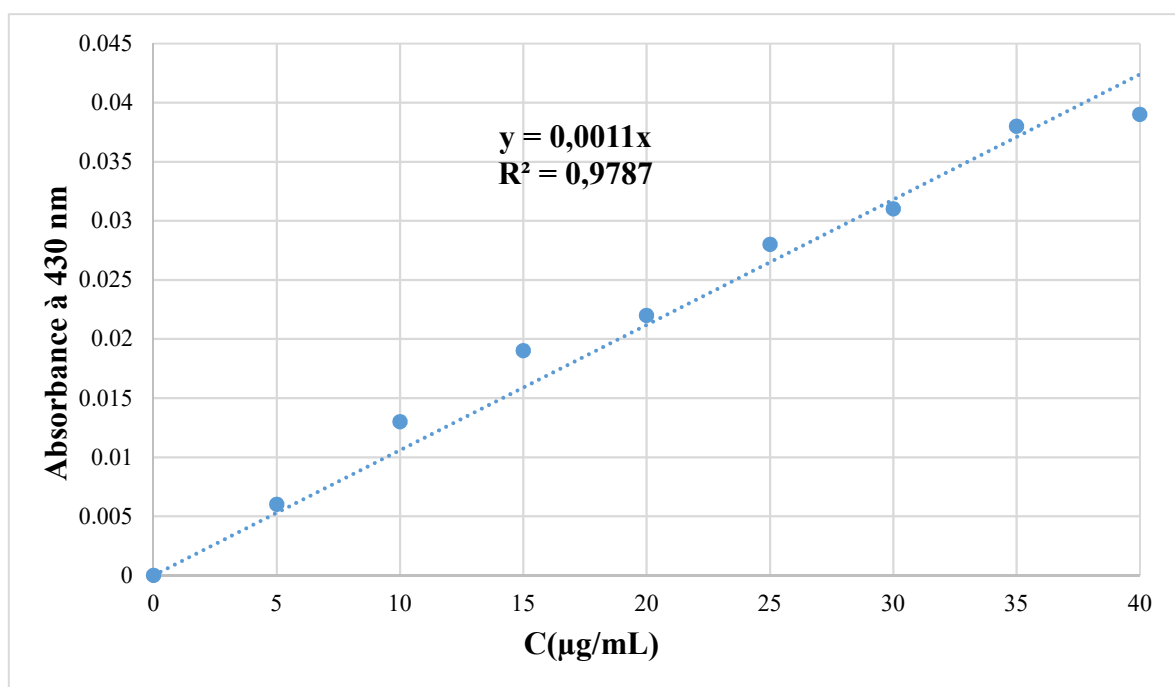


Figure 3-3: Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en quercétine.

La teneur en flavonoïdes est calculée à partir de l'équation : $A = 0,0011C_Q$.

Avec : C_Q la concentration massique de la quercétine exprimée en $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Mise en œuvre de la cinétique d'extraction

Dans le but d'établir la cinétique d'extraction des antioxydants, des composés phénoliques et flavonoïdes, un dosage par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, de Folin-Ciocalteu et d' AlCl_3 a été effectué respectivement, pour divers échantillons prélevés à différents temps avec un hydromodule de 10 g/ 100 mL de solvant et une température fixée à 60°C. Le tableau 3-2 résume les résultats obtenus en fonction du temps.

Tableau 3-2 : Le pourcentage d'inhibition, la Teneur en polyphénols totaux (PT) et en flavonoïdes en fonction du temps.

Temps, Min	I (%)	Teneur en PT (mg EAG/g Ms)	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/ g Ms)
0	0	0	0
2	38.56	113.44	39.52
5	85.22	135.42	45.45
10	84.98	157.94	49.40
20	76.98	172.24	47.42
30	77.21	168.68	47.43
45	83.83	155.61	45.45
60	82.91	159.18	47.41
75	82.75	156.95	49.40
90	82.52	156.03	47.43
100	82.83	155.52	47.43

. Les antioxydants

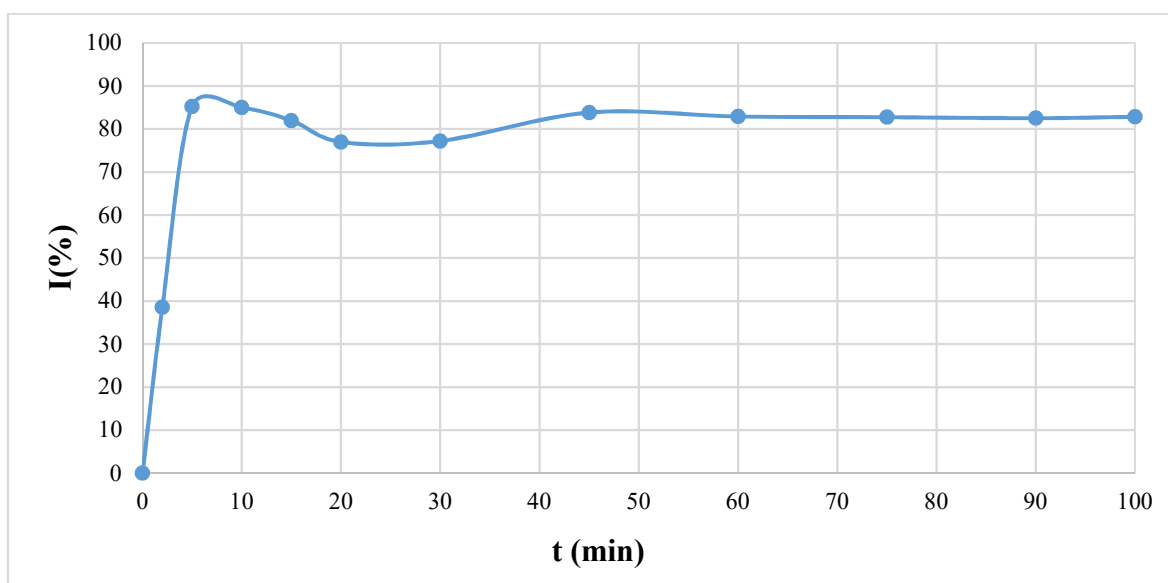


Figure 3-4 : Cinétique d'extraction des antioxydants de feuilles d'*Olea Europaea Sylvestris*.

L'examen de la figure 3-4 suggère que la cinétique d'extraction peut être subdivisée en 3 parties :

- La première, allant de 0 à 5 minutes, qui correspond à une évolution extrêmement rapide du pourcentage d'inhibition.
- La deuxième, allant de 5 à 20 minutes, ou une légère diminution du pourcentage d'inhibition est à déplorer, cette diminution serait due à une redéposition de certaines molécules dans la matière solide.
- La troisième partie, pour des temps plus prolongées, le pourcentage d'inhibition présente une très faible variation suivi d'un palier, ce qui reflète l'état d'équilibre.

• Teneur en Polyphénols totaux

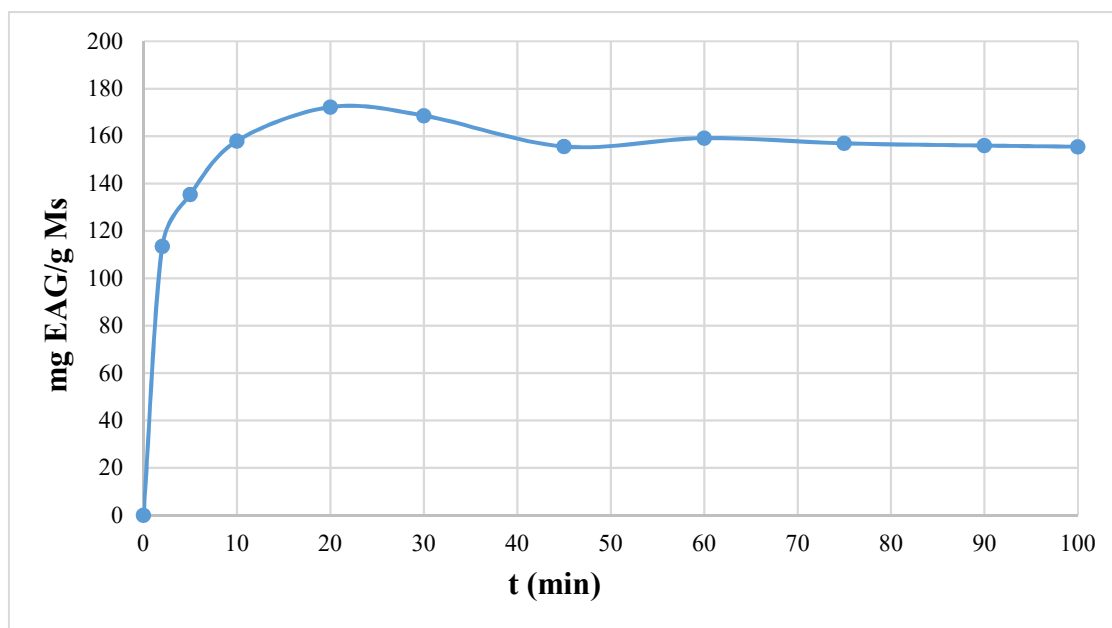


Figure 3-5 : Courbe cinétique d'extraction des polyphénols totaux de feuilles d'*Olea Europaea Sylvestris*.

L'évolution de la concentration en polyphénols totaux en fonction du temps, représentée sur la figure 3-5, peut-être elle aussi divisée en deux parties :

- La première, allant de 0 à 20 minutes, ou l'évolution de la concentration des polyphénols totaux est très rapide.
- La seconde partie, au-delà de 20 minutes, présente une tangente horizontale qui est due à l'inversion de la force motrice du processus, qui peut être expliquée par le passage total des composés phénoliques de la phase solide à la phase liquide.

• Teneur en Flavonoïdes

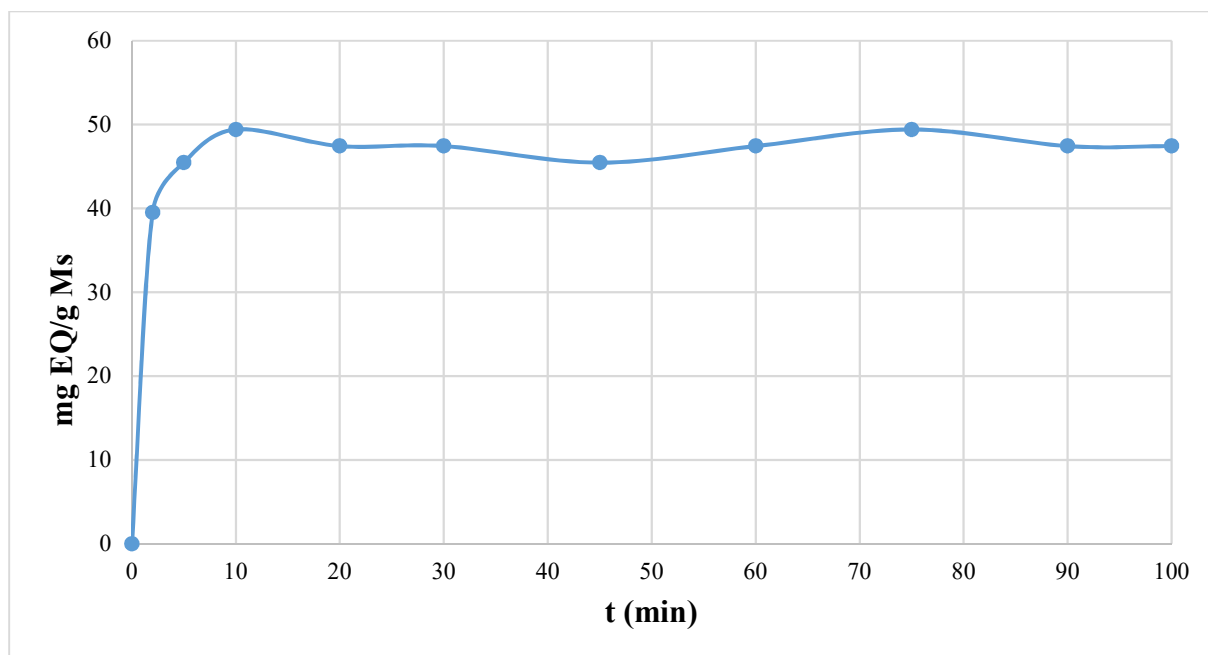


Figure 3-6 : Courbe cinétique d'extraction des flavonoïdes de feuilles d'*Olea Europaea Sylvestris*.

De même pour les flavonoïdes, l'évolution de la concentration en fonction du temps (figure 3-6) est subdivisée en deux parties :

- La première, allant de 0 à 10 minutes, ou l'évolution de la teneur des flavonoïdes est extrêmement rapide.
- La seconde, au-delà de 10 minutes, présente un palier stable, qui peut être expliqué par le passage total des flavonoïdes de la phase solide vers la phase liquide.

3.3. Elaboration du plan d'expérience pour l'extraction des composés hydrosolubles de feuilles d'*Olea Europaea Sylvestris*.

3.3.1. Choix des paramètres et des critères d'optimisation

La température, l'hydromodule et la durée d'extraction sont les principaux vecteurs expérimentaux dans l'étude de l'extraction solide-liquide. Ils sont indépendants, continus, expérimentalement accessibles et quantitativement mesurables, d'où le choix comme variables d'entrée ou paramètres à optimiser.

Quant aux critères d'optimisation, ou grandeurs d'intérêt, appelés encore réponse, le choix s'est porté sur la concentration des polyphénols totaux, exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche (mg EAG/g Ms), la concentration des flavonoïdes, exprimée en milligrammes équivalent de quercétine (EQ) par gramme de matière sèche (mg EQ/g Ms), et l'indice d'activité antiradicalaire IAA. Ces trois critères d'optimisation sont, eux aussi, quantitativement mesurables. Cependant, l'indice d'activité antiradicalaire IAA renseigne sur le potentiel antioxydant des extraits et est, donc, une réponse qualitative, tout en demeurant quantitativement mesurable.

3.3.2. Choix du plan d'expérience et du modèle mathématique

Pour l'étude de l'influence des différents facteurs sur les réponses choisies, nous avons ciblé le plan de Box-Behnken qui comporte 12 essais situés au milieu de chacun des côtés du cube et trois essais répétitifs au centre. L'ensemble des combinaisons des différents niveaux de facteurs ont été réalisées au cours de l'expérience. Les trois facteurs choisis ont été étalés sur l'intervalle (-1 0 et +1). Les résultats des essais programmés et réalisés ont permis l'élaboration d'un modèle mathématique de second ordre.

3.3.3. Domaine d'étude

Compte tenu de la capacité de l'installation et des résultats des essais sur l'extraction des antioxydants. Les niveaux inférieurs, supérieurs et le centre des paramètres à optimiser ont été fixés et regroupés dans le tableau ci-dessus (tableau 3-2).

Tableau 3-3 : Niveaux inférieurs, central et supérieurs des paramètres à optimiser.

Paramètres	Niveaux		
	Niveau bas (-1)	Niveau central (0)	Niveau haut (+1)
Température (°C)	40	60	80
Hydromodule (g/100mL)	5	10	15
Durée de l'extraction (min)	30	60	90

Des échantillons représentatifs de même taux d'humidité, égale à 8%, ont été utilisés pour les 15 essais prévus par le plan Box-Behnken. Ces derniers ont été réalisés en espace de 5 jours. Il s'en suit, des expériences pour déterminer la concentration en polyphénols totaux de l'extrait en mg EAG/g Ms, le concentrat en flavonoïdes en mg EQ/g Ms et l'indice d'activité anti-radicalaire IAA. Ce travail a permis l'élaboration d'un modèle mathématique pour chaque réponse et l'appréciation des effets individuels, conjugués et quadratiques des trois paramètres étudiés.

3.4. Modélisation

3.4.1. Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire

3.4.1.1. Evaluation du potentiel des antioxydants des extraits de feuilles d'*Olea Europaea Sylvestris*

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits récupérés, lors de l'extraction des composés phénoliques de feuilles d'*Olea Europaea Sylvestris* a été réalisée en termes de capacité de piégeage des radicaux en suivant la réduction de l'absorbance d'une solution méthanoïque de DPPH qui s'accompagne par un passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. L'intensité de cette couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu fournisseur de protons (Maisuthiasakul et al., 2007).

3.4.1.1.1. Détermination de la concentration (IC₅₀)

Afin de déterminer la concentration, en µg/mL, des extraits nécessaires à la diminution de l'absorbance du DPPH de 50%, nous avons préparé des solutions aqueuses des extraits, de différente concentration en µg/mL. Les mesures de l'absorbance de la solution méthanoïque du DPPH pur et en présence de l'échantillon à tester ont été effectuées.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes, à partir desquelles les pourcentages d'inhibition I(%) obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur de l'IC₅₀ pour chaque extrait ont été déterminés.

3.4.1.1.2. Modélisation des résultats

Les indices d'activité antiradicalaire de l'ensemble des extraits testés, sont rapportés dans le tableau 3-4.

Tableau 3-4: Valeurs des IC₅₀ et des IAA des extraits de feuilles d'*Olea Europaea Sylvestris*.

Essai	Température (°C)	Hydromodule (g/100mL)	Temps (min)	IC ₅₀ (µg/mL)	IAA
1	60	5	30	16,5	2,2
2	60	5	90	16	2,25
3	60	15	30	14	2,57
4	60	15	90	13	2,77
5	40	10	30	30	1,2
6	40	10	90	17	2,12
7	80	10	30	10	3,6
8	80	10	90	8	4,5
9	40	5	60	35	1,03
10	40	15	60	32	1,13
11	80	5	60	12	3
12	80	15	60	11,8	3,06
13	60	10	60	11,5	3,13
14	60	10	60	11,3	3,19
15	60	10	60	11,7	3,08

L'examen des valeurs du tableau 3-4, suscite les remarques suivantes :

- L'indice d'activité antiradicalaire des échantillons obtenus par les essais 5, 9 et 10 est compris entre 1 et 2 d'où une forte activité antiradicalaire, et ceux obtenus par les essais restants sont tous supérieures à 2 ce qui permet de conclure que les extraits de l'*Olea Europaea Sylvestris* de ces échantillons possèdent une très forte activité antiradicalaire (Scherer et Gidoy, 2009).
- Une valeur maximale de l'indice d'activité antiradicalaire est égal à 4,50 qui est supérieure à celui de l'acide ascorbique, IAA = 4,48 (Haddou et Hamouche, 2012) qui compte parmi les antioxydants les plus puissants.
- Les valeurs obtenues pour les IC₅₀ de l'*Olea europaea sylvestris* sont globalement de même ordre de grandeur que ceux trouvés par Bouabdallah en 2014.

L'équation (3.1) du modèle mathématique, donnant l'évolution de l'indice d'activité antiradicalaire, en fonction de la température, l'hydromodule et le temps de l'extraction, est donnée par le logiciel MINITAB18 :

$$IAA = -1,96 + 0,0321.T + 0,881.H - 0,0426 .tp - 0,000165 .T^2 - 0,04695 H^2 + 0,000236 .tp^2 + 0,00206 .T.H - 0,000159 .T.tp + 0,00115 H.tp \quad (3.1)$$

Nous constatons que l'effet individuel de la température et l'hydromodule ont des effets positifs influençant de manière très significative sur l'IAA, suivi par l'effet individuel du temps et l'effet quadratique d'hydromodule qui ont des effets négatifs. Cependant les autres effets peuvent être négligés.

3.4.2. Modélisation de la teneur en polyphénols totaux

Afin de pouvoir appliquer la méthode de Folin-Ciocalteau pour le dosage des polyphénols totaux, une courbe d'étalonnage a été établie au préalable (figure 3-2). Cette dernière nous a permis de déterminer les quantités des polyphénols totaux contenues dans les échantillons de feuilles d'olivier sauvages présentés dans le tableau suivant (tableau 3-5).

Tableau 3-5 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits de feuilles d'*Olea europaea sylvestris*.

Essai	Température (°C)	Hydromodule (g/100mL)	Temps (min)	Teneur en polyphénols (mg EAG/g Ms)
1	60	5	30	83,74
2	60	5	90	85,53
3	60	15	30	87,31
4	60	15	90	90,28
5	40	10	30	60,18
6	40	10	90	68,10
7	80	10	30	150,35
8	80	10	90	168,68
9	40	5	60	54,64
10	40	15	60	57,02
11	80	5	60	107,70
12	80	15	60	110,47
13	60	10	60	122,35
14	60	10	60	118,79
15	60	10	60	111,07

L'examen des valeurs du tableau 3-5, suscite les remarques suivantes :

- La teneur en polyphénols totaux varie sensiblement, en fonction de la température, l'hydromodule et le temps d'extraction : entre 54.64 et 168.68 mg EAG /g Ms. Des études ont montré que cette teneur pouvait varier de 2,8 mg /g Ms selon l'étude menée par Altiok en 2008, jusqu'à une valeur de 250 mg /g Ms selon les travaux effectués par Mylonaki en 2008.
- L'essai 8 a fourni la valeur maximale en teneur de polyphénols totaux, égal à 168.68mg EAG/g Ms.

L'équation (3.2) du modèle mathématique, donnant l'évolution de la teneur en polyphénols totaux, en fonction de la température, l'hydromodule et le temps de l'extraction, est donnée par le logiciel MINITAB18 :

$$TP = -156 + 3,09.T + 24,26.H - 0,05.tp - 0,0125 .T^2 - 1,205 H^2 - 0,00084 tp^2 + 0,0010 .T.H + 0,0043 .T.tp + 0,0020 .H.tp \quad (3.2)$$

Comme dans le cas de l'IAA, les effets individuels de la température et l'hydromodule sont positifs et ils sont les plus influents sur la teneur en composés phénoliques, suivi par l'effet quadratique de l'hydromodule qui est négatif. Cependant les autres effets peuvent être négligés.

3.4.3. Modélisation de la teneur en flavonoïdes

Dans le but d'appliquer la méthode d'AlCl₃ pour le dosage des flavonoïdes, nous avons établi au préalable une courbe d'étalonnage (figure 3-3), donnant la variation de l'absorbance en fonction des concentrations des solutions diluées de la quercétine.

Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités de flavonoïdes contenues dans les extraits de feuilles d'olivier sauvages rapportés dans le tableau 3-6.

Tableau 3-6 : Teneur en flavonoïdes dans les extraits de feuilles d'*Olea europaea sylvestris*.

Essai	Température (°C)	Hydromodule (g/100mL)	Temps (min)	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g Ms)
1	60	5	30	19.49
2	60	5	90	22.13
3	60	15	30	26.88
4	60	15	90	29.24
5	40	10	30	16.86
6	40	10	90	17.39
7	80	10	30	53.02
8	80	10	90	55.33
9	40	5	60	11.06
10	40	15	60	15.81
11	80	5	60	30.03
12	80	15	60	37.94
13	60	10	60	41.10
14	60	10	60	39.15
15	60	10	60	41.23

L'examen des valeurs du tableau 3-6, nous a permis de formuler les remarques suivantes :

- La teneur en flavonoïdes dans l'extrait varie en fonction de la température, l'hydromodule et le temps de l'extraction : entre 11,06 et 55.33 mg EQ /g Ms. Ces valeurs sont de même ordre de grandeur que ceux trouvés dans la littérature.
- L'essai 8 a fourni la valeur maximale en teneur en flavonoïdes, égal à 55.33 mg EQ/g Ms.

L'équation (3.3) du modèle mathématique, donnant l'évolution de la teneur en flavonoïdes totaux, en fonction de la température, l'hydromodule et le temps de l'extraction, est donnée par le logiciel MINITAB18 :

$$TF = -93,6 + 1,432 \cdot T + 11,43 \cdot H + 0,267 \cdot tp - 0,00696 \cdot T^2 - 0,560 \cdot H^2 - 0,00229 \cdot tp^2 + 0,0079 \cdot T \cdot H + 0,00074 \cdot T \cdot tp - 0,0005 \cdot H \cdot tp \quad (3.3)$$

Comme dans les modèles relatifs à l'IAA et à la teneur en polyphénols totaux, Nous observons que, les effets individuels de la température et l'hydromodule sont les plus influent sur la teneur en flavonoïde suivi par l'effet quadratique de l'hydromodule. Cependant les autres effets peuvent être négligés.

3.5. Validation des modèles mathématiques

3.5.1. Test de Fisher

Pour pouvoir trancher sur la validité du modèle mathématique proposé par le logiciel MINITAB18, une comparaison entre la variance résiduelle et la variance de reproductibilité a été faite, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau (3-7), les valeurs tabulées de F_α sont données en Annexe 1.

Tableau 3-7 : Résultats du test de Fisher pour la modélisation des IAA, des composés polyphénols totaux et des flavonoïdes.

	Activité antiradicalaire	Teneur en polyphénols totaux	Teneur en flavonoïdes
Variable	Valeur		
S^2_{res}	0.28	351.38	95.13
S^2_{rep}	8.65	10466.80	2075.87
F	0.03	0.03	0.04
F_α	19.3	19.3	19.3

A partir du tableau 3-7, nous obtenons $F < F_\alpha$

Nous pouvons donc dire que le modèle mathématique est parfaitement valable.

3.5.2. Valeur-p pour la validation des coefficients

L'évaluation des modèles mathématiques a été effectuée par analyse de la variance (ANOVA) à l'aide du logiciel MINITAB18. Le tableau 3-8 représente les valeurs de la probabilité p permettant de vérifier la signification statistique de chaque effet des facteurs étudiés, ainsi que les coefficients de corrélation R^2 et R^2_{ajust} .

Tableau 3-8 : Coefficients du modèle et leurs valeur-p pour les IAA, les composés polyphénols totaux et les flavonoïdes.

Effet	Valeur-p		
	IAA	TP	TF
Modèle	0.013	0.017	0.011
T	0.019	0.001	0.001
H	0.005	0.752	0.129
tp	0.043	0.477	0.623
T ²	0.759	0.530	0.358
H ²	0.002	0.010	0.004
tp ²	0.343	0.923	0.489
T.H	0.338	0.989	0.777
T.tp	0.646	0.730	0.873
H.tp	0.418	0.968	0.980
$R^2(\%)$	94.15	93,48	94,70
$R^2_{ajust}(\%)$	83.63	81,75	85,16

Les modèles mathématiques établis, à l'aide du logiciel MINITAB18 pour les trois principaux paramètres d'extraction, en éliminant les coefficients non significatifs, s'écrivent comme suit :

$$IAA = -1,96 + 0,0321.T + 0,881.H - 0,0426 .tp - 0,04695 H^2 \quad (3.1)$$

$$TP = -156 + 3,09.T - 1,205 H^2 \quad (3.2)$$

$$TF = -93,6 + 1,432.T - 0,560 .H^2 \quad (3.3)$$

Interprétations

En ce qui concerne l'activité antiradicalaire, la valeur $p=0,013$ pour le modèle indique qu'il est significatif. Pour les effets linéaires, la température ($p=0,019<0,05$), l'hydromodule ($p= 0,005$) et le temps d'extraction ($p=0,043$) ont tous un effet assez significatif.

Quant aux effets quadratiques, l'hydromodule est le seul facteur ayant un effet significatif ($p=0,002$), la température ($p=0,759$) et le temps d'extraction ($0,343$) sont négligeable. Par contre, les effets conjugués ont un effet non significatif, du fait que les valeurs de p de chacun d'entre eux sont supérieures à $0,05$.

La valeur $p=0,017$ pour le modèle de la teneur en polyphénols totaux indique qu'il est significatif. Concernant les effets linéaires, la température ($p=0,001<0,05$) a un effet très significatif, par contre, l'hydromodule ($p= 0,752$) et le temps d'extraction ($p=0,477$) ont un effet non significatif. En ce qui est des effets quadratiques, l'hydromodule est le seul facteur ayant un effet significatif ($p=0,01$), la température ($p=0,53$) et le temps d'extraction ($0,923$) sont quant à eux négligeable. En revanche, les effets conjugués ont un effet non significatif, du fait que les valeurs de p de chacun d'entre eux sont tous supérieurs à $0,05$.

Pour ce qui est de la teneur en flavonoïde, la valeur $p=0,011$ pour le modèle indique qu'il est significatif. Pour les effets linéaires, la température ($p=0,001<0,05$) a un effet très significatif, par contre, l'hydromodule ($p= 0,129$) et le temps d'extraction ($p=0,623$) ont un effet non significatif. Par ailleurs, l'effet quadratique de l'hydromodule est le seul facteur ayant un effet significatif ($p=0,004$), par contre la température ($p=0,358$) et le temps d'extraction ($0,489$) ont des effets quadratiques négligeables. En contrepartie, les effets conjugués ont tous un effet non significatif, du fait que les valeurs de p de chacun d'entre eux sont tous supérieurs à $0,05$.

Les valeurs des coefficients de détermination R^2 et R^2 (ajusté) pour les trois réponses sont satisfaisantes, cela indique que le modèle est bien ajusté. Il existe donc une bonne corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées.

3.5.3. Diagrammes de Pareto

Les figures 3-7, 3-8 et 3-9 représentent les diagrammes de Pareto des effets normalisés pour la modélisation des résultats obtenus, il permet d'extraire les paramètres les plus importants.

. Activité antiradicalaire

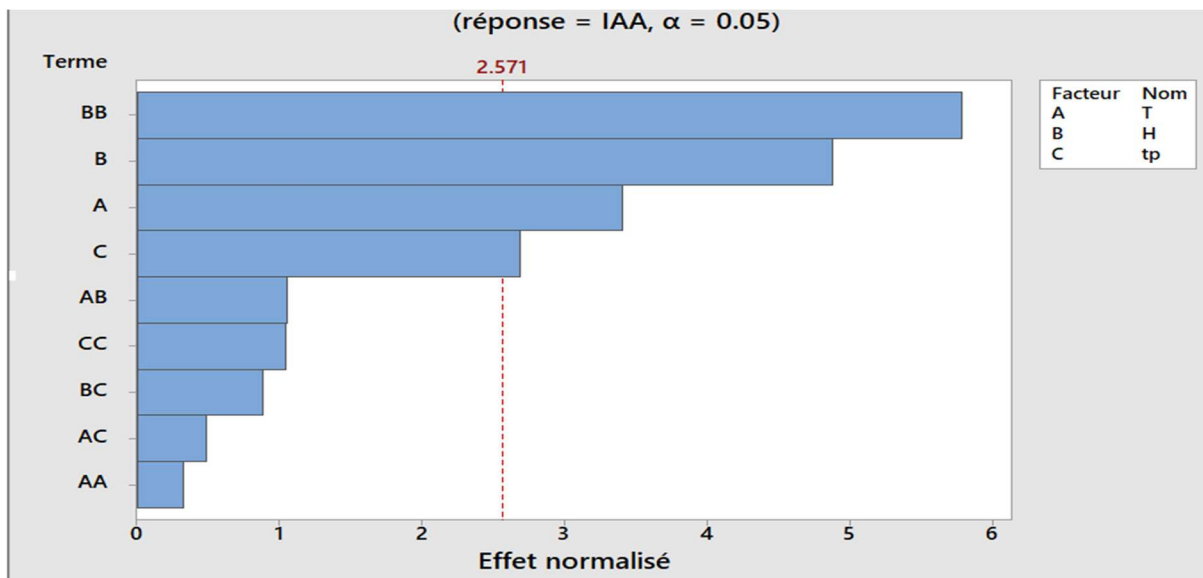


Figure 3-7: Diagramme de Pareto des effets normalisés pour la modélisation des IAA.

Au niveau de confiance choisi ($\alpha = 0,05$), l'effet quadratique de l'hydromodule (H^2) représente le facteur le plus influent sur la réponse. Les trois principaux facteurs qui sont la température (T), l'hydromodule (H) et le temps d'extraction (tp) apparaissent eux aussi comme des facteurs très influents.

. Teneur en polyphénols totaux

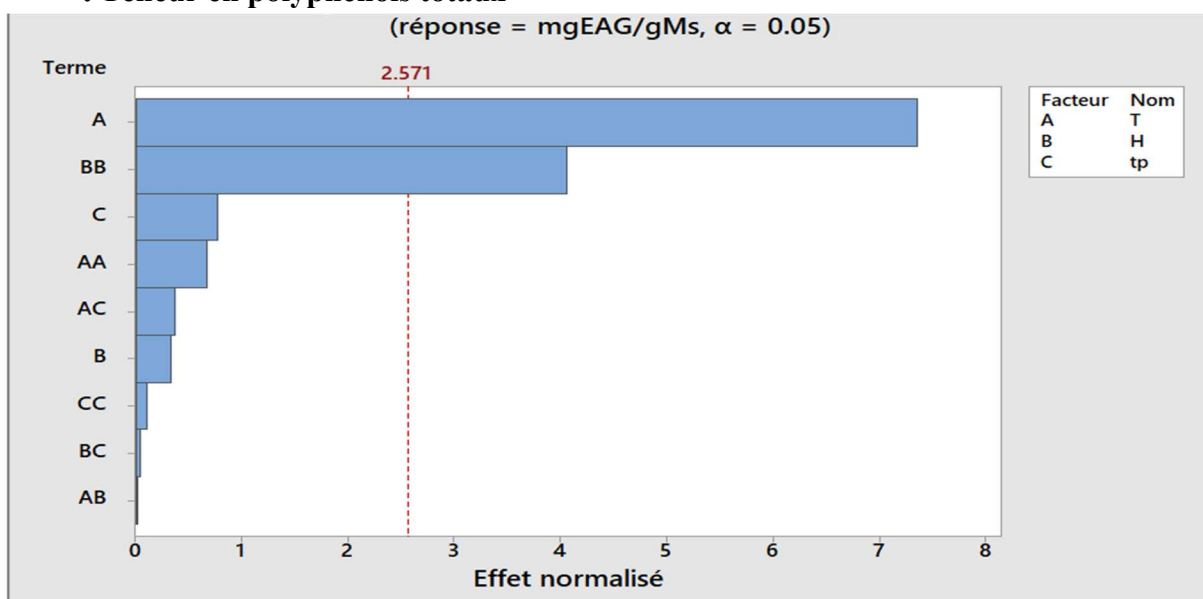


Figure 3-8 : Diagramme de Pareto des effets normalisés pour la modélisation de l'extraction des polyphénols totaux.

Au niveau de confiance choisi ($\alpha = 0,05$), la température (T), l'effet quadratique de l'hydromodule (H^2) sont ceux qui influencent le plus. En revanche, l'effet individuel du temps d'extraction semble ne pas avoir un impact très important.

. Teneur en flavonoïdes

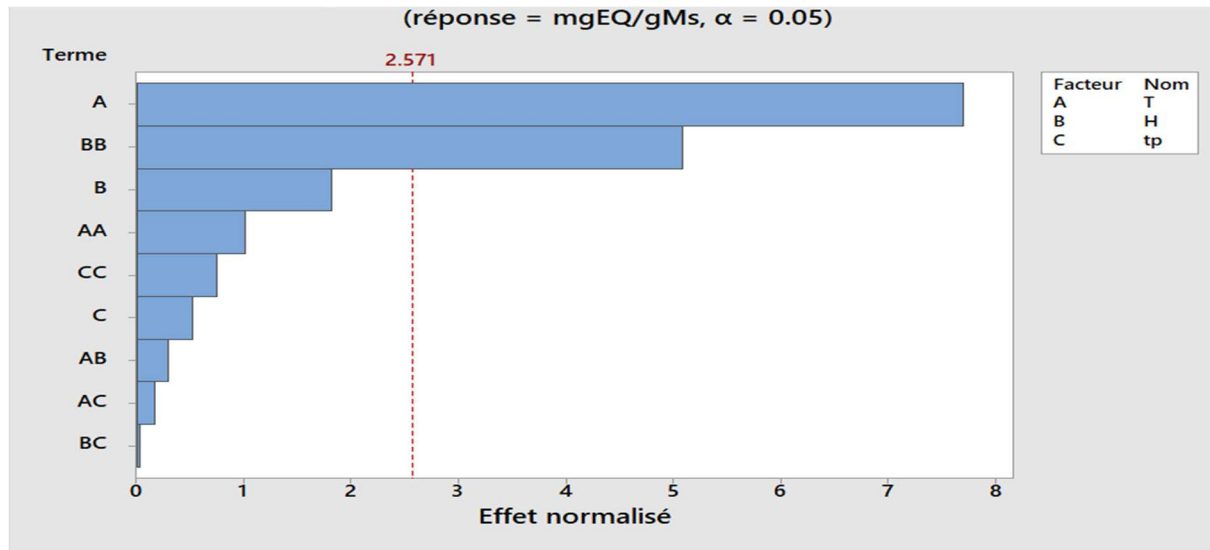


Figure 3-9 : Diagramme de Pareto des effets normalisés pour la modélisation de l'extraction des flavonoïdes.

Au niveau de confiance choisi ($\alpha = 0,05$), la température (T), l'effet quadratique de l'hydromodule (H^2) sont les plus influençant. En revanche, l'effet du temps d'extraction seul ne semble pas avoir un impact très important.

3.6. Optimisation

Cette étape consiste à trouver les valeurs optimales des réponses. A partir des modèles mathématiques obtenus à l'aide du logiciel MINITAB18.

3.6.1. Diagrammes des effets directs

Les figures 3-10, 3-11 et 3-12 représentent les effets directs des trois réponses. Ils illustrent la manière dont chaque facteur affecte indépendamment une réponse donnée.

. Indice d'activité antiradicalaire

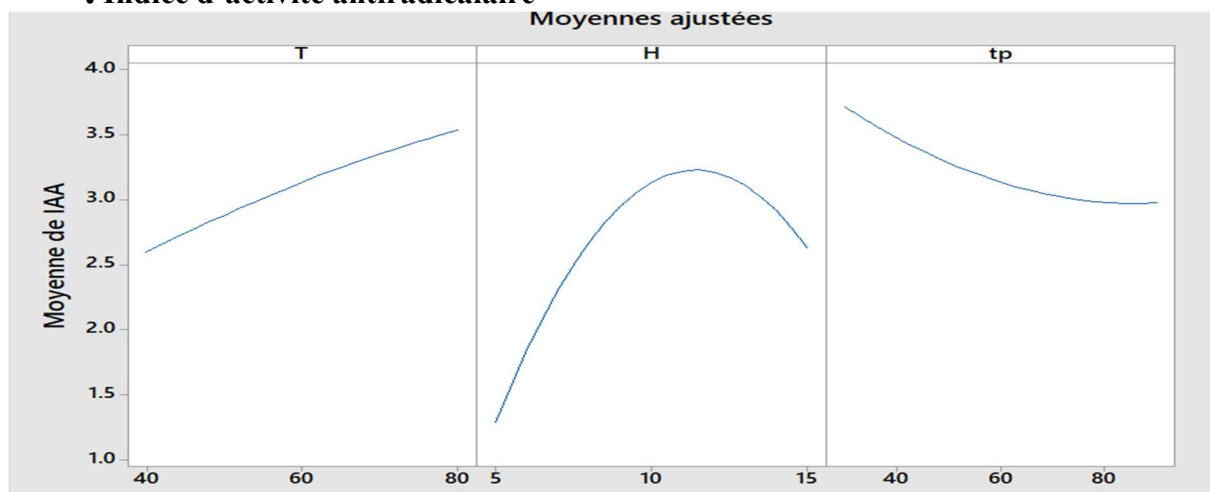


Figure 3-10: Graphique des effets directs de l'IAA.

En se basant sur la figure 3-10, nous pouvons dire que l'indice d'activité antiradicalaire est optimisé avec l'augmentation de la température. En ce qui est de l'hydromodule, ce dernier optimise la réponse du système avec une valeur moyenne de 10 à 13 g/100mL de solvant. Quant au temps d'extraction, plus il est bas, plus il donne des valeurs d'IAA élevées.

• Teneur en polyphénols totaux

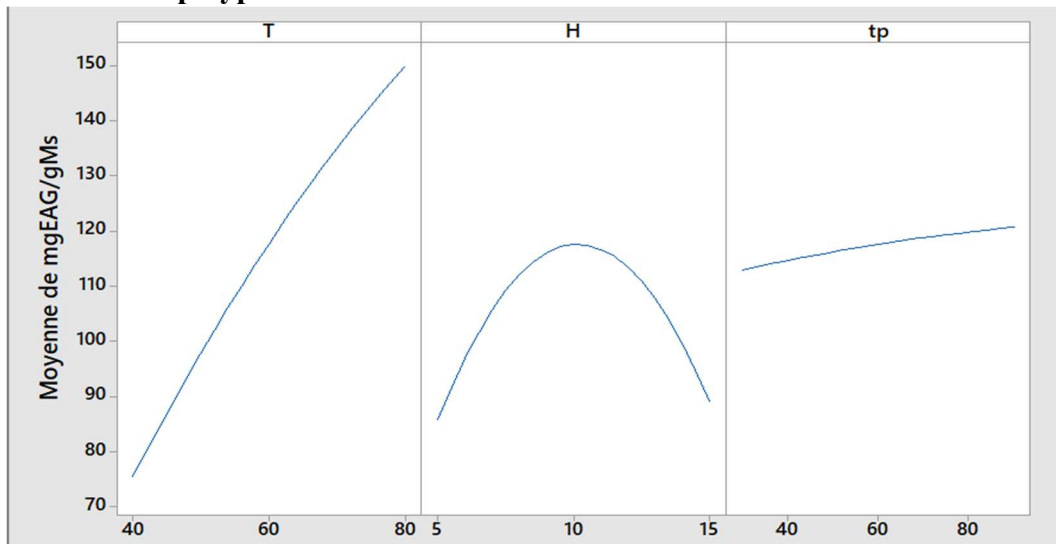


Figure 3-11: Graphique des effets directs pour la teneur en polyphénols totaux.

D'après la figure 3-11, plus la température est élevée plus la réponse est maximale. Pour l'hydromodule, la réponse est optimale pour une valeur moyenne de 10g/100mL.

En ce qui est du temps d'extraction, ce dernier semble ne pas affecter assez la réponse.

• Teneur en flavonoïdes

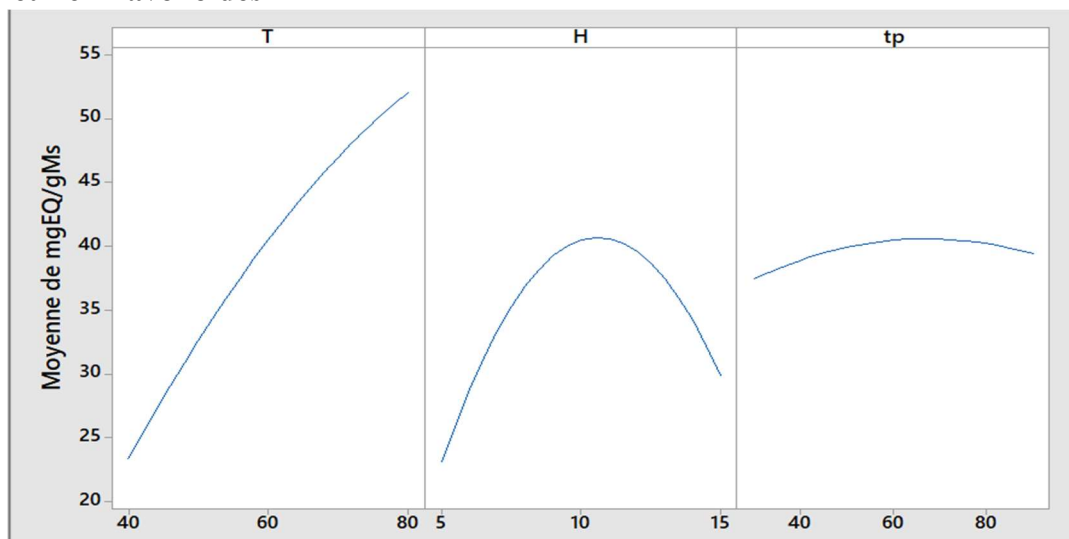


Figure 3-12: Graphique des effets directs pour la teneur en flavonoïdes.

La figure 3-12 indique que plus la température est élevée plus la réponse est optimisée. Pour l'hydromodule, elle admet un optimum si la valeur moyenne est entre 10 et 11 g/100mL. Quant au temps d'extraction, comme pour les polyphénols totaux, il semble ne pas affecter assez la réponse.

3.6.2. Surfaces de réponse

Les figures 3-13, 3-14 et 3-15 représentent les surfaces de réponse des trois critères d'optimisation étudiés.

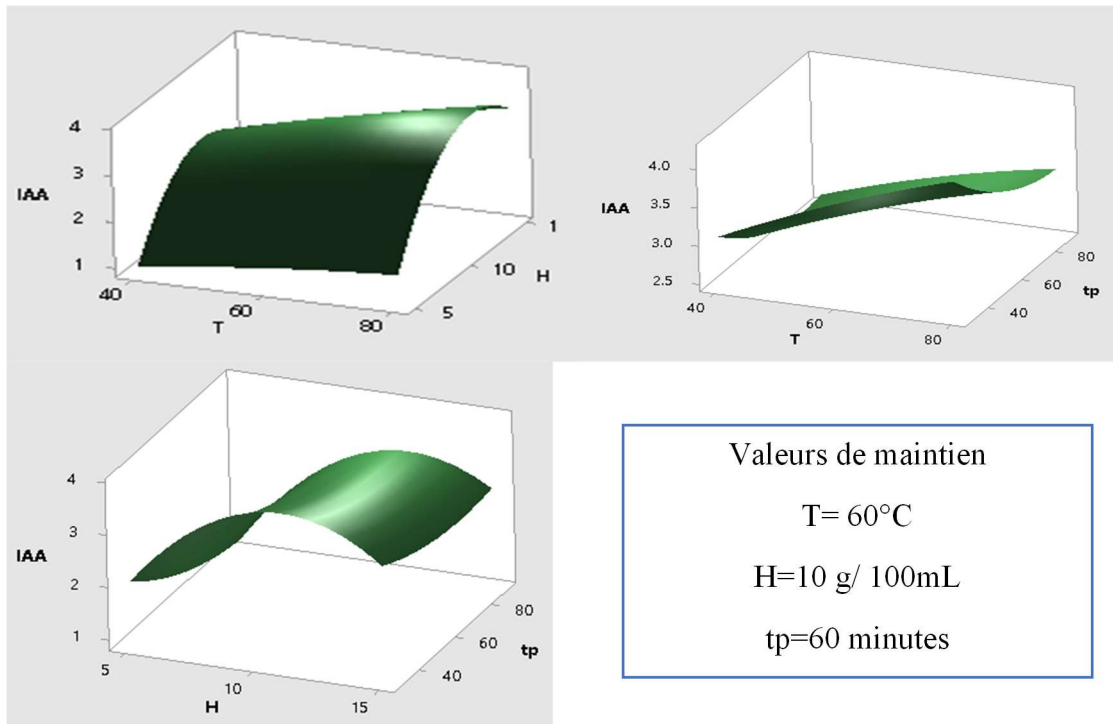


Figure 3-13: Surfaces de réponse des différents facteurs pour l'IAA.

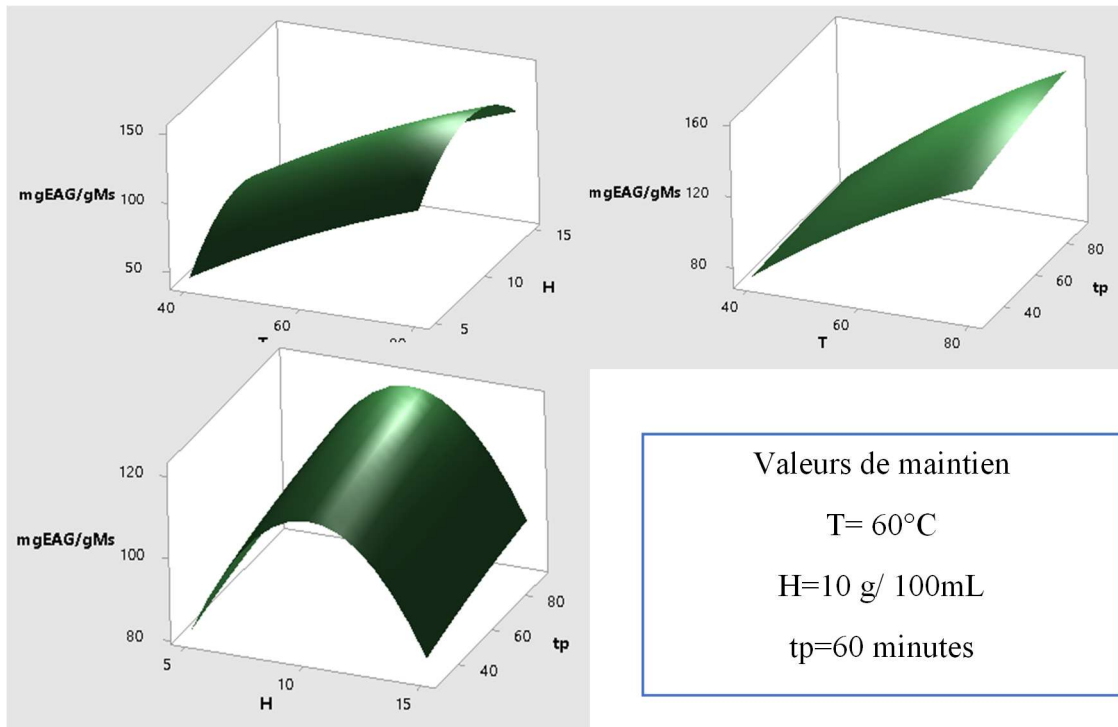


Figure 3-14: Surfaces de réponse des différents facteurs pour la teneur en polyphénols totaux.

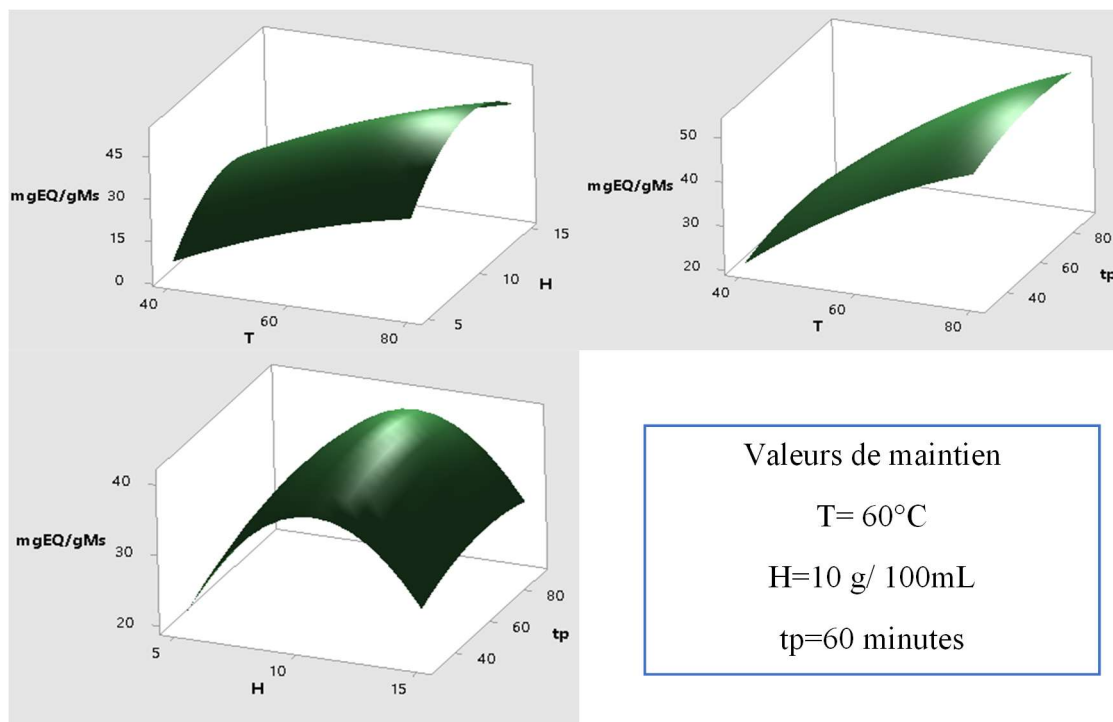


Figure 3-15: Surfaces de réponse des différents facteurs pour la teneur en flavonoïdes.

Interprétations

L'examen des surfaces de réponse des trois critères d'optimisation montrent que les optimums proposés par les graphiques des effets directs sont vérifiés. La durée d'extraction semble indifférente dans l'optimisation des teneurs en polyphénols totaux et des flavonoïdes, par contre, elle optimise l'IAA à des valeurs basses. Toutes les réponses sont optimisées avec l'augmentation de la température et avec un hydromodule intermédiaire (allant de 10 à 13 g/100mL de solvant).

Généralement, la température a un effet positif sur l'extraction des différents composés à partir de sources végétales (Bucic-Kojic *et al.*, 2007; Harbourne *et al.*, 2009; Spigno et Defaveri, 2007). Cet effet pourrait être expliqué par la plus grande solubilité de ces composés dans le solvant, une diffusivité plus élevée des molécules extraites, réduit sa viscosité et l'amélioration du transfert de matière à des températures plus élevées. Une augmentation de la température d'extraction pourrait aussi modifier la structure de la matrice végétale par l'augmentation de la perméabilité des parois cellulaires, affaiblir les interactions entre les composés phénoliques et les macromolécules (protéines, polysaccharides) et par conséquent faciliter le processus d'extraction (Prasad *et al.*, 2009; Al-Farsi et Lee, 2007).

3.6.3. Diagrammes de contour

Ces graphiques permettent de trouver la réponse optimale pour des facteurs conjugués. Ces derniers sont générés à l'aide du logiciel MINITAB18. Les figures 3-16, 3-17 et 3-18 représentent les graphiques de contours qui illustrent l'évolution de la réponse en fonction des niveaux des facteurs.

• Indice d'activité antiradicalaire

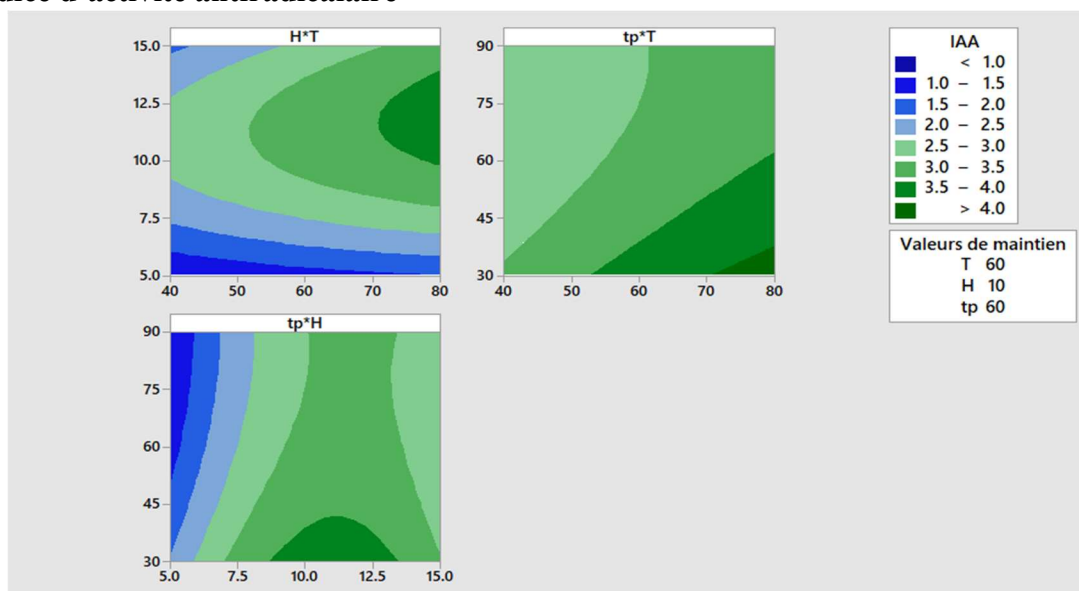


Figure 3-16: Diagrammes de contour pour l'activité antiradicalaire.

La réponse du système pour les facteurs température et hydromodule conjugués, est optimisée à une température supérieure à 70°C, affectée d'un hydromodule moyen allant de 10 à 13 g/100mL de solvant. Pour les facteurs temps et température conjugués, elle est optimale pour une température élevée (supérieure à 70°C), affectée d'un temps d'extraction relativement bas (inférieur à 40 minutes).

En ce qui concerne la réponse du système pour les facteurs temps et hydromodule conjugués, cette dernière est optimale avec un hydromodule variant entre 8 et 13 g/100mL de solvant, avec un facteur temps inférieur à 43 minutes.

. Teneur en Polyphénols totaux

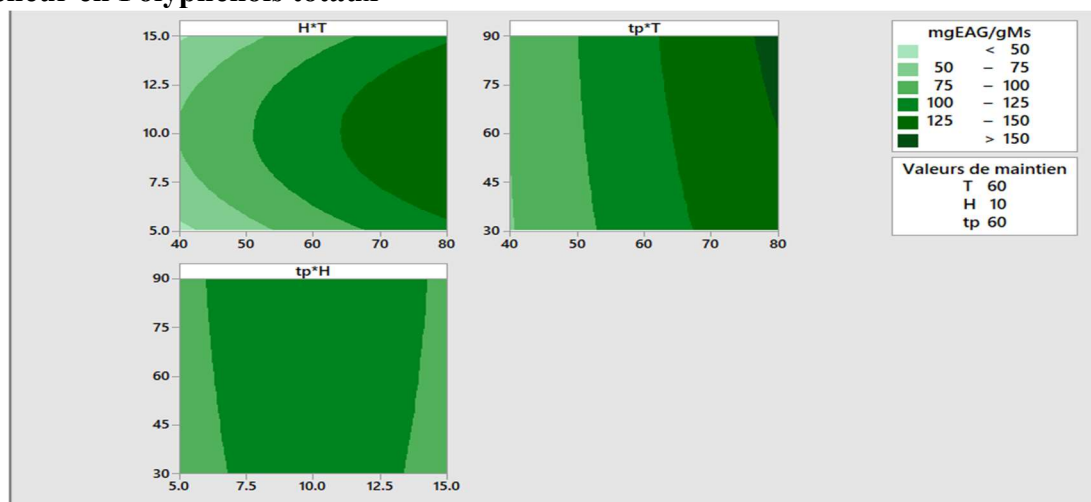


Figure 3-17: Diagrammes de contour pour la teneur en polyphénols totaux.

La réponse du système pour les facteurs température et hydromodule conjugués, est optimale pour des températures élevées, affectée d'un hydromodule moyen de 10g/100mL de solvant, de plus, si la température doit être réduite à des fins économique, nous pouvons dire que l'optimum se situe sur le point ayant pour température 65°C et un hydromodule de 10g/100mL de solvant. Pour les facteurs temps et température conjugués, cette réponse est optimisée quand les deux facteurs sont élevés. Enfin, concernant la réponse du système pour les facteurs temps et hydromodule conjugués, cette dernière est optimisée avec un hydromodule allant en moyenne de 6,5 à 13 g/100mL de solvant quel que soit le temps.

. Teneur en Flavonoïdes

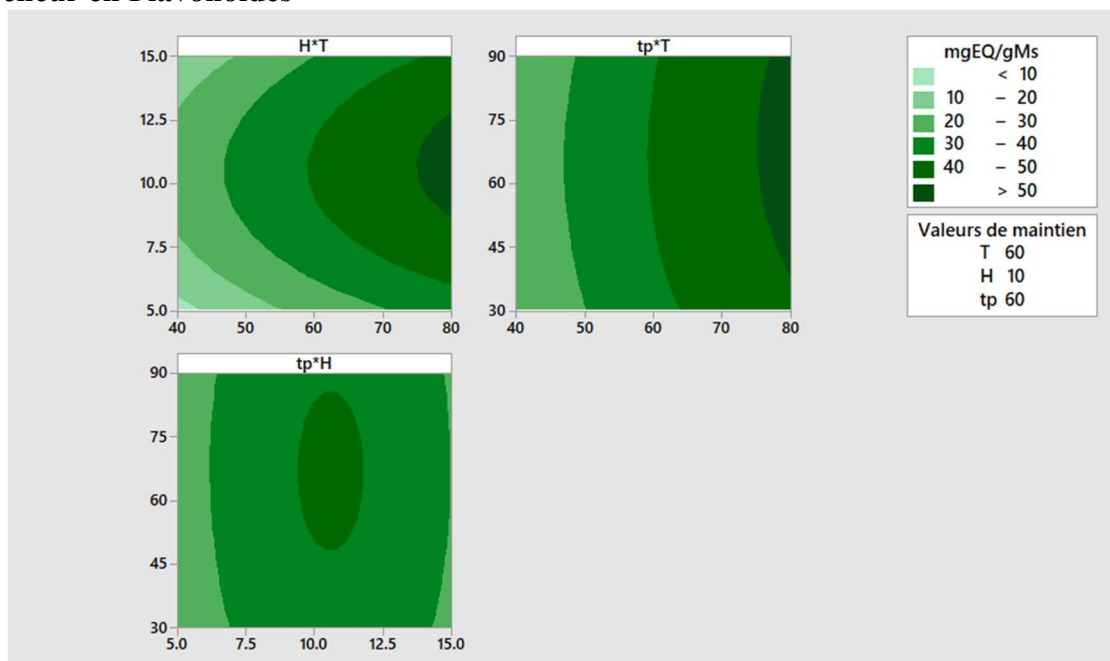


Figure 3-18: Diagrammes de contour pour la teneur en flavonoïdes.

La réponse du système pour les facteurs température et hydromodule conjugués, est optimisée à une température élevée, affectée d'un hydromodule moyen allant de 10 à 11 g/100mL de solvant. Pour les facteurs temps et température conjugués, elle est optimisée pour une température importante, affectée d'un temps d'extraction allant de 35 à 90 minutes. En ce qui concerne la réponse du système pour les facteurs temps et hydromodule conjugués, cette dernière est optimisée avec un hydromodule variant entre 9 et 12 g/100mL de solvant, avec un facteur temps allant de 45 à 85 minutes.

Remarque Importante

Les valeurs des optimums obtenus de l'hydromodule sont à prendre avec méfiance. Car ceux-là vont à l'encontre du principe de Le Chatelier. Selon ce dernier, ces optimums auraient dû se trouver dans les valeurs hautes de l'hydromodule.

CONCLUSION GENERALE

Le présent travail a pour objectif l'optimisation de l'extraction des antioxydants de l'*Olea Europaea Sylvestris*, provenant du nord d'Alger. Pour cela, une étude préliminaire sur la cinétique d'extraction des antioxydants, des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes a été menée en mode batch, à l'échelle laboratoire.

Une cinétique d'extraction a été établie pour les trois composés désirés, ses résultats suggèrent l'existence de deux sous-cinétiques ; la première d'une évolution rapide des concentrations, traduisant l'extraction des composés situés dans les sites exogènes. La deuxième pour des temps plus prolongées, les concentrations présentent une très faible variation qui est suivi d'un pallier, stipulant que l'équilibre en phases a été atteint.

Concernant la caractérisation quantitative des extraits de feuilles d'*Olea Europaea Sylvestris*, cette dernière a révélé un contenu riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Des teneurs de l'ordre de 54.64 et 168.68 mg EAG /g Ms en polyphénols totaux ainsi que 11,06 et 55.33 mg EQ /g Ms pour les flavonoïdes ont été trouvées. Par ailleurs, l'activité antioxydante de ces extraits a été évaluée par le test du DPPH, affirmant que ces feuilles ont une grande capacité de piéger le radical DPPH avec un indice d'activité antiradicalaire (IAA) de l'ordre de 4,5 supérieure à celui de l'acide ascorbique, IAA = 4,48 (Haddou et Hamouche, 2012) qui compte parmi les antioxydants les plus puissants. Ce qui nous mène à dire que les feuilles d'*Olea europaea sylvestris* peuvent représenter une nouvelle source d'antioxydant.

L'optimisation des paramètres du procédé choisis, en l'occurrence, la température, l'hydromodule et le temps d'extraction, a été faite par planification des expériences, en adoptant un plan de type Box-Behnken, les critères d'optimisation étant le pouvoir antioxydant des extraits, la teneur en polyphénols totaux et la teneur en flavonoïdes.

Les essais programmés par le plan Box-Behnken ont été réalisés, en utilisant la matière végétale broyée de diamètres inférieurs à 1 mm, pour un taux d'humidité de 8%. Des modèles du second ordre, donnant l'évolution de chaque critère d'optimisation, en fonction des trois paramètres étudiés, ont été établis.

L'analyse statistique de ces modèles, menée à l'aide du logiciel MINITAB 18, a montré qu'ils décrivent correctement le comportement du système étudié et ont permis la détermination des valeurs optimales pour les trois paramètres étudiés.

En ce qui concerne la température, l'optimum se situerait aux alentours de 80°C (Le maximum de l'intervalle choisi) afin d'obtenir de meilleur rendement dans les trois types de composés, s'agissant de l'hydromodule, l'optimum se situerait dans une moyenne de 10 g/100ml de solvant, quant à la durée de l'extraction, elle serait indifférente pour l'extraction des composés phénoliques et flavonoïque et avec un optimum de 30 minutes pour l'extraction des composés antioxydants.

Pour s'inscrire dans la continuité de cette étude, il serait intéressant d'utiliser :

- Les extraits de l'*Olea Europaea Sylvestris* pour le développement des inhibiteurs de corrosion.
- D'autres techniques d'analyse qualitative (HPLC, CPG, etc.) pour déterminer le chémotype des plantes étudiées et de mieux prévoir leur domaine d'utilisation.

- Des procéder alternatifs tels que l'extraction assisté par micro-ondes, par ultrasons ou l'extraction par CO₂ supercritique, afin de minimiser la consommation énergétique, et par cela les rendements économiques de production des antioxydants naturels.
- Et d'optimiser d'autres paramètres opératoires influençant l'extraction des composés désirés dans cette étude, ainsi qu'à des temps relativement bas.

BIBLIOGRAPHIE

A

Agrobio. Evaluer la capacité antioxydante par des tests in vitro. [En ligne]. [Consulté le 28/05/2019]. Disponible sur : <http://www.agrobio-rennes.com/fr/evaluerla-capacite-antioxydante-par-des-tests-vitro>.

Akemi M., Masamichi I., Masanori O., Noriaki O. Cosmetic for protecting and improving aged skin having AGEs degrading activity/Cosmetic having AGEs degrading activity and effective in protecting and improving aged skin. Patent written in Japanese. JP 99-300806 19991022, 2001.

Alloum D. L'oléiculture algérienne. L'olivier. Paris : CIHEAM, 1974, p45-48. (Options Méditerranéennes : n. 24).

Altioek E., Bayçin D., Bayraktar O., Ülkü S. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. Separation and Purification Technology, 2008, 62(2): 342–348. DOI:10.1016/j.seppur.2008.01.022.

Anderson C.M., Hallberg A., Hogberg T. Advances in development of pharmaceutical antioxidants. Advances in Drug Research, 1996, 28: 65-180.

Aoucher H. Extraction et valorisation des polyphénols d'inule visqueuse. Mémoire de projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état : Génie Chimique : Alger, Ecole Nationale Polytechnique, 2010.

B

Baba-Aïssa F. Encyclopédie des Plantes Utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb, Substances Végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. EDAS Algérie, 2000, 368p.

Bahorun T. Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritias, 1997, 83-94.

Beddiar A., Mekahlia M.N. Infectivité et efficacité de 4 morphotypes de spores de champignons endomycorhiziens à arbuscules extraits de sols Algériens et inoculés à l'oléastre (*Olea oleaster* « HOOFG. Et LINK. »). Colloque international sur les Bio Tech World. Oran, Algérie, 24-25 Novembre 2007.

Belaj A., Trujillo I., De La Rosa R., Rallo L. Polymorphism and Discrimination Capacity of Randomly Amplified Polymorphic Markers in an Olive Germplasm Bank. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2001, 126(1): 64-71. DOI: 10.21273/JASHS.126.1.64

Belkheiri N. Dérivés phénoliques à activités anti athérogènes. Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE. Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2010, 244p.

Benoist D., Tourbier Y., Germain-Tourbier S. Plans d'expériences : construction et analyse. Edition : Téchenique & Documentation-Lavoisier. Paris, 1994.

Besnard G., Berville A. Les Origines de l'Olivier (*Olea europaea* L.) et des oléastres. Éd. AITAE, AEP, 2005.

- Beta T., Nam S., Dexter J.E., Sapirstein H.D. Phenolic content, and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chemistry*, 2005, 82: 390-393. DOI : 10.1094/CC-82-0390.
- Boizot N., Charpentier J.P. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 2006, 79-82.
- Bossokpi I.P.L. Etude des activités biologiques de Fagara xanthoxyloïdes LAM (*Rutaceae*). Thèse de pharmacie: Bamako, 2002, 133p.
- Botsoglou E., Govaris A., Christaki E., Botsoglou N. Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 2010, 121, 17-22.
- Bouaziz, M., Sayadi, S. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2005, 107(7-8): 497–504. DOI:10.1002/ejlt.200501166.
- Boudhrioua N., Bahloul N., Kouhila M., Nabil K. Sorption's isotherms and isosteric heats of sorption of olive leaves (*Chemlali variety*): Experimental and mathematical investigations. *Food and Bioproducts Processing*, 2008, 86: 167-175. DOI: 10.1016/j.fbp.2007.10.010.
- Bouheroum M. Etude photochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherium adpressum* et *Ononis angustissima*: Phytochimie . Thèse de Doctorat : Université MENTOURI de Constantine-Algerie, 2007, 175p.
- Box G.E.P., Behnken D.W. Some New Three-Level Designs for the Study of Quantitative Variables, *Technometrics*, 1960, 2, 455-475.
- Breton C., Medial F., Pinatel C., Berville A. De l'olivier à L'*oléastre*: Origine et domestication de l'*Olea europaea L* dans le Bassin méditerranéen. *Cahiers agricultures*, 2006, vol.15, n°4.
- Briante R., La Cara F., Febbraio F., Patumi M., Nucci R. Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology*, 2002, 93(2): 109– 119.
- Briante R., Patumi M., Febbraio F., Nucci R. Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic β -glycosidase. *Journal of Biotechnology*, 2004, 111(1): 67–77.
- Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties, *Biochemical Journal*, 1998, 330(3): 1173-1178.
- Bruneton J. *Pharmacognosie — Phytochimie — Plantes médicinales*. 3e édition. Éd. Technique & Documentation, Paris, 1999.
- Bruneton J. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. Techniques & Documentation. 2 ème Ed. Paris : Lavoisier, 1993.
- Bucic-Kojic A., Planinic M., Tomas S., Bilic M., Velic D. Study of solid liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 2007, 81(1):236-242. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027.

C

Carr A., Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? The FASEB Journal, 1999, 13(9) : 1007–1024. DOI : 10.1096/fasebj.13.9.1007.

Cesarini J.-P. Le sélénium : actualités. John Libbey Eurotext Edition, 2004.

Chung K., Wong T.Y., Wei C., Hung Y., Lin Y. Tannins and human health. Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition 1998, 38: 421-464.

Chung-Hung C., Rorita Y., Gek-Cheng N. Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. Chemical engineering research and design, 2014, 92, 1169–1186.

Concellon A., Anon M.C., Chaves A. R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena L.*) during storage at low temperature. Food Chemistry, 2004, 88: 17–24. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.01.017.

COWAN M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews., 1999, 12 (4): 564- 582. DOI : 10.1128/CMR.12.4.564.

Cretu E., Karonen M., Salminen J.P., Mircea C., Trifan A., Charalambo C., Constantinou A.I., Anca Miron A. In Vitro Study on the Antioxidant Activity of a Polyphenol-Rich Extract from Pinus bmtia Bark and Its Fractions. Journal of medicinal Food. 2013, 16 (11): 1 - 8.

Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Éd Blackwell Publishing Ltd, 2006.

D

D'alessandro L.G. Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses co-produits. Ingénierie des Fonctions Biologiques. Thèse de Doctorat. Ecole doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement. Villeneuve d'Ascq, 2013, 195p.

Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, 2003, 317p.

Dagnelie P, Le plan d'expérience évolue, Revue Modulad, N° 38, 2008.

De Leonardis A., Aretini A., Alfano G., Macciola V., Ranalli G. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea L.*) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. European Food Research and Technology, 2008, 226 (4): 653-659.

Delattre J., Beaudoux., J.L., Bonnefont D., Rousselot. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques, 2005, Pp87-108.

Delgado-Pertinez M., Gomez-Cabrera A., Garrido A. Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and in vitro studies. Animal Feed Science and Technology, 2000, 87, 187-201.

Derbel S., Ghedira K. Les phytonutriments et leur impact sur la santé. Phytothérapie et Nutrition, 2005, 1: 28-34.

Dibert K., Cros E. Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *Journal of Food Engineering*, 1989, 10(3):199-214.

Djeridane A., Yousfi M., Najemi B., Vidal N., Lesgards Jf., And Stocker P. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic Compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Techenology*, 2006, 224, 801-809. DOI: 10.1007/s00217-006-0361-6.

Droesbeke J-J., Fine J., Saport A. Plans d'expériences : applications en entreprise : [7e Journées d'étude en statistique, 1996, Marseille], l'Association pour la statistique et ses utilisations et la Société statistique de France ; Paris : Éd. Technip, 1997.

Dugas A.J.; Castaneda-Acosta J.; Bonin G.C.; Price K.L.; Fischer N.H., Winston G.W. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relation ships. *Journal of Natural Products*, 2000, 63, 27-31.

E

El-Etre A.Y. Inhibition of acid corrosion of carbon steel using aqueous extract of olive leaves. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, 314(2): 578-583.

Erbay Z., Icier F. Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 2009, 91(4), 533–541. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2008.10.004.

F

Fadili K., Amalich S., N'dedianhoua S. K., Bouachrine M., Mahjoubi M., El Hilali F., Zair T. Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc : *Rosmarinus Officinalis et Thymus Satureioides*. Aug, 2015, vol. 17 n° 1.

Farag R.S., Mahmoud E.A., Basuny A.M. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science and Technology*, 2007, 42(1): 107-115. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.01374.x.

Favier A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 2003, 108-115.

Fegeros K., Zervas G., Apsokardos F., Vastardis J., Apostolaki E. Nutritive evaluation of ammonia treated olive tree leaves for lactating sheep. *Small Ruminant Research*, 1995, 17: 9-15. DOI: 10.1016/0921-4488(95)00657-7.

Fraga C. G. Plant phenolics and human health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. John Wiley and Sons Edition, 2009.

Frankel E N., Meyer A S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants. *Journal of Science and Food Agriculture*. 2000, 80(13): 1925-1941.

Fuhrman B., Lavy A., Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1995, 61: 549-554.

G

Garcia-Gomez A., Roig A., Bernal M.P. Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology*, 2003, 86, 59-64. DOI : 10.1016/S0960-8524(02)00106-2.

Ghedira K. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 2005, 3(4), 162-169. DOI 10.1007/s10298-005-0096-8.

Ghedira K. L'olivier : Ed, *Phytothérapie*, 2008, p 83-89.

Gião M. S., Gonzalez-Sanjose M. L., Rivero-Perez M. D., Pereira C. I., Pintado M. E., Malcata F. X. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87(14): 2638–2647. DOI: 10.1002/jsfa.3023.

Godman M., Bostick Rm., Kucuk O., Jones Dp. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: Past, present and future. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 51: 1068-1084. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.018.

Google Scholar.

Goupy J. Introduction aux Plans d'expériences. Éd : Dunod. Paris, 2001.

Goupy J. Les Plans d'expériences. Éd : Revue Modulad, 2006.

Goupy J., Creighton L. Introduction aux plans d'expériences avec applications, 4ème édition, Éd, Paris : Dunod, 2009.

Govaris A., Botsoglou E., Moulas A., Botsoglou N. Effect of dietary olive leaves and rosemary on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *South African Journal of Animal Science*, 2010, 40 (2): 145-155.

Groubert A. Techniques d'extraction végétale : Montpellier, pharmacie, 1984.

Gutteridge Jm, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *British Medical Bulletin*, 1999, 55(1): 49-75. DOI : 10.1258/0007142991902295.

H

Hadbaoui Z. Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de *sorgho* et de *mil locaux*. Thèse de Doctorat : Université de Kasdi Merbah Ouargla-Algerie, 2012.

Haddou F., Hamouche I. Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L.* et valorisation des eaux de distillation. Mémoire de projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état : Génie Chimique : Alger, Ecole Nationale Polytechnique : 2012.

Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Journal Free Radical Research Communications*, 1990, 9(1): 1-32. DOI: 10.3109/10715769009148569.

Hannachi H., Breton C., Msallem M., Ben El Hadj S., El Gazzah M., Bervillé A. Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. *Scientia Horticulturae*, 2008, 116, 280-290. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.01.004.

Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2004, 1: 3-6.

Huang D., Ou B., Prior R L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53 (6): 1841-1856.

J

Japon-Lujan R., Ruiz-Jimnez J., Luque De Castro M.D. Discrimination and Classification of Olive Tree Varieties and Cultivation Zones by Biophenol Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006b, 54 (26) : 9706-9712.

Jean-Denis J. B. Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat: Université de Neuchâtel, 2005.

K

Kerio L. C., Wachira F. N., Wanyoko J. K., Rotich M. K. Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. *Food Chemistry*.2012, 131: 31–38.

karim S., Touati s. Extraction et caractérisation des quelques métabolites secondaires des feuilles de deux arbustes oléastre (olivier sauvage) et buxus dioice (katham), mémoire de master, Université de m' hamed bougara boumerdes, 2016.

Khalil M.M.H., Ismail E.H., El-Magdoub F. Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract. *Arabian Journal of Chemistry*, 2010, 5(4): 431-437. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.11.011.

Khoudali S., Benmessaoud Left D., Essaqui A., Zertoubi M., Azzi M., Benaissa M. Study of antioxidant activity and anticorrosion action of the methanol extract of dwarf palm leaves (*Chamaerops humilis L.*) from Morocco, *Journal of Materials and Environmental Science*, 2014, 5 (3) : 887-898

Kim J.S., Kwon Y.S., Sa Y.J., Kim M.J. Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α - glucosidase inhibitory effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 59 (1): 138-144.

Koehlin-Ramonatxo C. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2006, 20, 165–177. DOI : 10.1016/j.nupar.2006.10.178.

Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F., Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 2003, 64: 923–933.

Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S., Vladimir-Knez Eics. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica*, 2004, 54, 65-72.

Kraft K., Hobbs C. *Pocket Guide to Herbal Medicine*. Thieme, Stuttgart, New York, 2004.

Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, 2007, 45: 244-249.

L

Lacy A., O'kenedy R. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10: 3797-381. DOI: 10.2174/1381612043382693.

Lee K.W., Hur H.J., Lee C.Y. Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53: 1990-1995.

Leong L.P., Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*. 2002, 76: 69-75.

Leybros J., Fremeaux P. Extraction solide-liquide aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés*, 1990.

Loussert R., Brousse G. L'olivier. *Techniques agricole et production méditerranéennes*(Éd) Maisonneuve et Larousse, paris, France, 1978, 480p.

Luque De Castro M., García-Ayuso L. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 369(1-2): 1–10.

M

Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P. Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : *Les polyphénols en agroalimentaire*. Edition Technologie et document, Paris, 2006, 380-398.

Mafart P., Beliard E. *Génie Industrial Alimentaire. Tomme II Technique Separatives*. Editions Tec & Doc, Lavoisier, 1992.

Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, 2014, 5(4): 359-368. DOI: 10.4161/psb.5.4.10871.

Marc F., Davin A., Degglene-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 2004, 20: 458-463.

Martin S., Andriantsitohaina R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 2002, 51: 304-315.

Martin-Garcia A.I., Molina-Alcaide E. Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea var. europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 2008, 142: 317-329. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.09.005.

Martin-Garcia A.I., Moumen A., Yáñez Ruiz D.R., Molina Alcaide E. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 2003, 107, 61-74.

Mason T. J., Paniwnyk L., Lorimer J.P. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1996, 3, 253-260. DOI: 10.1016/S1350-4177(96)00034-X

Medina-Navarro R., Durán-Reyes G., Díaz-Flores M., Vilar-Rojas C. Protein Antioxidant Response to the Stress and the Relationship between Molecular Structure and Antioxidant Function. PLoS One, 2010, 5, 1-11. DOI : 10.1371/journal.pone.0008971.

Mendil M., Sebai A. Catalogue national des variétés de l'olivier, 2006, 100p.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacological Reviews. 2000, 52: 673-839.

Miguel M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. Flavour and Fragrance Journal, 2009, 25(5): 291–312. DOI : 10.1002/ffj.1961.

Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M., Rice-Evans, C. A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. Federation of European Biochemical Societies Letters, 1996; 384: 240–242. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00323-7.

Miner J.M.M. L'huile d'olive, un luxe quasi éternel. Revue Olivae, décembre1995, N°59, Pp36-37.

Mortensen A., Skibsted L. H., Truscott T. G. The Interaction of Dietary Carotenoids with Radical Species. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 385(1): 13-19. DOI: 10.1006/abbi.2000.2172.

Mylonaki S., Kiassos E., Makris D.P., Kefalas P. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. Analytical and Bioanalytical Chemistry., 2008, 392(5): 977-985.

N

Nefzaoui A. Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course. Syria 12-23 March 1995.

Nicholson R. et Vermerris W. Phenolic compound biochemistry. Edition: Springer. New York, 2006, 01-48.

Nijveldt R. J., Nood E., Hoorn D. E., Boelens P. G., Norren K., Leewen P. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. The American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 74: 418–425.

O

O'connell J.E., Fox P.F. Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk. International Dairy Journal, 1999, 9 (8): 523–536.

Okuda T., Ito H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolysables tannins and polyphenols related to tannins. Molecules, 2011, 16: 2191-2217.

Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P. Apport du polymorphisme allo-enzymatique à l'identification variétale de l'olivier (*Olea europaea* L.). Agronomie, 1995, 15: 31-37.

Owen R- W., Haubner R., Wurtele G., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. European Journal of Cancer Prevention, 2004, 13, 319-326. DOI: 10.1097/01.cej.0000130221.19480.7e

P

Pagnol J. L'Olivier. Avignon : Ed, Aubanel, 1975.

Pan X., Niu G., Liu H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 2003, 42, 129-133. DOI: 10.1016/S0255-2701(02)00037-5

Pare J.R.J., Bélanger J.M.R. Extraction de produits naturels assistée par microondes. Brevet européen, 1990, EP 398798.

Penchev P., Angelov G., Condoret J.S. Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis L.*). *Revue de Génie Industriel*, 2010, 5:115- 123.

Pierre C Les plans d'expériences partie 1 : Principes généraux, *Revue : Contrôles- Essais- Mesures*, 2005, 69-72.

Pietta P.-G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 2000, 63(7): 1035–1042. DOI: 10.1021/np9904509.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J O. Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2002, 16: 233-239. DOI : 10.1016/s0985-0562(02)00166-8.

Pinelo M., Del Fabbro P., Marzocco L., Nunez M.J., Vicoli M.C. Optimisation of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* By-products. *Food Chemistry*, 2005, 92, 109-117. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.07.015

Pokorny J., Yanishlieva N and Gordon M. Antioxidant in food: practical applications, Éd: Wood head, 2000, 17: 43-44.

Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 2009, 4, 25-39.

Portet B. Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum var. herbicense*. Thèse de Doctorat : Université de Toulouse, 2007.

Poux M., Cognet P. Et Gourdon C. Génie des procédés durables, du concept à la concrétisation industrielle. L'usine nouvelle, Dunod, Paris, 2010. ISBN 978-2-10-051605-6.

Psotová J., Lasovsky J, Vicar J. Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers*, 2003, 147(2): 147-153.

R

Rahman I., Biswas S.K., Kirkham P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 2006, 72: 1439-1452.

Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2007, 2(2): 219-236. PMID: PMC2684512.

Ramos L., Kristenson E. M., Brinkman, U. A. T. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 2002, 975(1): 3–29. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01336-5.

Ratnam D. V., Ankola D. D., Bhardwaj V., Sahana D. K., Kumar M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 2006, 113(3): 189–207. DOI:10.1016/j.jconrel.2006.04.015.

Redondo L.M., Chacana P.A., Dominguez J.E., Miyakawa M.E.F. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5(118): 1-7.

Rezaie A, Parker Rd, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Digestive Diseases and Sciences*, 2007, 52, 2015-2021.

Ribereau-Gayon P. Notion générales sur les composés phénoliques. In : les composés phénoliques des végétaux. Éd Dunod, 1968, P1-27.

Richter B. E., Jones B. A., Ezzell J. L., Porter N. L., Avdalovic N., Pohl C. Accelerated solvent extraction : A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 1996, 68, 1033–1039. DOI: 10.1021/ac9508199

Roberta C., Benvenuto C. Chapter 9: Antioxidant Spices and Herbs Used in Diabetes. *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*, 2014; 89–97.

Rousselle J.J. Les contours actifs, une méthode de segmentation application à l'imagerie médicale : Thèse de Doctorat, Université François Robelais de Tours, France, 2003, 163p.

S

Sadasivam S., Thayumanavan B. Molecular host plant resistance to pests. Volume 96 de Books in soils, plants and the environment. CRC Press.2003, p221. EBook ISBN 9780429223143.

Sanchez-Moreno A .Procedure to Mreasure the Antiradical Efficiency of polyphenols .Éditions Tec & Doc ISBN. international Journal of Food and Agriculture, (2002) ,2-7430-0191-7 ,337-352

Sherer R., Godoy H.T. Antioxydant activity index (AAI) by the 2,2diphenyl 1picrylhydrazyl method, *Food Chemistry*, 2009, 112, 654-658. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.026

Sherwin E. R. Antioxidants for vegetable oils. *Journal of American Oil Chemical Society*, 1976, 53(6 part 2): 430-436. DOI: 10.1007/BF02605739.

Shipp J., ABDEL-AAL El-S. M. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 2010, 4: 7-22. DOI: 10.2174/1874256401004010007.

Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16: 144-158.

Sparr Eskilsson C., Björklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 2000, 902(1): 227–250. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00921-3

Swain T., Hillis W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* .I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1959, 10(1): 63–68. DOI:10.1002/jsfa.2740100110.

T

Tadashi U. Antiaging food compositions containing collagen, and their manufacture. Patent written in Japanese, 2006, p7.

Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2008, 7 (3), 1089-1099. DOI: 10.4314/tjpr.v7i3.14693.

Taylor L. T. Properties of supercritical fluids. *Supercritical fluid extraction* New York, USA: John Wiley and Sons, 1996, P7-27.

Thomas D., Anemone T., Marianne W-L., Armin W. Cosmetic and dermatological composition for the treatment of aging or photodamaged skin. Patent written in German, 2006.

Tomas-Barberan F. A., Ferreres F., Gil M. L. Antioxidant phenolic metabolites from fruit, vegetables, and changes during postharvest storage and processing. *Studies Natural Products Chemistry*, 2000, 23: 739-795. DOI : 10.1016/S1572-5995(00)80141-6.

Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010, 2, 1231-1246.

V

Valko M., Rhodes C J B., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160:1-40. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.

Verdier E. L'huile d'olive, 2003.

Vierling E. *Aliments et boissons : filières et produits*. Wolters Kluwer France Edition, 2008, p 153.

Vigier M, « *Pratique des plans d'expériences : méthodologie Taguchi et compléments* », Paris : Les Editions d'Organisation, c1988.

Vilkhu K., Mawson R., Simons L., Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. *Innovative Food Science Emerging*, 2008, 9:161- 169. DOI : 10.1016/j.ifset.2007.04.014.

Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2001, 8, 303–313. DOI: 10.1016/S1350-4177(01)00071-2.

W

Wagner W. *Manual of the flowering plants of Hawai'i*. Bishop Museum Special, 1999.

Wahdame B. Analyse et optimisation du fonctionnement de piles à combustible par la méthode des plans d'expériences. Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale : Sciences Pour l'Ingénieur et Microtechniques, France, 2006.

Wu H. Isolation and characterization of natural products from *Inger* and *Allium Ursinum*. ProQuest Edition, 2007, p 28.

Y

Yáñez Ruiz D. R., Martín García A. I., Moumen A., Molina Alcaide E. Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on olive leaves. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(7): 3006-3014. DOI: 10.2527/2004.8272023x.

Yilmaz Y., Toledo R.T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19(1):41-44. DOI: 10.1016/j.jfca.2004.10.009

Yuhong L., Qingsheng L., Huiqing K., Chen Z., Xiong L., Qiuyan L., Meiling L. Study on analyzing structure of flavonoids antioxidants from olive leaves. *Shipin Yu Fajiao Gongye*, Journal written in Chinese, 2006, 32(9): 28-31.

Z

Zarnowski R., Suzuki Y. Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2004, 17(5): 649–663. DOI: 10.1016/j.jfca.2003.09.7

Zohary D., SMARTT J., SIMMONDS N.W., “Evolution of Crop Plans”. Longman Scientific and Technical. United Kingdom, 1995, 379-282.

WEBOGRAPHIE

Site web [1] https://fr.wikipedia.org/wiki/Valeur_p.

ANNEXE

Annexe 1 : Table de la loi de Fisher Senedecor pour $p = 0.95$ Valeurs des 95^{èmes} centiles (niveaux 0,05) $F_{0,95}$ pour la distribution F

v ₂ (dén.)	v ₁ (numérateur)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98