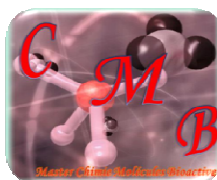




Année Universitaire : 2012-2013

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Extraction des composés phénoliques de feuilles d'olivier et étude de leurs activités biologiques

Présenté par:

ARAQAS Hajar

Encadré par:

**BENLEMLIH Mohammed
LAMCHARFI Elhadi**

Soutenu Le 18 Juin 2013 devant le jury composé de:

Mohamed BENLEMLIH, Professeur à la Faculté des Sciences DHM	Encadrant
Elhadi LAMCHARFI, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques	Encadrant
Fouad OUZZANI CHAHDI, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques	Examineur
Khalid MISBAHI, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques	Examineur

Stage effectué au : Laboratoire de Biotechnologie, Faculté des Sciences Dhar
El Mahrez, USMBA-Fès.



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom: ARAQAS Hajar

Année Universitaire : 2012/2013

Titre: Extraction des composés phénoliques de feuilles d'olivier et étude de leurs activités biologiques.

Résumé

Le travail présenté dans ce mémoire vise à définir une méthode simple et rentable pour l'extraction des composés phénoliques totaux des feuilles d'oliviers et étudier leur pouvoir antioxydant et leur activité anti-inflammatoire. Deux variétés des feuilles d'oliviers ont été examinées. Les composés phénoliques sont extraits par de l'eau et par le mélange eau/ éthanol (3v/v) à partir des feuilles fraîches, sèches et sèches blanchies avec un rapport solvant/matière végétale de 10%, 20% et 30% (p/v). Les feuilles sèches blanchies présentent une teneur en composés phénoliques de 13,97/100 g MS.

Le séchage des feuilles a été réalisé à une température de 40°C jusqu'à perte de 70% du poids frais. Le blanchiment a été effectué par infusion des feuilles sèches dans l'eau/éthanol à une température de 45°C. Les polyphénols totaux ont été dosés selon la méthode de Folin Ciocalteu. L'activité antioxydante de l'extrait de feuilles d'olivier a été réalisée in vitro par la méthode de DPPH. L'activité anti-inflammatoire a été étudiée in vivo par induction d'œdème à la carraghénine chez les rats blancs.

Le rendement maximum des composés phénoliques extraits de la feuille d'olivier est obtenu avec les feuilles séchées et blanchies à 40°C et 45°C, respectivement. Ainsi, un rendement qui dépasse les 65% de polyphénols totaux par 100 gramme de matière sèche est obtenu.

Cet extrait brut des composés phénoliques totaux des feuilles d'oliviers sèches blanchies à une très bonne activité antioxydante de 107% pour 1 ml de l'échantillon. Pour l'activité anti-inflammatoire, il a pu diminuer l'inflammation induite chez les rats.

Mots clés: Feuilles d'olivier - Séchage - Blanchiment – Composés phénoliques- Activité antioxydante – Activité anti-inflammatoire

DÉDICACES

Je dédie ce travail

*A mes parents, et surtout ma chère mère, d'avoir suivi tout ce travail, et
d'y être intéressé, pour votre aide quotidienne, votre soutien sans faille,
dans les moments faciles, comme dans les difficiles, dans les moments de
doute et de remises en question, d'avoir partagé de nombreux moments
avec moi, et pour votre amour et votre gentillesse sans bornes.*

A mes sœurs. . .

A mes amis. . .

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de Biotechnologie de la Faculté des Sciences Dhar El Mahrez, USMBA-Fès.

Je me fais un agréable devoir de remercier vivement mon encadrant Monsieur le Professeur Mohamed BENLEMLOH, directeur du Laboratoire de Biotechnologie, qui m'a fait bénéficier de son expérience et de ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail. Je le remercie également de m'avoir accueilli au sein de son équipe au L.B.

Mes vifs remerciements vont également au Professeur ccc, coordinateur du master «Chimie des Molécules Biactives» qui nous a assuré un environnement exemplaire tout au long de notre formation de master. Votre disponibilité, vos qualités humaines et vos conseils avisés étaient une source de motivation et d'encouragement permanents pour moi et pour tous mes collègues.

Je tiens aussi à remercier vivement Elhadi LAMCHARFI, professeur pour à la Faculté des Sciences et Techniques USMBA-Fès pour sa permanente disponibilité et pour la pertinence et la qualité des conseils qu'elle m'a prodigué, ce qui m'a permis de mener à bien mon travail tout au long de ces mois de stage.

Je remercie également tous les enseignants qui nous ont assuré les cours de master tout au long de ces trois semestres. Merci pour votre disponibilité et encouragements.

Je suis très reconnaissante de l'honneur que Messieurs, Fouad OUZZANI CHAHDI professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Elhadi LAMCHARFI professeur à la Faculté des Sciences et Techniques Khalid MSBAHI professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, m'ont fait en jugeant ce travail.

Merci à toute l'équipe du LB grâce à qui j'ai pu profiter d'un climat de travail agréable aussi bien sur le plan humain que sur le plan scientifique. Le caractère pluridisciplinaire des chercheurs du Laboratoire de Biotechnologie m'a beaucoup enrichi sur le plan scientifique.

Je profite de cette page pour dire merci à mes proches et ma famille qui ont toujours été là quand ça n'allait pas, merci d'exister, tout simplement. . .

Au terme de ce travail, j'aimerais pouvoir rendre hommage à tous ceux qui de loin ou de près m'ont apporté leurs concours et leurs encouragements.

Merci. . .

Sommaire

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

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

I- La feuille d'olivier	2
1- Généralité	2
2- Les composés phénoliques de la feuille d'olivier	2
II- L'oleuropéine	3
1- Généralité	3
2- Méthodes d'analyses et de quantification	4
3- Chimie, et biosynthèse	5
3-1. Chimie.....	5
3-2. Biosynthèse de l'oleuropéine	5
III- Extraction solide liquide des molécules actives	7
1- Principe	7
2- Mécanisme de l'extraction	8
3- Facteurs influençant les performances de l'extraction.....	9
3-1. Taille des particules	9
3-2. La nature du solvant.....	10
3-3. La température	15
3-4. Temps d'extraction	15
3-5. Degré d'agitation	16
IV-Propriétés pharmacologiques de la feuille d'olivier	16
1- Activité antioxydante	16
2- Activité anti-inflammatoire.....	20

Chapitre 2: Matériel et méthodes

I- Opérations de prétraitement du matériel végétal.....	22
1- Récolte de la matière végétale	22
2- Séchage des feuilles d'olivier	22
3- Broyage de feuilles d'olivier.....	23
II- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier	23
1- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier fraîches	23
1-1. Effet de la variété d'olivier	23
1-2. Effet du rapport matière végétale/solvant (p/v)	24

1-3. Effet de la nature du solvant	24
2- Extraction des PPT à partir de la feuille d'olivier sèche.....	25
2-1. Effet du rapport matière végétale/solvant (p/v)	25
2-2. Effet de la nature du solvant	26
3- Extraction des PPT à partir des feuilles d'olivier sèches blanchie	26
4- Effet de l'épuisement par renouvellement du substrat.....	27
5- Effet de la durée : cinétique d'extraction des PPT à partir des feuilles d'olivier	27
III- Méthodes d'analyse	27
1- Dosage des polyphénols totaux.....	27
2- Dosage des flavonoïdes.....	28
3- Dosage des ortho diphénols	28
IV- Activités biologiques de l'extrait de feuilles d'olivier.....	29
1- Activité antioxydante	29
1-1. Principe	29
1-2. Méthode	30
2- étude in vivo de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait	30
2-1. Animaux.....	30
2-2. Activité anti-inflammatoire : Œdème à la carraghénine	31
Chapitre 3: Résultats et discussion	
I- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier.....	32
1- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier fraîches	32
1-1. Effet de la variété d'olivier	32
1-2. Effet du rapport matière végétale/ nature du solvant (p/v)	32
2- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier sèches	34
2-1. Effet de la quantité et du solvant.....	34
2. Comparaison entre l'extraction avec des FOF et avec des FOS par les solvants.....	35
3-Extraction des PPT à partir des feuilles d'olivier sèches blanchies.....	35
4- Comparaison entre les rendements des feuilles sèches, fraîches et blanchies : discussion	37
5- Effet de l'épuisement par renouvellement du substrat.....	40
6- Effet de la durée : cinétique d'extraction des PPT à partir des feuilles d'olivier	41
II- Dosage des flavonoïdes et des ortho-diphénols dans l'extrait de feuille d'olivier	43
IV- Activités biologiques de l'extrait de feuilles d'olivier.....	45
1- activité antioxydante	45
2- Activité anti-inflammatoire.....	47
Conclusion.....	49
Références bibliographiques	51

Introduction

L'olivier (*Olea europaea* L.) est une espèce largement cultivée dans le bassin méditerranéen depuis la plus haute antiquité. 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. Par ailleurs, les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles qui font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches scientifiques. En effet, l'utilisation des feuilles d'olivier en phytothérapie remonte à très loin dans l'histoire. L'olivier est considéré donc comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques.

Certains composés phénoliques extraits à partir de feuilles d'olivier 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 *in vitro* et *in vivo* afin de déterminer leurs effets biologiques.

Jusqu'à présent, les diverses activités biologiques de l'oleuropéine et hydroxytyrosol ont été identifiés dans plusieurs études. L'oleuropéine a été signalé comme étant un agent antimicrobien, vasodilatateur hypoglycémiant, hypotenseur, anti-inflammatoire, anti-rhumatismale, anti-athérogène et antipyrétique. Beaucoup de ces caractéristiques pharmacologiques sont dus à son action antioxydante. En outre, plusieurs études ont prouvé les propriétés antioxydantes, hypoglycémiantes, antithrombotiques, hypocholestérolémiantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes de l'hydroxytyrosol issu de l'hydrolyse de l'oleuropéine.

Dans ce travail L'extraction solide-liquide est utilisée comme méthode pour la récupération des composés phénoliques à partir des feuilles d'olivier. Ainsi, nous allons essayer d'optimiser plusieurs paramètres influençant ce type d'extraction afin de pouvoir définir un simple procédé d'extraction des composés phénoliques de cette matrice vivante.

Par la suite, l'activité antioxydante de l'extrait de feuilles d'olivier sera évaluée *in vitro* par la méthode de DPPH. L'activité anti-inflammatoire va être étudiée *in vivo* par induction d'œdème à la carraghénine chez les rats blancs.

1^{er} Chapitre

Synthèse bibliographique

I- La feuille d'olivier

1- Généralité

On cultive l'olivier depuis au moins 3 500 ans avant notre ère, pour ses fruits et pour l'huile qu'on en tire. Le nom scientifique de l'arbre, *Olea*, vient d'un mot qui signifiait «huile» chez les Grecs de l'Antiquité. À cette époque, on employait les feuilles pour désinfecter les blessures cutanées. Les Anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections.

Ces usages sont tombés en désuétude pendant un certain temps en raison de l'omniprésence des antibiotiques. Cependant, depuis quelques années, des extraits de feuille d'olivier sont apparus sur le marché. Certains fabricants en vantent les vertus pour le système immunitaire et contre les infections virales, bactériennes et fongiques.

En Europe, les herboristes recommandent la feuille d'olivier pour améliorer la circulation sanguine, ainsi que pour prévenir et traiter l'hypertension et l'artériosclérose. La feuille d'olivier est souvent combinée à d'autres plantes aux propriétés complémentaires.

2- Les composés phénoliques de la feuille d'olivier

Les polyphénols représentent une grande famille avec pas moins de 8000 composés différents. Le terme « polyphénols » est utilisé dans la littérature pour définir des substances qui possèdent un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyle (libres, estérifiées ou étherifiées). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques contenant un seul noyau phénolique, à des composés hautement polymérisés, de plus de 3000 Dalton, comme les tanins.

Ils sont présents dans de nombreux fruits et légumes, les boissons comme le thé, le café, les jus de fruits, le vin rouge ou blanc, les céréales, les légumes secs, dans l'huile d'olive et même dans la feuille d'olivier.

L'olivier a une qualité qui pourrait bien être liée à l'existence d'antioxydants puissants présents dans cette espèce végétale. Ceux contenus dans ses feuilles appartiennent à différentes familles chimiques :

- les polyphénols, avec l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'oleuropéine ;
- les stérols, avec en particulier le bêta-sitostérol ;

- les tocophérols, avec une place de choix pour l' α -tocophérol, plus connu sous le nom de la vitamine E.

Les antioxydants de la famille des polyphénols sont actuellement considérés plus efficaces que les vitamines E et C et le bêta-carotène, souvent cités comme des références en matière d'antioxydants naturels. Un véritable atout pour les feuilles d'olivier face aux dangers des radicaux libres qui seraient responsables des altérations cellulaires conduisant, entre autres, au développement de cancers (Maria Bardoulat, 2013).

Les feuilles d'olivier fraîche sont riches en protéines (5,04 à 7,60 g / 100 g de matière fraîche) et en fibres (37,14 à 42,58 g /100 g matière fraîche). Elles présentent une teneur en composés phénoliques totaux variant de 1,38 à 2,32 g/100 g MS selon les variétés (N. Boudhioua et *al.*, 2008).

Esmaeili-Mahani et al (2010) ont quantifié certains composés identifiés dans un extrait éthanolique de feuilles d'olivier en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les résultats ont montré que l'oleuropéine (356 mg/g), hydroxytyrosol (4,89 mg/g), tyrosol acide (3,73 mg/g) et caféique (49,41 mg/g) ont été les principaux composés.

II- L'oleuropéine

1- Généralité

Oleuropéine (Fig. 1), un composé Secoiridoïdes, est présent dans l'ensemble *Olea europaea* L. L'olivier et ses produits dérivés (huile d'olive, margines et grignons). Il est le plus abondant biophénols et le composé bioactif majeur dans feuilles d'olivier.

Plusieurs auteurs ont rapporté que les feuilles d'olivier sont source utile pour l'extraction de l'oléuropéine (Savournin et *al.*, 2001; Bouaziz et Sayadi, 2003; Japon-Lujan et *al.*, 2006). L'oleuropéine possède de nombreuses effets bénéfique sur la santé humaine. Ainsi cette molécules est utilisée pour ces propriétés antioxydants (Benavente- Garcia et *al.*, 2000), antimicrobiens (Pereira et *al.*, 2007), antiviraux (Micol et *al.*, 2005), et anti-inflammatoires (Visioli et *al.*, 1998). En outre, l'oleuropéine possède un effet cardioprotecteur (Andreadou et *al.*, 2006) et neuroprotectrice (Omar S.H., 2010). Des études *in vitro* ont démontré que l'oleuropéine agit comme un composé anti-tumoral (Hamdi et Castellon, 2005), inhibe l'activité du facteur d'activation des plaquettes (Andrikopoulos et *al.*, 2002) et peut-être un modulateur du métabolisme. Il améliore aussi le métabolisme des lipides pour se protéger contre les problèmes d'obésité (Polzonetti et *al.*, 2004). L'oleuropéine

intervient dans le développement du processus de l'auto-défense d'olivier contre l'attaque d'agents pathogènes et des insectes (Malik et Bradford, 2006).

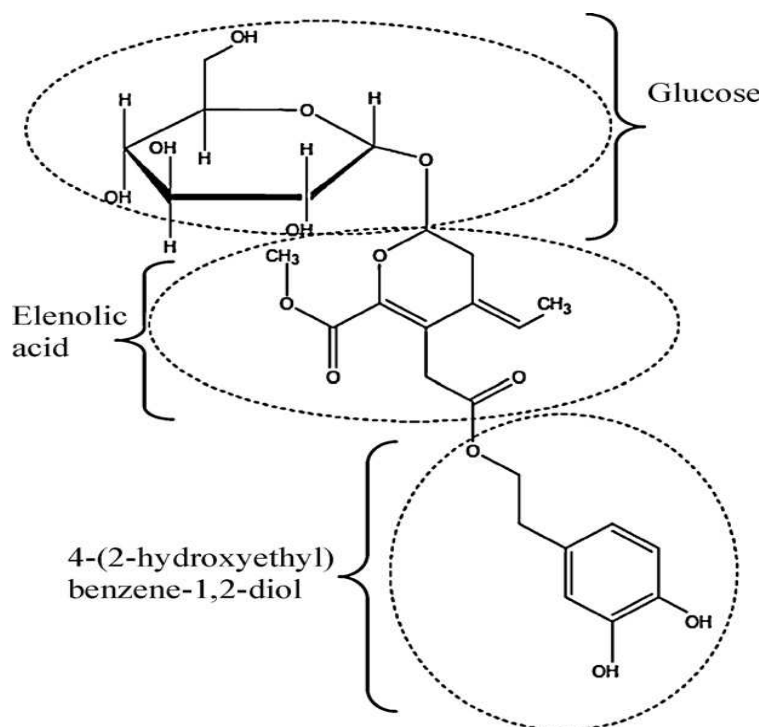


Figure 1 : Structure moléculaire de l'oleuropéine.

2- Méthodes d'analyses et de quantification

Diverses méthodes ont été développées pour l'analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques: les techniques simples comprennent chromatographie sur couche mince (CCM) (Capasso R. et *al.*, 1992), chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Ficarra P. et *al.*, 1991 ; De Laurentis N. et *al.*, 1997), chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Campeol E. et *al.*, 2001) et électrophorèse capillaire (CE) (Bonoli M. et *al.*, 2004).

D'autres méthodes sophistiquées sont aussi impliquées ; à savoir, le Système de modélisation automatique (FAMS) et l'RMN (Baracco A. et *al.*, 1995), Electrospray Ionisation Mass Spectrometry Tandem (ESI-MS/MS) et des mesures à haute résolution (HRMS) (Di Donna L. et *al.*, 2007).

3- Chimie, et biosynthèse

3-1. Chimie

L'Oleuropéine appartient aux sécoïridoïdes, qui sont abondants dans les *Oleaceae*, les *Gentianaceae* et les *Cornaleae*, ainsi que dans beaucoup d'autres plantes. Les iridoïdes et les sécoïridoïdes sont des composés qui sont habituellement liés à un ou plusieurs résidus glycosidiques et sont produites à partir du métabolisme secondaire des terpènes en tant que précurseurs de divers alcaloïdes indoliques. L'Oleuropéine est un ester d'acide 2-(3,4-dihydroxyphényl) éthanol (hydroxytyrosol) et à un squelette oléoside, qui est commun aux glucosides secoiridoïdes des *Oleaceae* (Solter-Rivas et *al.*, 2000), principalement dans sa forme aglycone, ce qui rend la partie sucre soluble dans l'huile.

3-2. Biosynthèse de l'oleuropéine

La biosynthèse de l'oleuropéine dans *Oleaceae* se déroule via la voie l'acide mévalonique, aboutissant à la formation des oléosides (Damtoft S. et *al.*, 1992).

Dans *Olea europaea*, les deux époxydes possibles de secologanin et secoxyloganin peuvent être des précurseurs pour l'oleuropéine. Une plausible voie de biosynthèse de l'acide deoxyloganic, l'acide 7-epiloganic, l'acide 7-ketologanic, Ester de l'acide 8-epikingisidic, oleoside 11-méthyle, 7-β-1-D-glucopyranosyl 11-méthyl oleoside et ligustroside à l'oleuropéine a été proposé par Damtoft et *al.* (1992) pour Oléacées (Fig. 2).

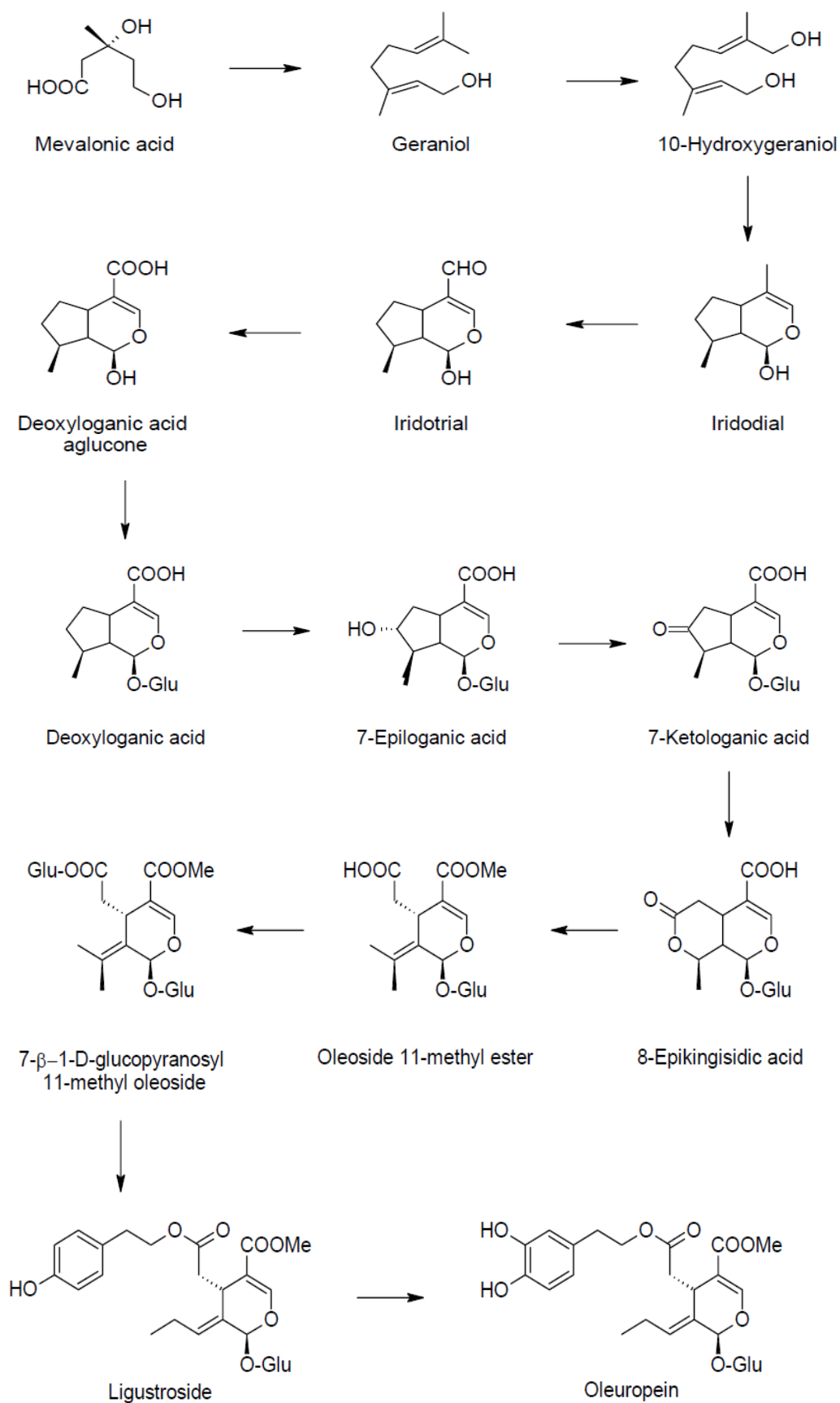


Figure 2 : voie de biosynthèse de l'oleuropéine dans *Olea europaea* (Damtoft S. et al., 1992).

III- Extraction solide liquide des molécules actives

1- Principe

Dans les processus d'extraction et de séparation de molécules spécifiques (molécules actives) présentes dans un milieu solide, l'opération fait souvent appel, d'un point de vue technologique, à la diffusion au sein du solide d'un fluide (liquide) porteur, dit solvant d'extraction; l'extraction se présente ainsi comme une interaction solide – liquide. Cependant, le solvant, capable de « mettre en solution » un ou plusieurs composants solides, cristallisés ou liquides, dénommé soluté (Mafart et Béliard 1993), génère une solution ou un extrait (solvant+soluté). Le transfert de ces molécules actives recherchées, vers le milieu extérieur a lieu grâce à une diffusion ayant pour élément moteur le gradient de concentration en soluté entre la solution au voisinage intime de la phase solide (plus concentrée) et la phase liquide. A la fin de l'opération, le système tend vers l'équilibre et la diffusion est quasi nulle. Par contre si la phase liquide est continuellement renouvelée, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide (Dibert, 1989).

A la fin de l'opération, le solide épuisé, appelé résidu, inerte ou insoluble, contient très peu ou pas de soluté. En règle générale, c'est la solution qui constitue la phase noble, mais il se peut que ça soit le résidu solide insoluble qui présente la vraie valeur économique (Bimbenet, Duquenoy et al. 1993).

L'extraction est une opération ancienne utilisée pour retirer des plantes et de certains organes d'animaux, des produits alimentaires, pharmaceutiques ou odoriférants, sous formes de breuvages, drogues ou parfums. Les solvants utilisés dans ces procédés de séparation des produits végétaux sont généralement l'eau, les alcools, les solvants organiques et/ou chlorés, etc.

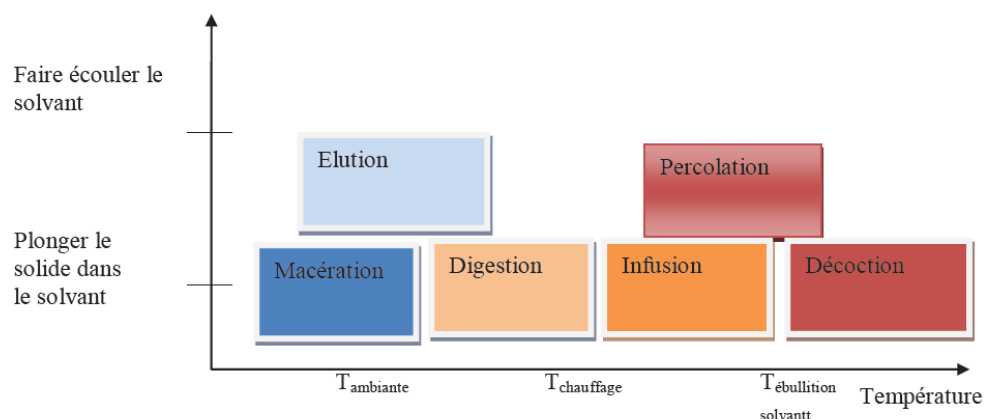


Figure 3 : Schéma des différents modes d'extraction en fonction de la température et du contact avec le solvant.

2- Mécanisme de l'extraction

L'extraction solide/liquide est réalisée par contact intime entre le solide et le solvant. Au cours de l'extraction, la concentration du soluté dans le solide varie sans interruption, ce qui explique un état non stationnaire de transfert de matière. Une série de processus successifs a lieu traduisant l'interaction entre le solide contenant initialement le soluté, et le solvant effectuant la séparation ; ces processus concernent :

1. la diffusion du solvant au sein de la matrice solide,
2. la dissolution du soluté dans le solvant,
3. la diffusion du soluté dissous dans le solvant de la matrice solide vers la surface,
4. le transfert par convection ou diffusion du soluté contenu dans la solution près du solide vers la masse restante du solvant.

L'extraction, souvent étudiée au plan phénoménologique comme une opération unifiée, peut être analysée en termes de cinétique et de rendement total. La cinétique est généralement exprimée en termes de concentration du soluté dans le solide par unité de temps (dx/dt). La nature séquentielle de ces quatre processus fait que l'opération globale d'extraction se déroule à la vitesse du processus le plus lent, qualifiée alors du processus limitant du procédé.

Dans le cas de la plupart des végétaux, c'est l'étape du transfert du solvant à travers la matrice solide qui constitue l'étape limitante. En effet, la microstructure naturelle des végétaux génère une mauvaise aptitude quant à la diffusion interne des liquides. Une relation étroite existe alors entre la vitesse d'extraction et la structure de la matière. Pour mieux analyser cet aspect, il faudrait commencer par aborder les notions théoriques du transfert de masse.

3- Facteurs influençant les performances de l'extraction

3-1. Taille des particules

Tous les auteurs s'accordent sur l'effet généralement positif du broyage sur les opérations d'extraction. Le broyage du solide permet d'intensifier les phénomènes de transfert du solvant à travers l'augmentation de la surface spécifique (surface d'échange entre le solvant et le solide) mais également la réduction de la distance de pénétration dans le matériel. En effet, à taux de solide donné, la surface de contact entre le solide et le liquide augmente lorsque la taille de la particule diminue à travers l'augmentation de la surface spécifique comme $6/d_p$ (Mohammad Mounir 2007). D'autre part, dans les opérations de transfert de matière par diffusion (Fick ; etc.), le gradient de concentration augmente directement avec la diminution de la taille de la particule et le temps de traversée nécessaire intervient généralement proportionnellement au carré de la distance traversée. L'opération doit donc être nettement mieux intensifiée à la suite d'un bon broyage (Mafart et Béliard 1993).

Nous pouvons ainsi citer à titre d'exemples que de plus grands rendements d'extraction de composés phénoliques et d'anthocyanes ont été observés avec la diminution de la taille des particules de tournesol (Gao et Mazza, 1996) ; (Pifferi et Vaccari 1983) ou des résidus de pression de jus de cassis (Landbo et Meyer 2001).

On est cependant limité dans la finesse des particules : la présence de fines induit une exagération dans ce sens et implique une réduction notable de la perméabilité du lit de solides au solvant, ce qui entraîne l'établissement de courants préférentiels bloquant ainsi le processus d'extraction dans certains endroits où le solvant ne peut plus circuler (Dibert 1989; Leybros et Frémeaux 1990).

3-2. La nature du solvant

Un solvant est, par définition, une substance qui a le pouvoir de former avec d'autres substances une solution homogène (Gerin 2002). Un solvant d'extraction est choisi en fonction de :

- Ses propriétés physiques : densité, viscosité, point d'ébullition, chaleur spécifique, etc. déterminant les conditions de l'épuisement, vitesse d'écoulement et de filtration, conditions de distillation et de concentration, pertes par volatilisation, ... (Vigneron 1954),
- La nature des principes à dissoudre,
- Ses caractéristiques économiques et son prix de revient.

Le solvant doit être sélectif, posséder une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée, une faible viscosité et être, si possible, non toxique, inflammable, et non explosif.

i. Pouvoir de solubilisation

Le pouvoir de solubilisation d'un solvant est rattaché à ses caractéristiques moléculaires, définissant notamment sa polarité et son hydrophilie, utilisées en tant qu'indicateurs de l'affinité chimique. Les caractéristiques de polarité et d'hydrophilie sont notamment révélées par :

- La présence de groupes fonctionnels dissociant,
- Le potentiel de liaison hydrogène et la faculté de mise en commun d'électrons,

Cette approche sur la capacité extractive des solvants se justifie d'autant plus qu'elle concerne des substrats végétaux dont la teneur en eau peut atteindre 80% pour les matières fraîches. L'affinité eau/solvant conditionne la diffusion dans les tissus riches en eau interstitielle et dans les cellules où l'eau libre est abondante.

En outre, la solubilisation peut atteindre le milieu interstitiel qui participe à l'intégrité des tissus. Cette action prime sur les facteurs intervenant sur le pouvoir extractant, notamment à travers la diffusion en relation avec les propriétés physiques du solvant.

Par sa qualité déstructurante, elle a pour incidence d'assurer la diffusion du solvant dans les tissus végétaux (Cu, Perineau et al. 1989). Indicateur de l'affinité vis-à-vis de l'eau,

une forte polarité se traduit soit par une action directe du solvant sur les constituants polaires du contenu cellulaire, soit par une solubilisation de certains de ces constituants ou encore par une rupture des interactions.

Quelles que soient ses propriétés physiques déterminant sa diffusion, l'éthanol bénéficie d'un fort pouvoir extractant dès lors que la majorité des tissus, dont les tissus structuraux et de soutien de la matière végétale, est d'origine lignocellulosique. En ce qui concerne l'affinité vis-à-vis de l'eau, deux facteurs sont à prendre en compte : la solubilité du solvant dans l'eau et la solubilité de l'eau dans le solvant. Ces facteurs interviendront vraisemblablement sur la diffusion des produits à l'intérieur du contenu cellulaire, notamment la solubilité dans l'eau pour la circulation du solvant dans les milieux hydratés. La solubilité de l'eau et sa polarité seront plus particulièrement déterminantes pour prévoir le pouvoir du solvant vis-à-vis des composés hydrophiles dans un milieu hydrophile.

Cependant, on ne peut établir la capacité extractive d'un solvant vis-à-vis d'un soluté donné en se basant sur la seule solubilité (ou l'insolubilité) des corps purs dans le solvant. La solubilité d'un corps peut être complètement modifiée par la présence des diverses substances dans la plante : une substance insoluble dans l'eau à l'état pur pourra se trouver en abondance dans un soluté aqueux végétal. Les principes existent en effet le plus souvent sous forme de complexes et ceci est particulièrement vrai pour la plante fraîche. C'est ainsi que les alcaloïdes se présentent sous forme de sels minéraux ou organiques, que les anthocyanosides peuvent être acétylés, que les acides-phénols complexes sont majoritaires, qu'il est souvent fait mention de complexes-tannoïdes, que les glucosides se trouvent à l'état colloïdal dans le cytoplasme, que la chlorophylle contracte des liaisons avec les caroténoïdes-protéines-phospholipides (Ollier 1991).

ii. Le pouvoir extractant

L'estimation de l'efficacité d'un solvant ne peut être réduite aux seules propriétés chimiques de polarité et d'affinité vis à vis de l'eau. Nous devons également tenir compte des propriétés physiques déterminant la capacité du solvant à pénétrer dans une matrice poreuse ; nous parlons alors du pouvoir extractant qui est défini par la capacité du solvant à pénétrer et à diffuser dans la structure végétale de telle sorte qu'il rencontre et entraîne les molécules cibles. Evidemment ce dernier processus suggère la solubilisation de ces molécules par le solvant. Il est clair que ces notions de pouvoir solvant et extractant, ainsi que de sélectivité

chimique, sont liées les unes aux autres par les caractéristiques chimiques et physiques du solvant. Nous tenterons d'apprécier le pouvoir extractant selon deux composants eux-mêmes liés à plusieurs paramètres indiqués ci-dessous :

- La capacité de pénétration : tension superficielle et viscosité,
- La capacité de diffusion.

** La capacité de pénétration*

Plus la tension superficielle d'un liquide dans lequel on immerge un solide poreux tel qu'un substrat végétal est faible, mieux est assuré le mouillage des pores, et ce, d'autant plus que ces pores sont de petite dimension ; c'est ainsi qu'est assurée une efficacité dans la pénétration du liquide, notamment dans le cas d'une matière à organisation cellulaire.

Plus la viscosité est faible, mieux le liquide s'écoule dans les pores et mieux il circule dans les espaces intercellulaires (Cu, Perineau et al. 1989).

** La capacité de diffusion*

Le choix d'un solvant à faible viscosité et à masse volumique peu élevée est recommandé pour accélérer sa diffusion, faciliter son agitation et améliorer la séparation mécanique. (Dibert 1989; Leybros et Frémeaux 1990).

La diffusion d'un composé A dans un système binaire A-B a généralement lieu grâce au gradient de concentration de A. Ce phénomène est appelé « diffusion ordinaire », par opposition à la diffusion sous pression où le mouvement de A est dû à un gradient de pression, ou la diffusion thermique (la progression de A découle d'un gradient thermique), ou la diffusion forcée (la dispersion de A résulte d'un apport énergétique externe quelconque). La diffusion dans un système multiphasique est plus complexe car elle n'est pas régie par un simple équilibre de la viscosité au sein du milieu (Bird, Steward et al. 1976). (Liley, Reide et al. 1984) utilisent l'équation de STOKES EINSTEIN pour calculer le *coefficient de diffusion* de A dans B en phase liquide.

Équation I-1/

$$D_{AB} = \frac{RT}{6\pi\mu_B\gamma_A}$$

Où :

 $R =$ Constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$). $T =$ Température exprimée en K. $\mu_B =$ Viscosité du solvant B. $\gamma_A =$ rayon d'une molécule de soluté A.

Le coefficient de diffusion des solvants dans les matières végétales (solides) est impossible à déterminer selon ce modèle mathématique, car les matières végétales sont des corps complexes hétérogènes pour lesquels on ne dispose pas des constantes physico-chimiques. Cependant, (Liley, Reide et al. 1984) montrent que le coefficient de diffusion des solvants est lié à leur viscosité. En ce qui concerne la diffusivité d'un solvant dans une matière végétale, (Krasuk, Lombardi et al. 1967) rapportent qu'elle dépend de certains facteurs internes tels que l'épaisseur et la taille des particules, les teneurs en eau et en huile, etc.

Pour de nombreuses raisons évidentes, l'eau est le solvant le plus utilisé en Industrie Agroalimentaire. Elle est le solvant le plus universel puisqu'elle convient à l'extraction des sucres, de matières azotées et à celle des sels minéraux (Bimbenet, Duquenoy et al. 1993).

Les autres principaux solvants utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane) et les solvants halogénés. Les solvants chlorés qui sont moins sélectifs que les hydrocarbures, ont des diffusivités plus élevées (Vigneron 1954).

Tableau 1 : Propriétés physiques des solvants les plus usuels (Vigneron, 1954).

	Masse volumique (kg/m ³)	solubilité à 15°C dans 100 cm ³ d'eau	Polarité (moment dipolaire *10 ¹⁸)	Tension superficielle mN/m	Point d'ébullition (°C)	Chaleur spécifique (kcal/kg/°C)
non ou peu polaires, utilisés pour l'extraction de molécules non ou peu polaires (huiles, essences, stéroïdes)						
Heptane	679	0.005	0		98	0.507
Trichloréthylène	1 455	0.01			152	0.223
Hexane	655	0.014	0	18.4	69	0.527
Toluène	862	0.047	0	28.4	110	0.364
Benzène	873	0.073				
Tétrachlorure de carbone	1 580	0.08	0	26.8	76.7	0.198
Sulfure de carbone	1 260	0.218	0	33	46.2	
Doués d'une faible polarité						
Chloroforme	1 479	0.621	1.05	27.3	61	0.232
Ether	707	7.42	1.14	17	34	0.521
Acétate d'éthyle	894	8.4	1.86	24.3	77	0.457
Doués d'une forte polarité, pouvant être modifiée par mélanges						
Méthylal	853				42.3	0.521
Acétone	788		2.8	23.7	56	0.514
Alcool méthylique	796		1.68	22.6	64.5	0.59
Alcool éthylique	785		1.7	22.2	78	0.505
Eau	1000	-	1,8	71	100	1

Les solvants organiques de polarité faible ou nulle dissolvent les principes dont la structure comporte surtout des chaînes ou groupements hydrophobes : lipides, stérols, terpènes, huiles essentielles.

Certains sont ininflammables (chloroforme, tétrachlorure de carbone, trichlorométhylène). La plupart sont inflammables : éther, benzène, carbures d'hydrogène et produits de rectification du pétrole : éther de pétrole, hexane, heptane, ligroïne, kérosène.

Les solvants polaires tels que l'acétone, l'eau dissolvent les principes riches en groupements hydrophiles : sucres, acides et alcools de faible poids moléculaire, nitrites etc. Certains solvants par mélange avec des proportions variables d'eau agissent comme des agents tantôt hydrophobes (éthanol absolu, éthanol à 95°) tantôt hydrophiles (éthanol à bas degré) (Vigneron 1954).

3-3. La température

Il est difficile de cerner de façon simple l'influence de la température sur l'extraction. Dans la plupart des cas, les gammes élevées de température sont favorables au rendement d'extraction et ceci pour quatre principales raisons :

- La chaleur facilite l'extraction en perméabilisant les parois cellulaires par dénaturation,
- La gamme des hautes températures usuelles, augmente la solubilité des matières à extraire,
- Elle augmente les coefficients de diffusion, enfin, elle diminue la viscosité des solvants d'extraction, ce qui facilite non seulement le passage du solvant à travers la masse de substrat solide, mais aussi les opérations ultérieures de séparation.

La limite supérieure de la température est imposée par le point d'ébullition du solvant, par les risques de : dégradation thermique du soluté risques d'extraire des composés nuisibles (Leybros et Frémeaux 1990; Binbenet, Duquenoy et al. 1993).

Plusieurs travaux ont conclu de l'effet positif de l'augmentation de la température sur la cinétique d'extraction et la diffusivité des composés phénoliques à partir de la fraise (Cacace et Mazza 2003), des anthocyanes à partir de la carotte noire (Turker et Erdogan 2005) et de composés solubles dans l'eau à partir des oranges (Chambers, Exaudi-Larsen et al. 1996). Ils ont montré que la diffusion de ces différents composés dépend énormément de la température et que l'influence de cette dernière est généralement caractérisée par la variation du coefficient de diffusion consécutivement à la variation de la viscosité du milieu, comme établie par l'équation d'Einstein :

<i>Équation I-3/</i>	$D \propto (T/\mu).$
----------------------	----------------------

Où T est la température absolue et μ la viscosité dynamique (Loncin and Merson 1979).

3-4. Temps d'extraction

Les quantités de substances extraites sont fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles, dissolution du composé etc.)

Généralement, une élévation de la température traduisant l'agitation moléculaire permet de diminuer les temps de contact et ce, sans diminution notable du rendement.

A titre indicatif, une méthode comme la macération dure environ 8 à 10 jours, par contre des méthodes comme la décoction ne nécessitent que des temps de contact rapides de l'ordre d'une dizaine de minutes (Groubert 1984).

3-5. Degré d'agitation

L'agitation mécanique des particules dans le solvant, qui permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu, a un effet toujours favorable sur l'opération.

Dans le cas de l'extraction aqueuse, l'agitation 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 maintenue durant une longue période, elle va favoriser les chocs entre les différentes particules et permettre ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans le milieu (Dibert 1989; Leybros et Frémeaux 1990).

IV-Propriétés pharmacologiques de la feuille d'olivier

1- Activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porte aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Sanchez-Moreno, 2002 ; Maarc et *al.*, 2004 ; Huang, 2005). L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) (Rice-Evans C.A. et *al.*, 1995; Bartosz G., 2003).

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 (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Ricardo da Silva J.M., et *al.*, 1991) ; les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie I. F., Strain J., 1996); ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Re R., Pellegrini N. et *al.*, 1999), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphenyl-picrylhydrazyle) (Sharma Om P., Bhat T.K., 2009).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants a la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon a tester (Tabart J. et *al.*, 2009 ; De Gauleja Saint-Criq et *al.*, 1999 ; Huali et *al.*, 2008).

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH• est recommande pour des composés contenant des groupes SH-, NH- et OH- (Salah N. et *al.*, 1995). Il s'effectue à une température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilise au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles en provenance de thé vert, des jus de fruits et de raisins, pépins et pulpes, très riches en composés phénoliques (Yi-Zhong Cai et *al.*, 2006 ; Hat Zidimitrou EF. et *al.*, 2007).

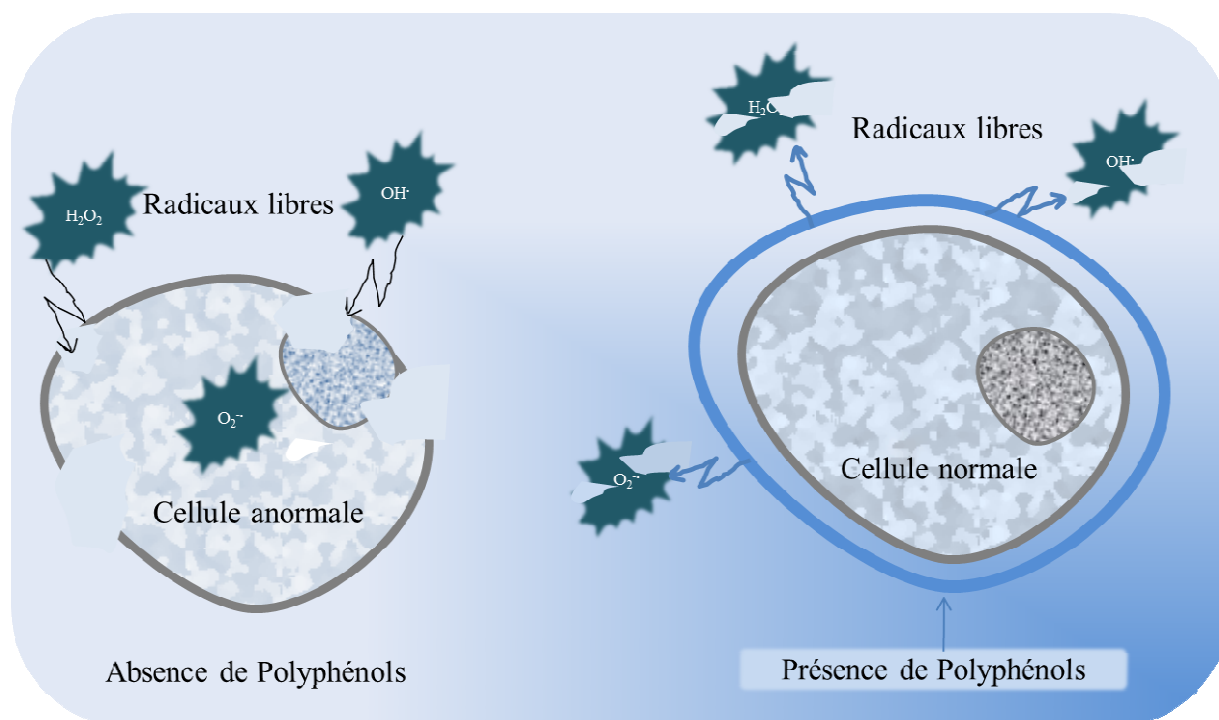


Figure 4 : Schéma explicatif de l'effet protecteur des polyphénols de l'huile d'olive contre les radicaux libres (Benlemlih et Ghanam, 2012).

Dans ce cadre, l'étude s'est intéressée à l'évaluation des activités antioxydantes d'extraits de pépins de raisin en vue de leur valorisation en tant qu'antioxydants. Une étude comparative a été réalisée à partir des protocoles analytiques publiés afin d'évaluer l'effet des facteurs qui influent sur la méthode de mesure de la capacité antiradicalaire à l'aide du DPPH•. Comme exemple d'illustration les cinétiques de réduction du DPPH• réagissant avec l'acide gallique, l'épicatchine et l'acide tannique ont été étudiées afin d'estimer la différence d'efficacité entre différentes familles de composés phénoliques présents dans les pépins de raisins.

L'objectif de l'étude est de proposer une technique rapide et reproductible permettant de comparer les extraits vis-à-vis de leur action sur les phénomènes du piégeage des radicaux libres. Cette classification permettra de choisir les conditions les plus adéquates lors des différentes étapes de la valorisation de la matière première: extraction, purification et concentration en fonction d'un critère de qualité optimal : D'une part la teneur en composés phénoliques et parallèlement, leur activité antiradicalaire.

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Blois M.S., 1958 ; Brand-Williams W. et al.,

1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig.1). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

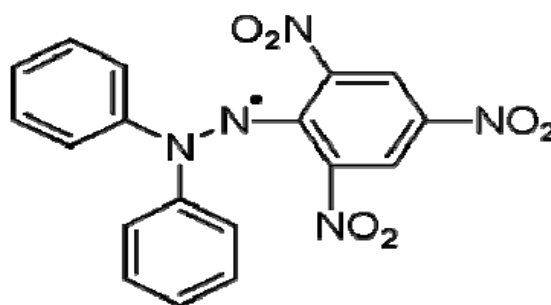


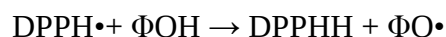
Figure 5 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle).

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes:

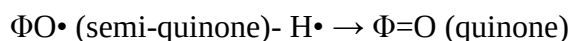
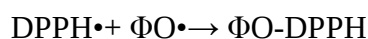
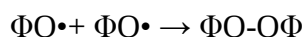
(i) la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ;

(ii) la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) (Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005 ; Nanjo F. et *al.*, 1996).

Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPHH (Molyneux P., 2004 ; Sanchez-Moreno C. et *al.*, 1998) :



Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles qui forment des structures plus ou moins stables :



La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de

réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport, antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier.

2- Activité anti-inflammatoire

Visioli et al. (1998) ont montré que l'oleuropéine augmente l'oxyde nitrique (NO) de production macrophages ont contesté avec lipopolysaccharide par l'induction de la forme inductible de la synthase de l'oxyde nitrique à une enzyme, ce qui augmente l'activité fonctionnelle de ceux-ci cellules immunocompétentes.

Il est bien connu que l'oleuropéine provoque des effets anti-inflammatoires par activité lipoxigénase inhibant et la production de leucotriènes B4 (De la Puerta R et *al.*; 1999).

2^{ème} Chapitre

Matériel et méthodes

Extraction solide/liquide

Dans les processus d'extraction et de séparation de molécules spécifiques (molécules actives) présentes dans un milieu solide, l'opération fait souvent appel, d'un point de vue technologique, à la diffusion au sein du solide d'un fluide (liquide) porteur, dit solvant d'extraction ; l'extraction se présente ainsi comme une interaction solide–liquide.

Cependant, le solvant, capable de «mettre en solution » un ou plusieurs composants solides dénommé soluté, génère une solution ou un extrait (solvant+soluté). Le transfert de ces molécules actives recherchées, vers le milieu extérieur a lieu grâce à une diffusion ayant pour élément moteur le gradient de concentration en soluté entre la solution au voisinage intime de la phase solide (plus concentrée) et la phase liquide. A la fin de l'opération, le système tend vers l'équilibre et la diffusion est quasi nulle. Par contre si la phase liquide est continuellement renouvelée, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide.

L'extraction est une opération ancienne utilisée pour retirer des plantes des produits alimentaires, pharmaceutiques ou odoriférants, sous formes de breuvages, drogues ou parfums. Les solvants utilisés dans ces procédés de séparation des produits végétaux sont généralement l'eau, les alcools, les solvants organiques et/ou chlorés, etc.

Le choix de la méthode et du solvant d'extraction est fondamental pour un processus optimal. Il dépend premièrement de la source et du type des composés à extraire et il doit assurer un rendement élevé sans dégradation de composés en question.

Afin de choisir le solvant adéquat, il est nécessaire de connaître ses propriétés, ses interactions avec la matrice végétale et son pouvoir de solubiliser les analytes d'intérêt. De plus, le solvant doit présenter une bonne sélectivité pour les composés à extraire et il doit être compatible avec la méthode utilisée pour l'analyse des extraits.

Au cours de ce travail, l'extraction solide/liquide a été choisie comme moyenne pour la récupération des composés phénoliques à partir d'une matrice végétale constituée de feuilles d'olivier broyées, fraîches et sèches. L'extraction a été réalisée par l'eau et le mélange eau/éthanol avec et sans blanchiment des feuilles.

Le diagramme ci-dessous représente les différents modes d'extraction suivis tout au long de ce travail :

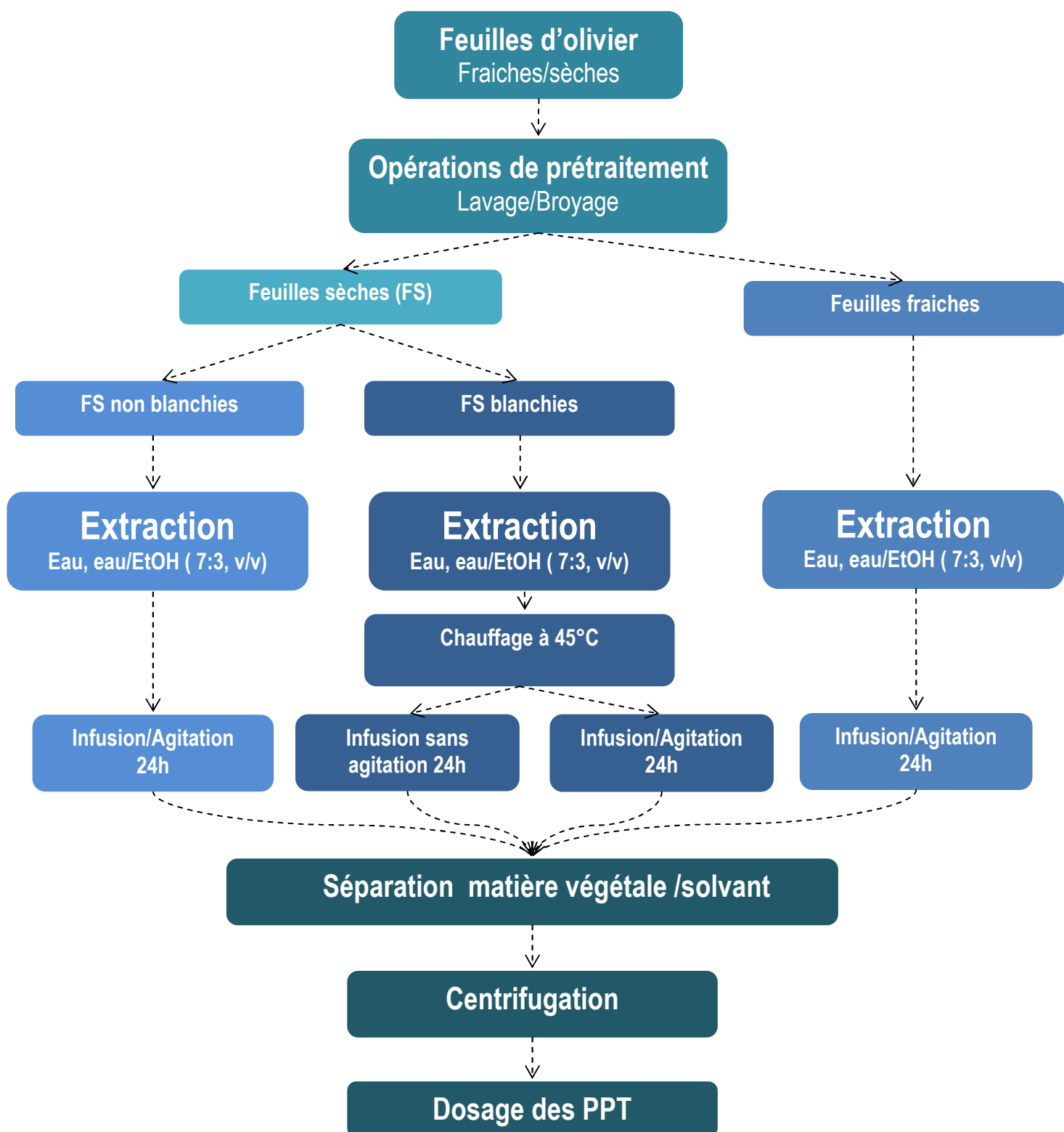


Figure 6 : Schéma des différents modes d'extraction en fonction de la nature du substrat et du contact avec le solvant.

I- Opérations de prétraitement du matériel végétal

L'extraction solide-liquide est précédée généralement par une ou plusieurs opérations de préparations ou de prétraitement de la matrice végétale. Les opérations de prétraitement peuvent, suivant les cas, comprendre plusieurs étapes qui vont du nettoyage au séchage et broyage.

1- Récolte de la matière végétale

Les feuilles fraîches d'olivier (tableau 2), variété cultivée au Maroc et en particulier dans la région de Fès sont cueillies juste après la période de la récolte, dans la région. La collecte des feuilles était effectuée le matin, juste après évaporation de la rosée. Après récolte, les feuilles étaient transportées au laboratoire puis intensément nettoyées avec de l'eau distillée à 20°C égouttées à l'aide d'un tamis.

Tableau 2 : Situation botanique de l'espèce *Olea europea L.*

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dialypetales</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Oleaceae</i>
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Oleaeuropea L.</i>
Sous-espèces	<i>O.europeasubsp.europaeavar.</i> <i>sylvestris</i> <i>O.europeasubsp.europaeavar.</i> <i>Europaea (Picholine ;Menara)</i>

2- Séchage des feuilles d'olivier

Une partie des feuilles a été séchée à 40°C et à l'abri de la lumière dans un incubateur de type BENDER, jusqu'à perte de 70% du poids, puis broyée pour obtenir une poudre de feuilles séchées.



Figure 7 : Incubateur de type BENDER.

3- Broyage de feuilles d'olivier

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.

Les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur à hélice, de type « moulin à café électrique » dans le but d'obtenir les feuilles fraîches broyées et la poudre de feuilles sèches.

II- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier

1- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier fraîches

1-1. Effet de la variété d'olivier

Deux variétés d'olivier ont été utilisées, la Picholine provenant de la région de Settat et la variété Menara récoltée à partir du jardin de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz.

10 g de broyat de feuilles d'olivier fraîches est additionné à 100 ml d'eau distillée de façon à obtenir une concentration de 10% (p/v). Le mélange subit une agitation magnétique pendant 24 h à l'obscurité et à température ambiante.

Une solution aqueuse d'extrait brut est donc obtenue. Celle-ci est centrifugée pendant 20 minutes à une vitesse de 6000tr/min. Les polyphénols totaux sont dosés dans le surnageant.

1-2. Effet du rapport matière végétale/solvant (p/v)

L'extraction des PPT a été réalisée à partir du broyat de feuilles d'olivier fraîche à différents rapports p/v ; à savoir, 10%, 20% et 30%.

Les mélanges sont maintenus à une température ambiante sous agitation, pendant 24h. Après une centrifugation à 6000tr/min pendant 20 minutes, les polyphénols totaux ont été quantifiés dans le surnageant.

1-3. Effet de la nature du solvant

Sur la base des résultats des travaux antérieurs du Laboratoire de Biotechnologie, concernant l'extraction des composés phénoliques de plusieurs matrices végétales, l'éthanol a été choisi comme deuxième solvant pour l'extraction des polyphénols à partir de feuilles d'olivier fraîches.

Ainsi, le mélange eau/éthanol (70/30, v/v) a été utilisé pour extraire les polyphénols du broyat de feuilles fraîches. L'extraction a été réalisée pour les rapports (p/v) 10%, 20% et 30%. Les mélanges sont maintenus à température ambiante sous agitation, pendant 24h. Les polyphénols totaux sont dosés dans le surnageant après centrifugation à 6000tr/min pendant 20 minutes.

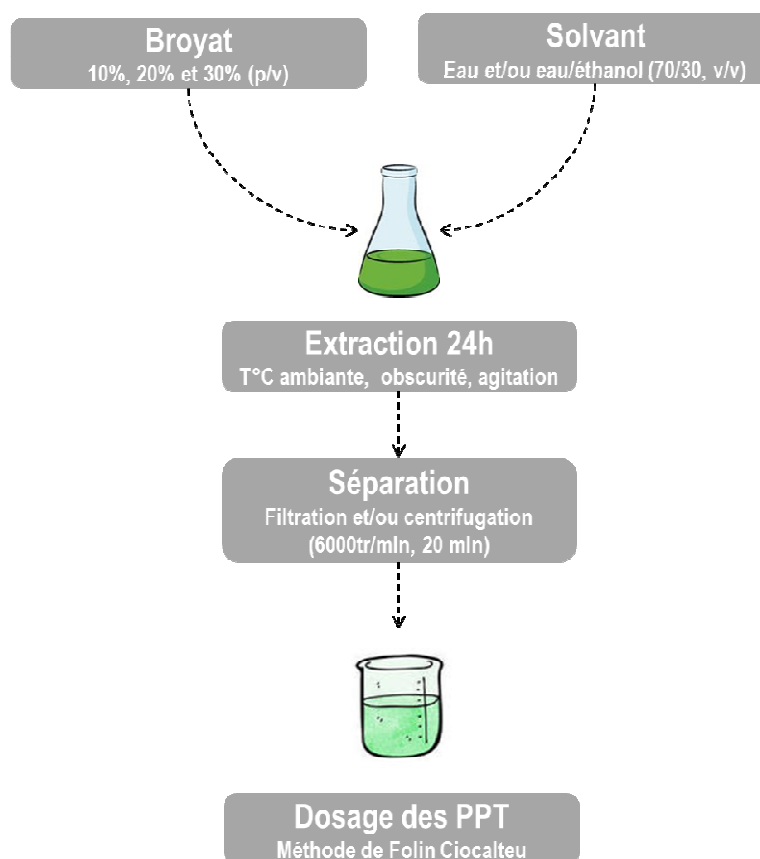


Figure 8 : Schéma générale de l'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier sèches.

2- Extraction des PPT à partir de la feuille d'olivier sèche

L'extraction des composés phénolique a été réalisée à partir de la poudre de feuilles séchées à 40°C. Dans le but d'étudier l'effet du séchage sur la diffusion des analytes dans le et/ou les solvants d'extraction utilisés.

2-1. Effet du rapport matière végétale/solvant (p/v)

10 g, 20 g et 30 g de la poudre de feuilles d'olivier sèches sont additionnés à 100 ml d'eau de façon à obtenir une concentration de 10%, 20% et 30% (p/v). Les mélanges ont subis une agitation magnétique à température ambiante pendant 24h.

Les polyphénols sont dosés dans la solution aqueuse ainsi obtenue après centrifugation à 6000 tr/min pendant 20 min.

2-2. Effet de la nature du solvant

Le rapport eau/éthanol (70/30, v/v) a été aussi utilisé pour extraire les composés phénoliques à partir de la poudre de feuilles d'olivier sèches à différents rapports (p/v).

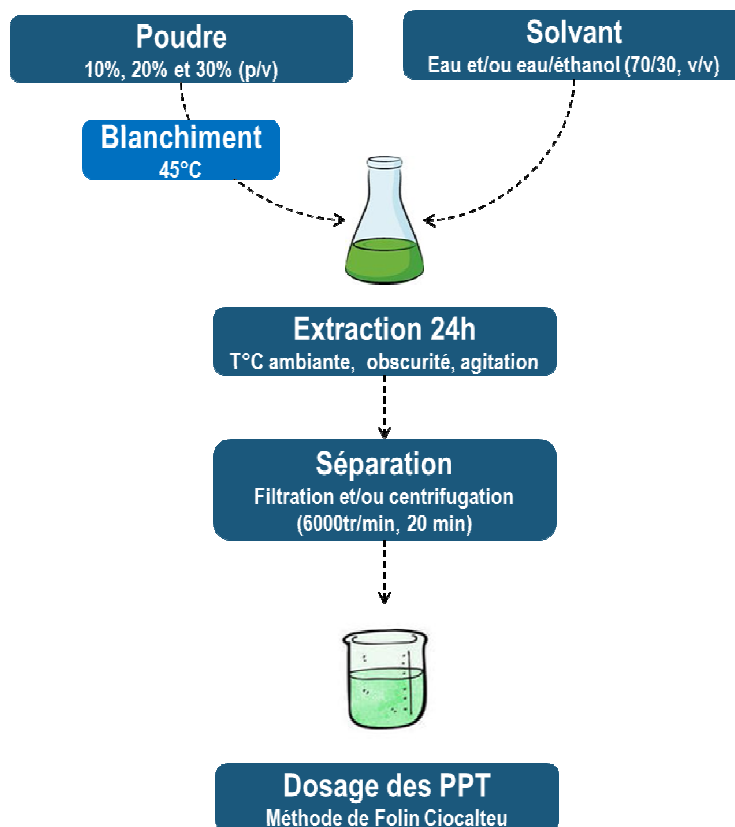


Figure 9 : Schéma générale de l'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier sèches avec et sans blanchiment.

3- Extraction des PPT à partir des feuilles d'olivier sèches blanchie

10g, 20g et 30g de la poudre de feuilles d'olivier sèches sont additionnés à 100 ml d'eau et du mélange eau/éthanol (70/30, v/v) chauffé à 45°C. L'infusion est laissée reposer pendant 24h à l'obscurité, à température ambiante et avec ou sans agitation magnétique.

Les mélanges d'extraction ont été centrifugés à 6000 tr/min pendant 20 min. Les polyphénols totaux sont dosés dans le surnageant ainsi obtenu.

4- Effet de l'épuisement par renouvellement du substrat

L'objectif de cette expérience est de déterminer la variation de la quantité des composés phénoliques extraite en fonction du renouvellement du substrat.

La méthode consiste à ajouter une quantité du broyat et de poudre de feuilles d'olivier fraîches et sèches à raison de 10% (p/v) au mélange eau/éthanol (70/30, v/v). L'opération se répète jusqu'à atteindre le point de saturation du solvant, au moment où le taux de transfert des analytes au solvant tend vers le zéro. Cela nous permettra de savoir s'il y a une accumulation de la quantité des polyphénols totaux ajoutée à chaque fois.

5- Effet de la durée : cinétique d'extraction des PPT à partir des feuilles d'olivier

Dans cette expérience, on a étudié l'effet de la durée d'extraction sur le rendement des composés phénoliques extraits par l'eau/éthanol (70/30, v/v) à partir de feuilles d'olivier sèches.

Pour cela, une cinétique de 24h a été réalisée en prélevant des échantillons au bout de chaque 2h et une autre de 2h avec prélèvement des échantillons tous les 20 min.

III- Méthodes d'analyse

1- Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols ont été déterminés spectrophotométriquement par la méthode de Folin Ciocalteu (Singleton et al., 1999 ; Heilerová et al., 2003).

100µl de l'extrait de feuilles d'olivier qui est dilué 100 fois dans un volume final de 10 ml. 0,5ml du réactif de Folin Ciocalteu est additionné au mélange. Après 5 minutes, 2 ml de la solution de Na₂CO₃ (20%) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 750 nm.

Le réactif de Folin Ciocalteu est constitué d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphorique qui seront réduits par les composés phénoliques pour donner une coloration bleue, et ceci en milieu alcalin. L'intensité de cette coloration est directement proportionnelle à la concentration des polyphénols dans la solution.

La quantification des polyphénols a été faite par rapport à une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax$) réalisée par un étalon qui est l'acide gallique à différentes concentrations.

L'étalon a été soumis aux mêmes étapes expérimentales que les échantillons d'extrait des feuilles d'olivier fraîches. Les résultats sont exprimés en gramme équivalent acide gallique par litre d'extrait des feuilles d'olivier.

2- Dosage des flavonoïdes

➤ Réactifs :

La méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) citée par (Djeridane *et al.*, 2006) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans ces extraits.

➤ Echantillon :

On a pris 1ml de l'échantillon à différentes concentrations : 100 μl , 200 μl , 300 μl et 400 μl qu'on lui a ajouté 1ml d' AlCl_3 déjà mélangé au méthanol dans un rapport de 2%.

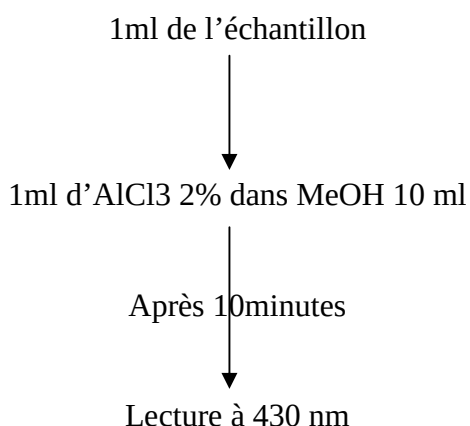
➤ Témoin :

Pour le témoin, on a pris 1ml d'eau distillée qu'on lui a ajouté 1ml de AlCl_3 de 2% de méthanol. On laisse déposer le tout pendant 10 minutes, et on effectue la lecture à 430 nm au spectrophotomètre.

➤ Le flavonoïde référent :

Le quercétine soluble à 60mg/l, donne une concentration de 5mg/l, on a pris les dilutions suivantes : 100 μl , 200 μl , 300 μl et 400 μl .

➤ Mode opératoire :



3- Dosage des ortho diphénols

➤ Réactifs :

Sodium molybdate anhydre à 5% mélangé dans l'eau et l'éthanol (50/50, v/v).

➤ *Echantillon :*

Fraction phénolique extraite des feuilles d'olivier sèche et blanchie par le mélange eau/éthanol.

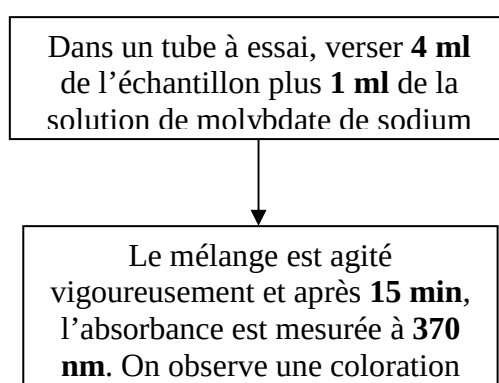
➤ *Témoin :*

On a pris ml de la fraction phénolique plus 1ml du mélange eau / éthanol.

➤ *L'ortho diphénol référent :*

L'acide caféique est utilisé comme standard pour préparer la gamme d'étalonnage à des concentrations entre 0 et 10 mg/l.

➤ *Mode opératoire :*



IV- Activités biologiques de l'extrait de feuilles d'olivier

1- Activité antioxydante

1-1. Principe

En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al.*, 2006).

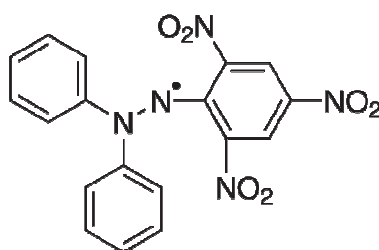


Figure 10 : structure chimique du DPPH (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl).

1-2. Méthode

L'activité du balayage du radical DPPH[•] a été mesurée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz *et al.*, 2008). Dans des tubes on introduit 4 ml de chaque extrait (dilué à plusieurs reprises) et 0,5ml de la solution du DPPH (1mM), après agitation au vortex pendant 30s, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

1-3. Expressions des résultats

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$I\% = [1 - (\text{Abs Echantillon} - \text{Abs Control négatif})] \times 100$$

Où

I % : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

Abs : Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs : Control négatif : Absorbance du control négatif.

2- étude in vivo de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait

2-1. Animaux

Les rats mâles blancs (souche Wistar), pesant entre 150-200g et provenant de l'animalerie de la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz ont été utilisés pour étudier *in vivo* l'effet anti-inflammatoire des extraits de feuilles d'olivier.

Les animaux ont été maintenus dans des conditions contrôlées d'humidité, de température (22 ± 2 ° C) et avec un cycle lumière-obscurité de 12 h. Les animaux ont été nourris avec une alimentation pour souris préparée au niveau du DMT avec un accès libre à l'eau de robinet. Avant l'expérimentation, les souris ont été mises à jeûne pendant 16 heures avec accès libre à l'eau.



Figure 11 : Rats Wistar élevés à l'animalerie de la Faculté des Sciences Dhar El Mahrez.

2-2. Activité anti-inflammatoire : Œdème à la carraghénine

L'action inhibitrice de l'extrait de feuilles d'olivier sur l'œdème provoqué par l'injection d'une solution de carraghénine à 1% dans l'eau physiologique (NaCl 0,9%) à la dose de 0,05ml/patte de souris.

Les mesures des volumes de la patte postérieure droite de chaque souris ont été effectuées avant l'induction de l'œdème et à chaque 1h, 2h, 3h, 4h et 5h après l'injection de la carraghénine.

Une heure avant l'injection de la carraghénine, les différents groupes de souris ont reçu par voie intra-gastrique (gavage) les différents traitements:

- Groupe témoin de 6 souris a reçu de l'eau distillée ;
- Groupes expérimentaux de 6 souris chacun ont reçu les extraits de feuilles d'olivier à une dose de 300 mg/kg de poids corporel;
- Groupes de 6 souris a reçu par voie orale l'indométacine comme produit de référence à une dose de 8mg/kg.

Expression des résultats :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{((VT - V0)_{\text{control}} - (VT - V0)_{\text{treated group}}) \times 100}{(VT - V0)_{\text{control}}}$$

3^{ème} Chapitre

Résultats et discussion

I- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier

1- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier fraîches

1-1. Effet de la variété d'olivier

L'étude quantitative au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur totale en polyphénols en fonction du cultivar. La figure montre que la variété Menara accueillie du jardin de la FSDM présente une teneur relativement élevée en composés phénoliques (7,76%) par rapport à la variété Picholine provenant de la région de Settât (6,95%).

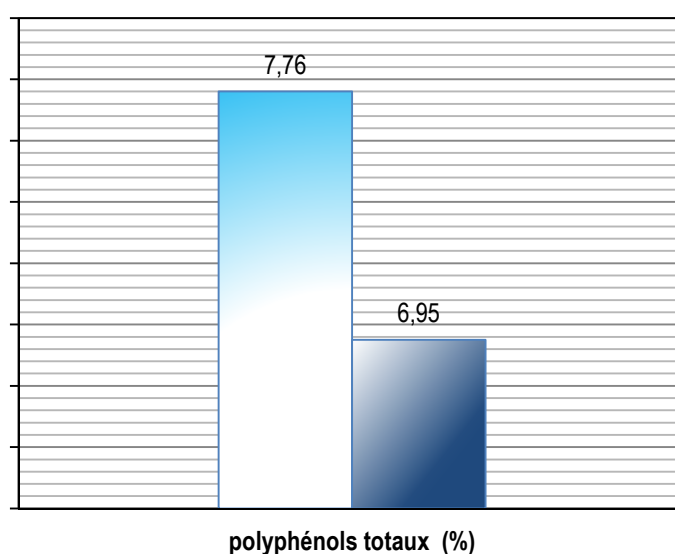


Figure 12 : Effet du cultivar sur la teneur en polyphénols des feuilles d'olivier.

Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Boudhioua et al (2008) qui ont étudié l'effet de la variété d'olivier sur les polyphénols extraits de feuilles. Ces auteurs suggèrent que cette variation est due aux changements climatiques et aux facteurs édaphiques.

Pour cela, les feuilles de la variété Menara ont été choisies pour les expériences ultérieures.

1-2. Effet du rapport matière végétale/ nature du solvant (p/v)

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée à partir des feuilles d'olivier fraîches à différents rapport matière végétale/solvant d'extraction. Ainsi, les rapports 10%, 20% et 30% ont été choisis pour l'extraction par l'eau et le mélange eau/éthanol (7/3, v/v). La figure ci-après représente les résultats obtenus.

La figure montre que les rendements de l'extraction diminuent d'une façon étonnante avec l'augmentation du rapport (p/v) pour les deux solvants utilisés ; à savoir, l'eau et l'eau/éthanol (70%, 30%) (v, v).

La quantité des composés phénoliques extraite augmente significativement avec le rapport matière végétale/solvant 10% ainsi qu'avec l'eau/éthanol.

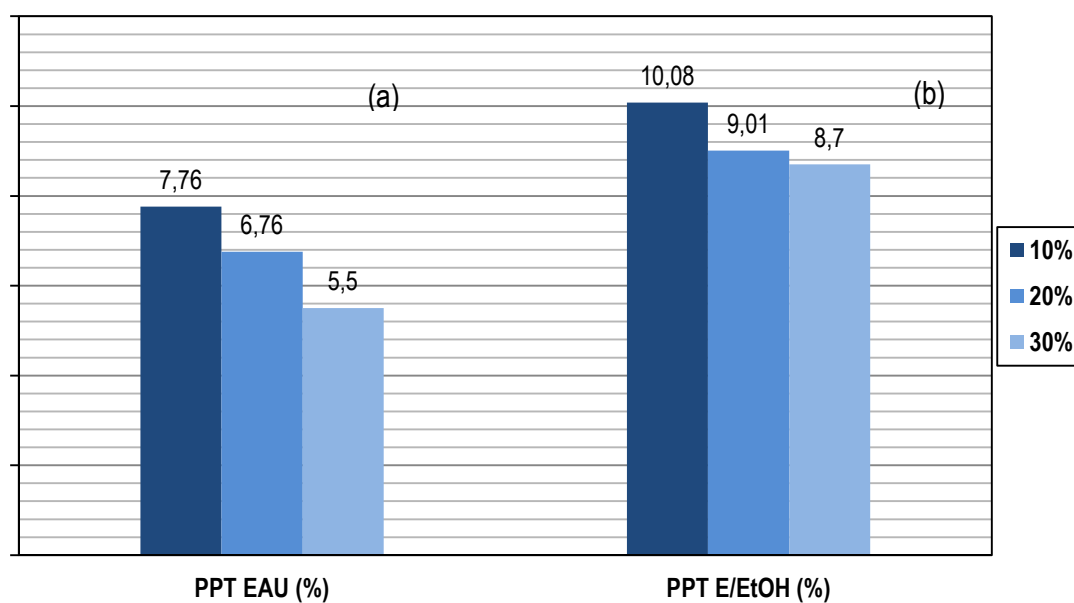


Figure 13 : Effet de la quantité des feuilles fraîches et du solvant sur le taux des PPT extraits, (a) extraction à l'eau et (b) extraction à l'eau/éthanol (70/30, v/v).

Ces résultats pourraient être dus soit à la nature du solvant, à la nature du substrat ou bien au problème physique lié à l'agitation. Schultz et Ambroscheit (1989) ont étudié l'effet de l'affinité eau/éthanol sur la diffusion dans des analytes de tissus riches en eau interstitielle et dans les cellules où l'eau libre est abondante.

Selon les mêmes auteurs, l'éthanol a une grande affinité pour l'eau. Il déstabilise les interactions hydrophobes responsables de la structure tertiaire des molécules protéiques ou lipoprotéiques présentes dans les membranes cellulaires. De plus, l'action alcoolisée de l'éthanol, provoque certaines dégradations au sein des matières végétales portant notamment sur la rupture des ponts éther des molécules phénoliques, en particulier des motifs de lignine. L'éthanol modifie donc la structure des tissus ligneux ainsi que le contenu cellulaire des matières traitées.

2- Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier sèches

2-1. Effet de la quantité et du solvant

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée à partir des feuilles sèches, la figure ci-dessous montre les résultats des rendements obtenus.

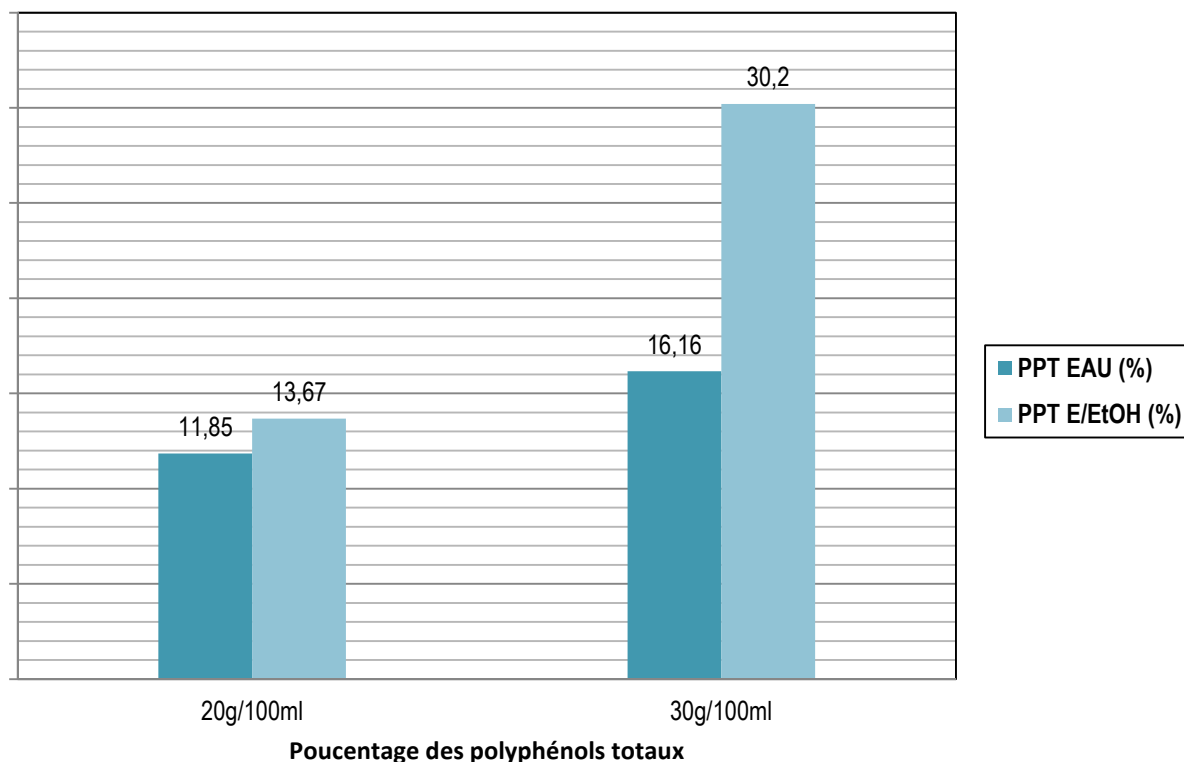


Figure 15 : Effet de la quantité de la matière végétale et du solvant d'extraction sur la quantité des composés phénoliques extraite des feuilles sèches.

Le graphe ci-dessus montre qu'il y a une augmentation significative et proportionnelle des PPT extraits avec l'augmentation du rapport (p/v), pour les deux solvants utilisés. Alors que dans l'expérience précédente, l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles fraîches, il y avait une diminution au cours de l'augmentation de la quantité des feuilles.

A 30g de feuilles séchées, on atteint le maximum du rendement malgré la présence du problème d'agitation qui se pose à cause de la grande quantité des feuilles qui absorbent le volume d'eau ou le solvant.

2. Comparaison entre l'extraction avec des FOF et avec des FOS par les solvants

La comparaison entre l'extraction des composés phénoliques par les feuilles fraîches ou sèches à différentes quantités et par différents solvants ce montrent dans la figure 16.

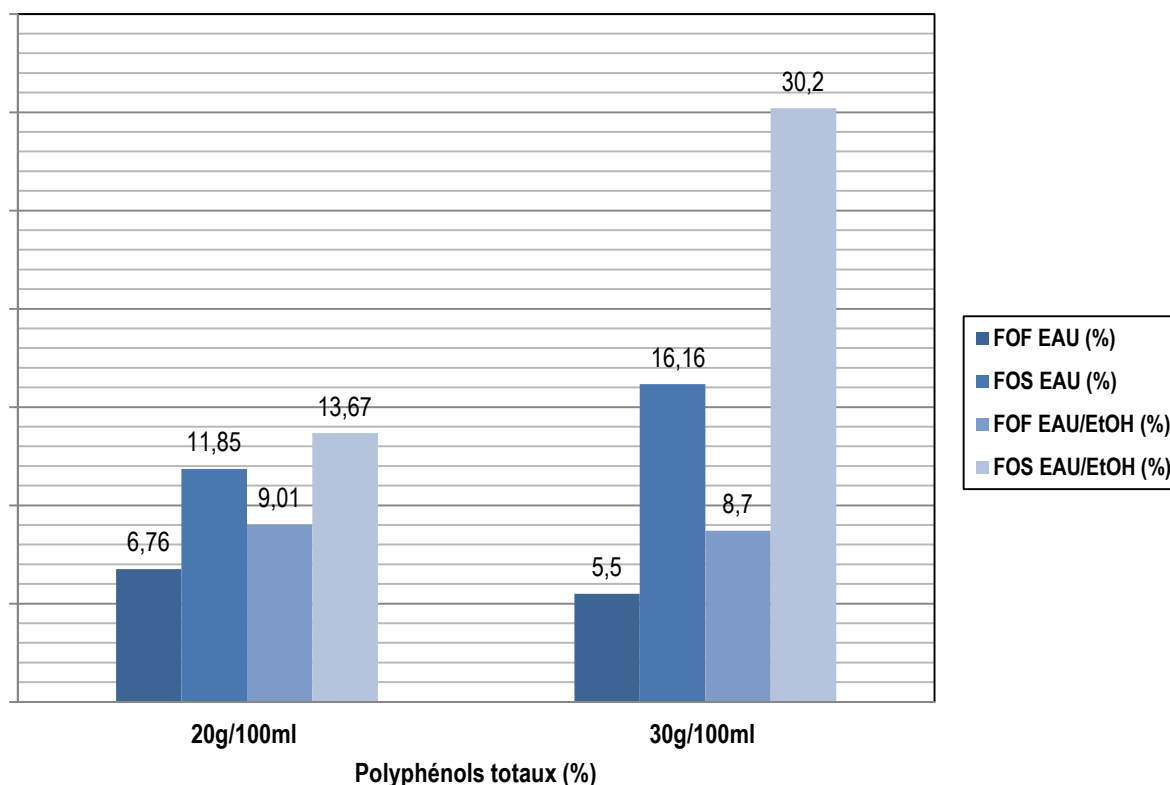


Figure 16 : Comparaison entre la quantité des polyphénols extraite des feuilles fraîches et des feuilles sèches par différent solvants et à différents rapport matière végétale/solvant.

3-Extraction des PPT à partir des feuilles d'olivier sèches blanchies

Les PPT extraits par les feuilles sèches blanchies dans un solvant (eau /éthanol ; 70% / 30%) sans agitation, et avec agitation au shaker donnent les résultats suivants :

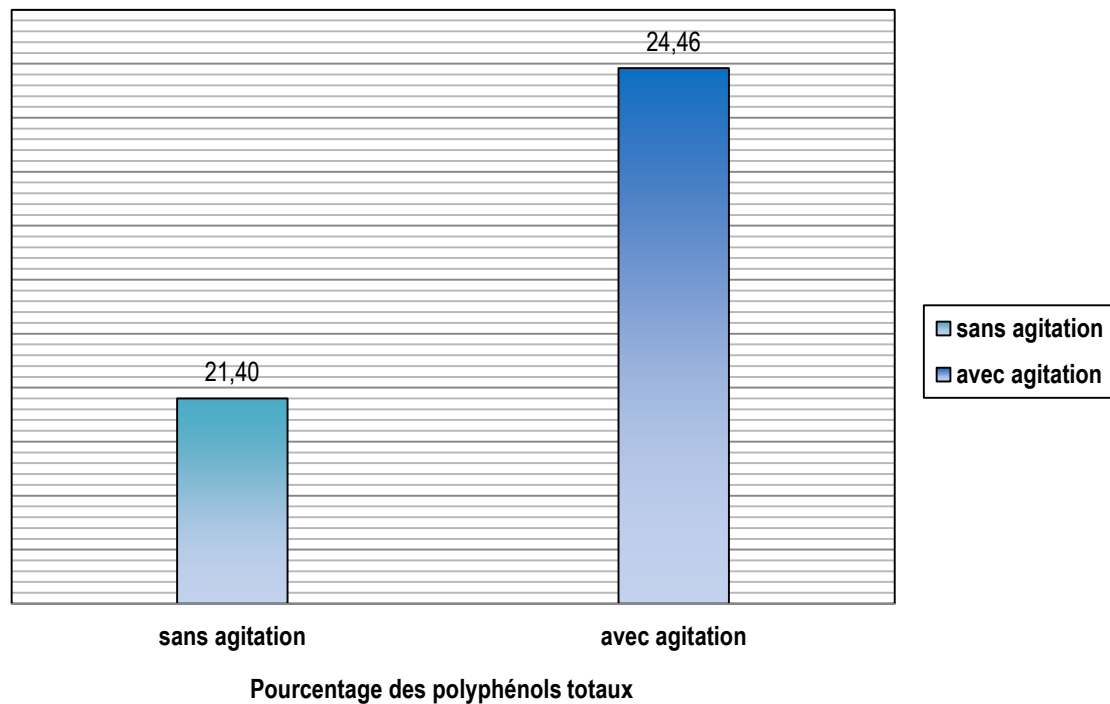


Figure 17 : Effet de l'agitation sur la quantité des composés phénoliques extraits des feuilles d'olivier sèches et blanchies.

Les résultats montrent que l'agitation a un effet positif sur le rendement d'extraction des composés phénoliques, les valeurs enregistrées étaient de l'ordre de 24,46% et 21,40% pour les feuilles blanchies avec agitation et sans agitation respectivement.

Le rôle de l'agitation se traduit par le maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu, permet aussi de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface solide liquide et d'augmenter le coefficient de transfert (Dibert 1989; Leybros et Frémeaux 1990).

Les feuilles sèches blanchies infusés dans le milieu aqueux chaud à 45°C qui contient 30% d'éthanol avec l'agitation pendant 24h, les résultats sont figurés ci-dessous :

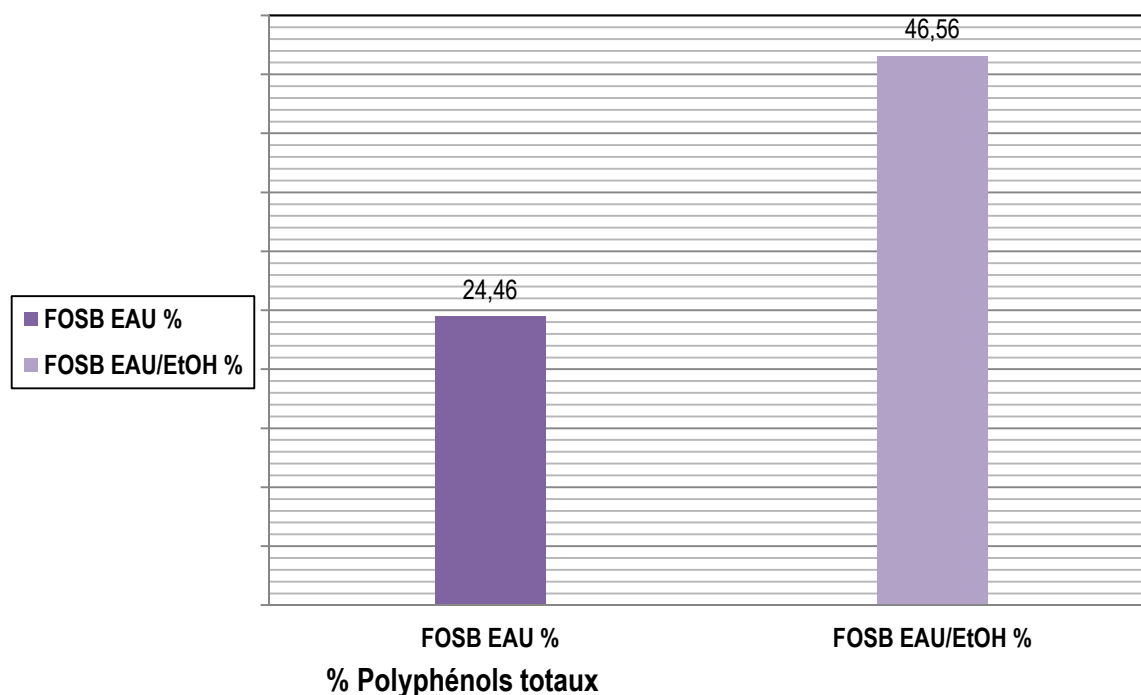


Figure 18 : Effet du solvant sur le rendement des PPT extraits des feuilles sèches et blanchies.

Le graphe montre que les feuilles sèches blanchies dans le solvant eau/éthanol (70%/30%) avec agitation donne un rendement optimum en PPT dans l'extrait avec 46,56%. Or, les feuilles sèches blanchies dans l'eau donnent seulement un rendement de 24,46%. La différence en teneur des composés phénoliques entre l'extraction par de l'eau et par le solvant est très grande, elle atteint une valeur de 22,1%.

4- Comparaison entre les rendements des feuilles sèches, fraîches et blanchies : discussion

L'eau est le solvant le plus utilisé en industrie agroalimentaire. Elle est le solvant le plus universel puisqu'elle convient à l'extraction des sucres, de matières azotées et à celle des sels minéraux (Bimbenet *et al.*, 1993).

Tableau 3 : Rendements, par 100g de la matière sèche, obtenus avec les feuilles fraîches, sèches et blanchies.

	FOF	FOS	FOSB
Eau	5,5	16,16	24,46
Eau/EtOH	8,7	30,2	46,56

Les autres principaux solvants utilisés sont les alcools (éthanol entre autres), les hydrocarbures et les solvants halogénés. Les solvants chlorés qui sont moins sélectifs que les hydrocarbures, ont des diffusivités plus élevées (Vigneron 1954).

Le tableau 3 montre que les meilleurs rendements en terme d'extraction des composés phénoliques ont été obtenus avec les feuilles d'olivier séchées à 40°C et blanchies dans le mélange eau/EtOH (70/30, v/v) à 45°C, avec un rendement maximal d'environ 47% par rapport à la matière sèche.

Ce rendement obtenu avec les feuilles sèches blanchies revient au chauffage du solvant d'extraction. En revanche, la chaleur facilite l'extraction en perméabilisant les parois cellulaires par dénaturation, augmente la solubilité des matières à extraire, et augmente aussi les coefficients de diffusion, enfin, elle diminue la viscosité des solvants d'extraction, ce qui facilite non seulement le passage du solvant à travers la masse de substrat solide, mais aussi les opérations ultérieures de séparation (Leybros et Frémeaux 1990; Binbenet, Duquenoy et al. 1993).

El Belghiti (2005) a proposé une approche fondamentale des processus et des mécanismes de l'extraction et d'interaction solide/liquide (solvant) se traduisent par quatre processus successifs de (Fig. 20) :

- « Transfert » du solvant au sein de la matrice solide, ce qui pourrait faire intervenir, en plus de la diffusion proprement dite, des phénomènes complexes de capillarité, etc.,
- Dissolution du soluté dans le solvant ; il s'agit donc de mettre en solution les divers composés en s'approchant, en terme de concentration, de l'état d'équilibre qui est fonction de la nature du composé, du solvant et de la température,
- Diffusion du soluté dissous dans la solution et sa migration de l'intérieur (surface d'interaction entre le solvant et les divers points de la matrice solide) et la surface externe,
- Transfert (par diffusion, mais nettement plus généralement par convection, agitation, etc.) du soluté dans la masse liquide extérieure restante du solvant.

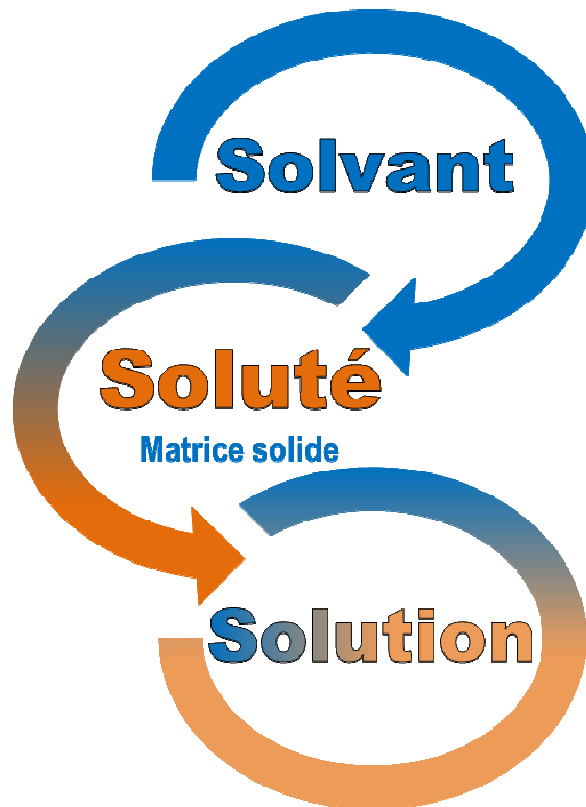


Figure 20 : Schéma des principales étapes ayant lieu lors d l'opération d'extraction solide-liquide.

La vitesse et la cinétique de ces divers processus intervenant d'une façon successive évoluent différemment selon les conditions opératoires incluant la nature du solvant, la température à laquelle se déroule l'opération, les molécules à extraire (soluté), la structure de la matière solide, l'agitation et le type des ressources mécaniques et/ou thermiques.

5- Effet de l'épuisement par renouvellement du substrat

Le cycle d'épuisement des feuilles fraîches et sèches donne les résultats suivants :

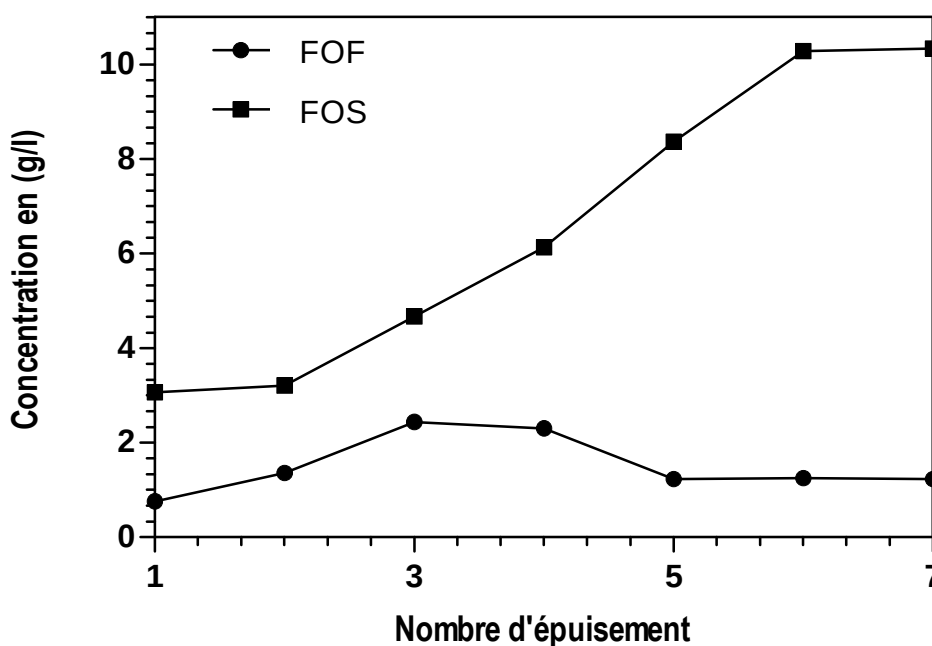


Figure 21 : Comparaison de la quantité des composés phénoliques par les feuilles fraîches et les feuilles sèches au cours d'une série d'épuisement.

La concentration des polyphénols augmente successivement dès le premier cycle de l'épuisement avec les feuilles sèches, l'optimum est atteint au bout du sixième cycle avec une concentration de 10,28 g/l. Cependant, avec les feuilles fraîches la concentration des composés phénoliques augmente jusqu'au troisième cycle d'épuisement avec une valeur de 2,44 g/l, puis subie une diminution significative. Le point de saturation est rapidement atteint avec les feuilles fraîches par rapport aux sèches.

La différence entre les concentrations des polyphénols totaux enregistrée chez les feuilles sèches et les feuilles fraîches pourrait être due au séchage des feuilles qui facilite nombreuses réactions de dégradation dans le milieu aqueux, avec une détérioration rapide du contenu cellulaire (voir paragraphe précédente). La diminution du taux des polyphénols totaux dans le cas des feuilles fraîches peut s'expliquer par la dégradation soit chimique due aux réactions d'oxydation ou biologique sous l'effet de champignons et de bactéries.

6- Effet de la durée : cinétique d'extraction des PPT à partir des feuilles d'olivier

Le but de cette expérience est de déterminer la corrélation entre la durée d'extraction et le rendement des composés phénoliques. Une suivie de la quantité des polyphénols extraite a été réalisée après chaque 2 heures pendant 24 heures, puis chaque 20 min pendant 2h. Pour permettre d'extraire le maximum de polyphénols des feuilles d'olivier sèches et blanchies par le solvant mélangé de l'eau et de l'éthanol (70/30, v/v).

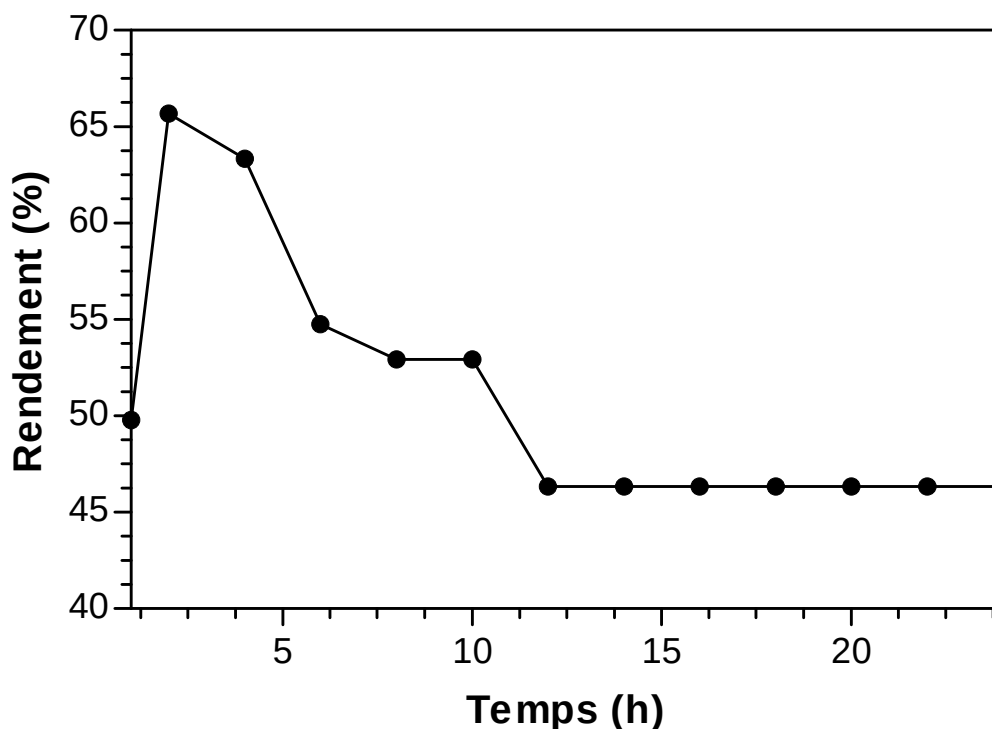


Figure 22 : Effet de la durée de 24h d'extraction sur le rendement des polyphénols.

Les résultats montrent que le rendement de polyphénols atteint son optimum au bout de deux heures avec un rendement maximal de 65,70% alors qu'il diminue à 46,56% après 24 heures.

On constate que les quantités de substances extraites sont en fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles en dissolution du composé etc.)

La figure montre la variation du rendement des polyphénols extraits de feuilles sèches blanchies durant 140 min.

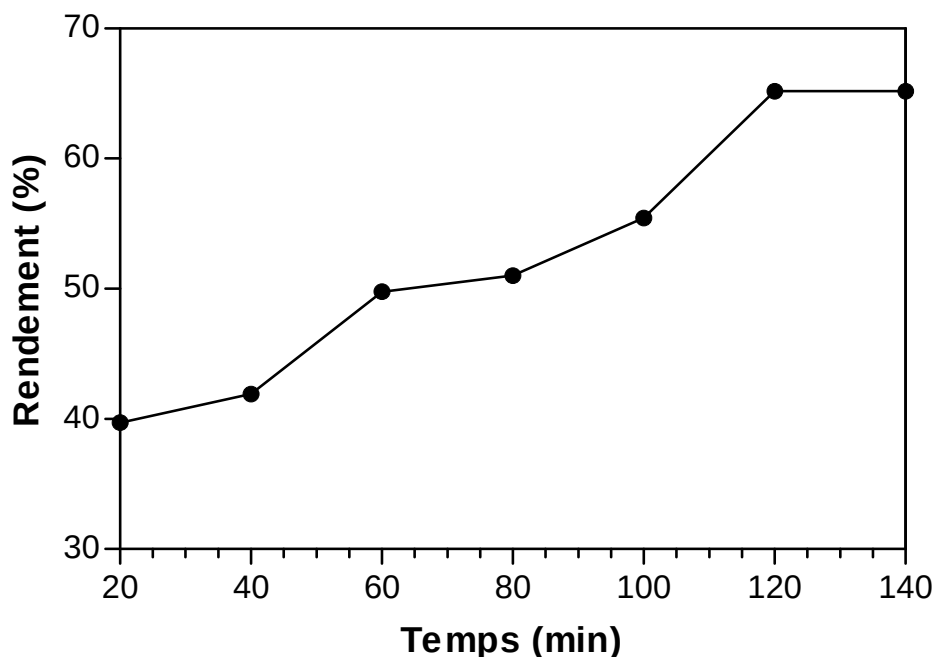


Figure 23 : Effet de la durée de 24h d'extraction sur le rendement des polyphénols.

Le rendement de polyphénols extraits augmente successivement jusqu'à la 120^{ème} min où on atteint le point de saturation du solvant. Le même résultat est obtenu dans la cinétique de 24 heures, un pourcentage de 65,70% au bout de 2 heures, ce qui confirme que l'extraction des polyphénols totaux ne dure que deux heures pour atteindre pour avoir un rendement optimal.

Les quantités de substances extraites sont en fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles, dissolution du composé etc.)

Généralement, une élévation de la température traduisant l'agitation moléculaire permet de diminuer les temps de contact et ce, sans diminution notable du rendement.

A titre indicatif, une méthode comme la macération dure environ 8 à 10 jours, par contre des méthodes comme la décoction ne nécessitent que des temps de contact rapides de l'ordre d'une dizaine de minutes (Groubert 1984).

Ainsi, l'augmentation de la durée d'extraction peut conduire à la dégradation oxydative des principes actifs en question et au développement des microorganismes (bactéries, champignons) qui dégradent ces molécules en faveur de leurs réactions biologiques. Ce qui explique bien le résultat obtenu pour les feuilles fraîches, figure 13.

II- Dosage des flavonoïdes et des ortho-diphénols dans l'extrait de feuille d'olivier

Pour la détermination de la teneur des flavonoïdes dans l'extrait brut éthanolique, on a réalisé une courbe d'étalonnage par la quercétine pour déterminer la quantité des flavonoïdes selon l'équation présentée dans la figure ().

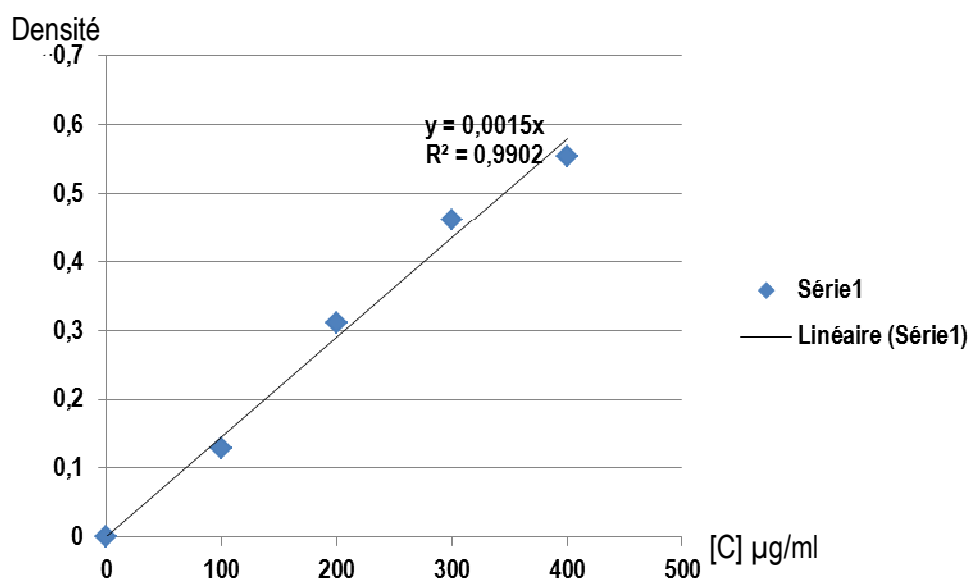


Figure 24 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes de la quercétine.

La concentration des flavonoïdes dans l'extrait est de :

Tableau 4 : La concentration des flavonoïdes dans l'extrait brut.

Echantillon	Flavonoïdes de l'extrait
Densité Optique	0.972
Concentration mg/l	648

Le pourcentage des flavonoïdes représente 4% du taux des de la concentration des polyphénols totaux.

Pour la détermination de la teneur des o-diphénols dans l'extrait brut éthanolique, on a réalisé une gamme d'étalonnage par l'acide caféique afin de déterminer la quantité des à-diphénols selon l'équation présentée dans la figure 24.

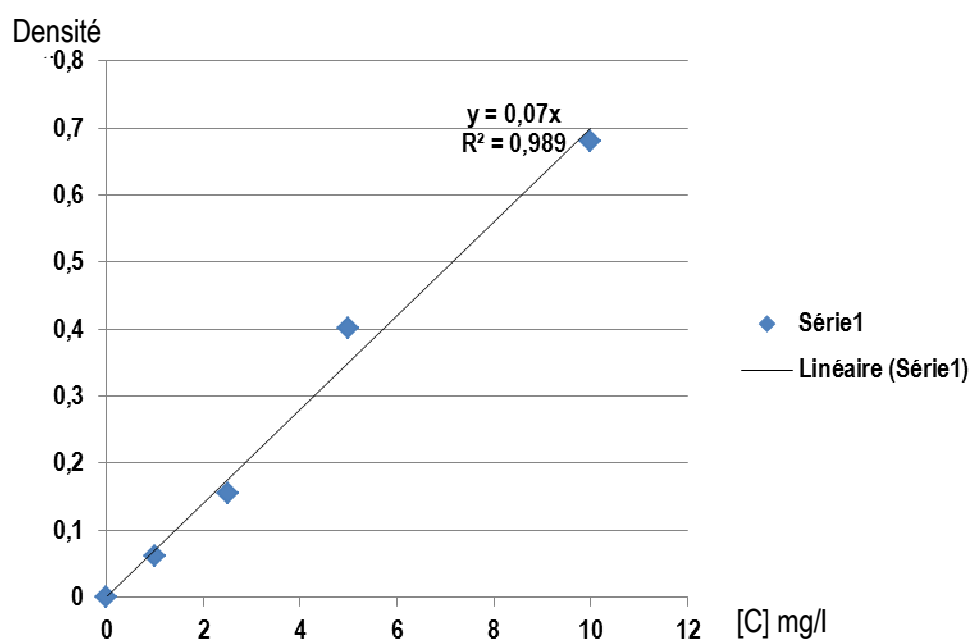


Figure 24 : Courbe d'étalonnage des ortho-diphénols de l'acide caféique.

Le pourcentage des ortho-diphénols se présente par 0,1% du taux des PPT. La figure 25 montre le taux des ortho-diphénols par rapport aux composés phénoliques :

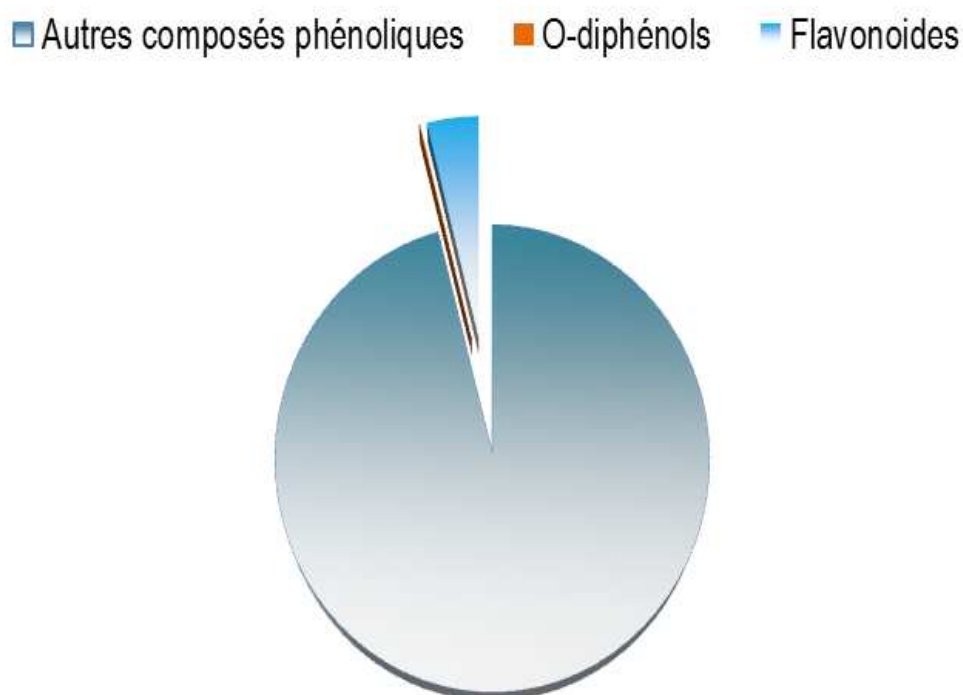


Figure 25 : Pourcentage des O-diphénols et des flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux.

IV- Activités biologiques de l'extrait de feuilles d'olivier

1- activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'extrait de feuilles d'olivier préparé été évaluée en utilisant une solution méthanolique des radicaux libres «stable», DPPH $\cdot$. Une solution de DPPH fraîchement préparé présente une couleur pourpre foncée avec un maximum d'absorption à 517 nm. Cette couleur pourpre disparaît généralement quand un antioxydant est présent dans le milieu. Ainsi, les molécules antioxydantes peuvent piéger le radical libre DPPH $\cdot$ et le convertir en un produit incolore, soit lui en fournissant des atomes d'hydrogène ou en lui cédant un électrons, vraisemblablement via une attaque de l'électron libre sur la molécule de DPPH $\cdot$ (Fig. 26) (2,2-diphényl-1-hydrazine ou une hydrazine analogue substitué), ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (Yamaguchi et al., 1998). DPPH essai est le test couramment utilisé pour l'étude de l'activité antioxydante des composés synthétiques purs, des composés naturels isolés et des extraits bruts des plants.

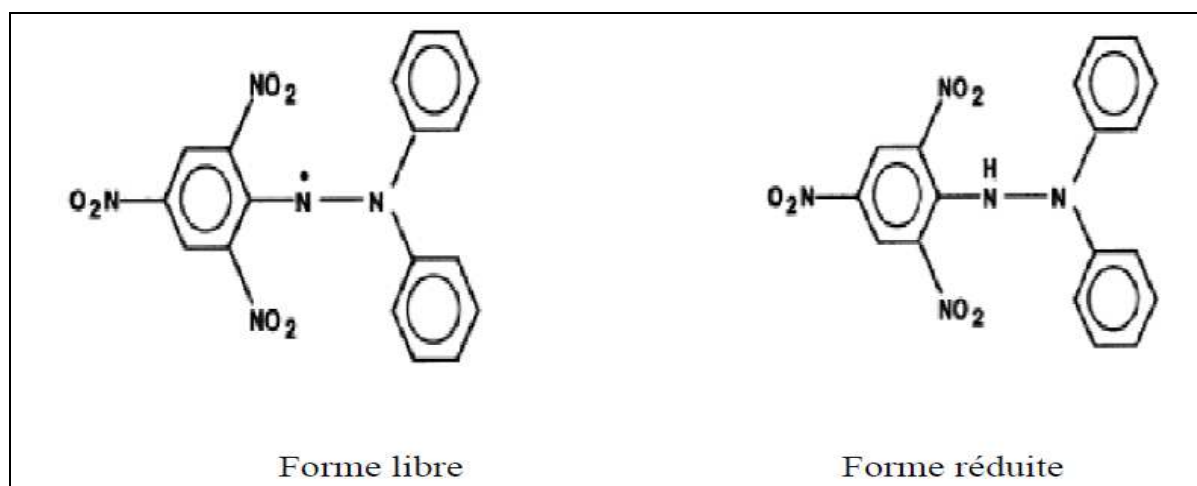


Figure 26 : Forme libre et réduite du DPPH (Mohammedi, 2006)

Les valeurs de l'activité antioxydante d'extrait brut de feuilles d'olivier ont été étudiées et comparées avec celles de l'acide ascorbique. La figure () représente les courbes dose-réponse de l'activité antioxydante de l'extrait de feuilles d'olivier, les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution de l'absorbance à 517 (Yoshida et al., 1989).

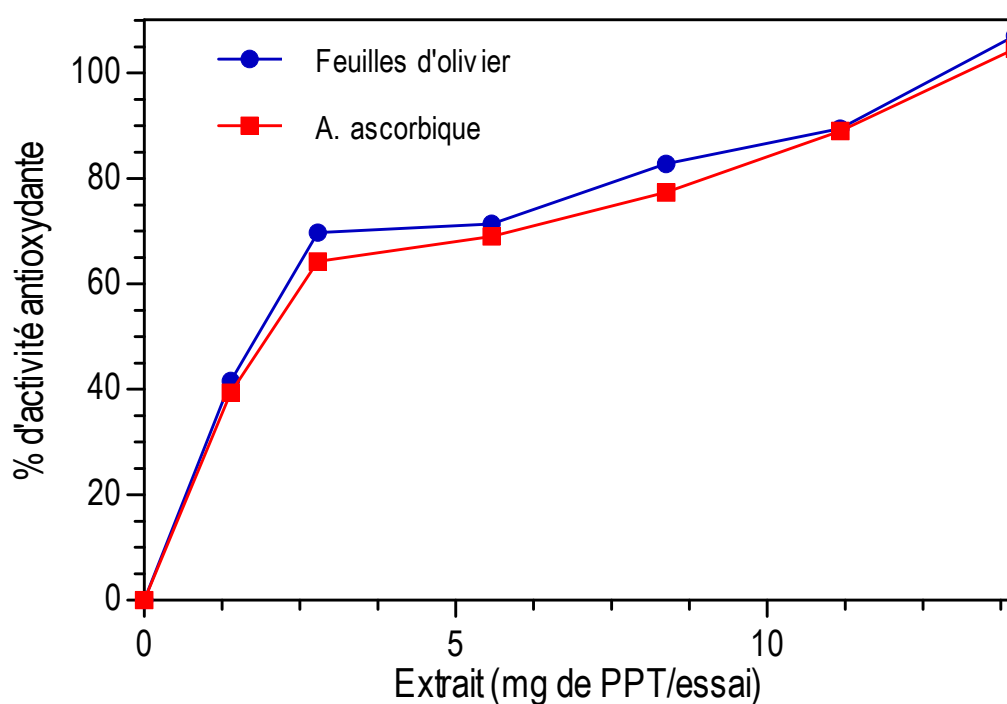


Figure 27 : Comparaison entre l'activité antioxydante de l'extrait brut de feuilles d'olivier et de l'acide ascorbique.

L'extrait phénolique de la feuille d'olivier semble avoir un effet un peu meilleur que celui de l'acide ascorbique. Cet effet est peut être due aux composés phénoliques qu'il contient. En effet, le taux des phénols totaux, déterminé précédemment, dans cet extrait dépasse les 65% par gramme de matière sèche. Ainsi, l'activité antioxydante de chaque extrait dépendait de la nature et la puissance de leurs composés phénoliques.

Dans l'extrait de la feuille d'olivier, l'oleuropéine s'est avéré le composé phénolique majeur. La rutine, la vanilline et l'acide caféique sont des composés mineurs (Lee et al., 2009). En fait, l'oleuropéine, en lui-même un antioxydant puissant, a conféré à l'extrait éthanolique un effet antioxydant intéressant et remarquable. À la différence de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier, l'extrait aqueux dans lequel l'oleuropéine ne fut pas détectée, présente une activité antioxydante moindre (Lee et al., 2009).

Les conclusions de Lee (2009) sur la particularité de l'effet antioxydant des composés contenus dans les extraits de feuilles d'olivier, concordent avec ceux de Benavente-Garcia et al (2000), qui montrent la richesse des feuilles d'olivier en composés phénoliques à effet synergique élevé, comme les oleurosides (oleuropéine et verbascoside), les flavones

(lutéoline, diosmétine, apigénin-7-glucose, lutéolin-7-glucose et diosmétin-7-glucose), les flavonols (rutine), flavan-3-ols (catéchine), et les substituts des phénols (tyrosol, hydroxytyrosol, vanilline, acide vanillique et acide cafféique).

2- Activité anti-inflammatoire

Les pourcentages d'inhibition de l'œdème, provoqué chez le rat par l'injection du carragénine, reflète l'activité anti-inflammatoire, plus ces pourcentages sont élevés, plus l'activité anti-inflammatoire est élevée.

Nous constatons aussi que notre extrait diminue l'inflammation de presque la moitié (45%) dès le premier test réalisé après 3h d'injection alors que l'indométacine n'inhibe qu'avec 19% seulement.

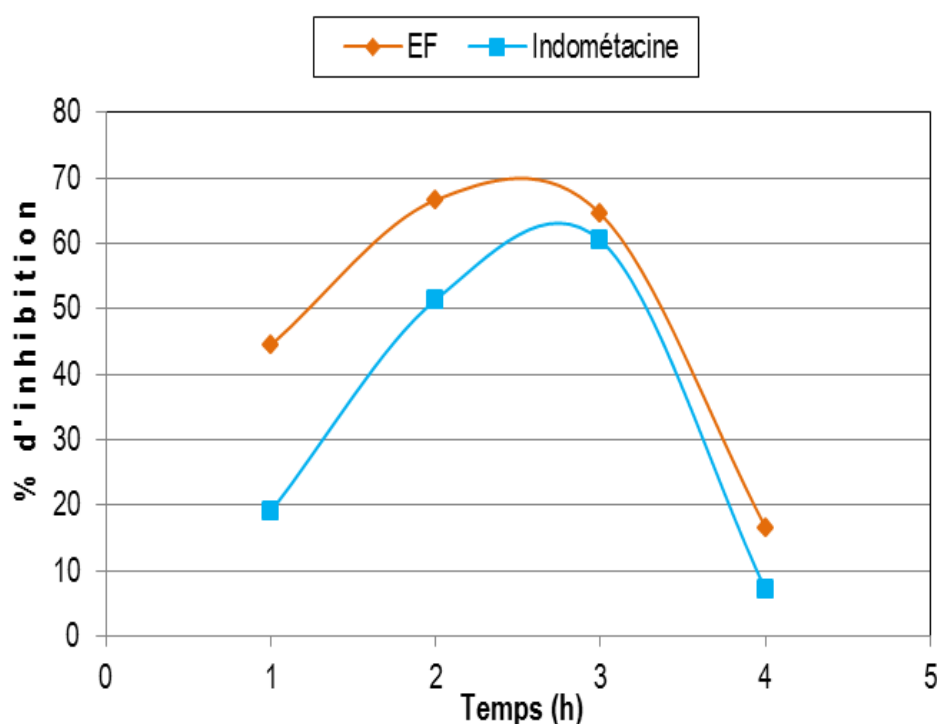


Figure 28 : Profil anti-inflammatoire de l'extrait de feuilles d'olivier (600 mg/kg) comparé à celui de l'indométacine.

Les résultats ont indiqués que notre extrait a présenté une activité significativement plus élevée que celle du control positif (Indométacine) sur tout l'intervalle de temps. Cette activité pourrait être liée à sa richesse en polyphénols.

En effet, il est bien connu que les polyphénols ont des propriétés anti-inflammatoires *in vivo*. La réponse inflammatoire au cours de l'athérogénèse comprend l'adhésion des leucocytes, des monocytes et des lymphocytes à l'endothélium. L'adhésion de ces cellules est facilitée par les molécules d'adhérence intercellulaire 1 (ICAM-1), les molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1) et le facteur E-sélection (Dell'Agli et al., 2006). Carluccio *et al* (2003) ont rapporté que des doses physiologiquement pertinentes de composés phénoliques extraits de l'huile d'olive extra vierge réduisent l'expression des ICAM-1 et des VCAM-1 sur la surface des cellules (fig. 29). Un mélange de polyphénols d'olive, y compris l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol a aussi permis une diminution des taux d'ARNm de VCAM-1, du facteur E-sélection et l'activité du promoteur du gène codant pour l'ICAM-1 (Carluccio et al., 2003).

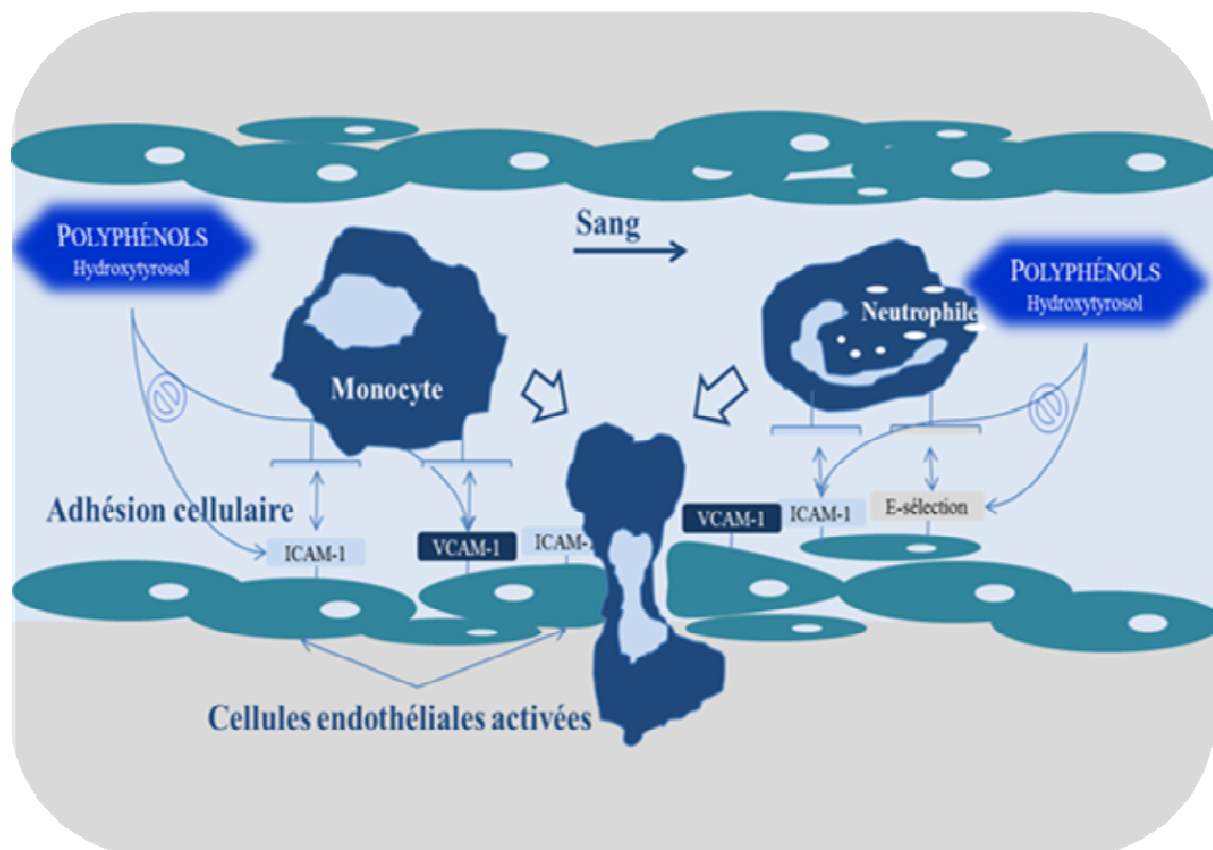


Figure 29 : Effet anti-inflammatoire des polyphénols, action sur les molécules d'adhésion endothéliales.

Conclusion

Le présent travail avait comme but l'optimisation de l'extraction solide-liquide des composés phénoliques à partir des feuilles d'olivier. Cette étude révèle aussi l'importance de l'extrait de feuilles d'olivier riche en oleuropéine comme agent antioxydant et anti-inflammatoire par des essais effectués *in vitro* et *in vivo*.

Le rendement maximum des composés phénoliques extraits de la feuille d'olivier est obtenu avec les feuilles séchées et blanchies à 40°C et 45°C, respectivement. Ainsi, un rendement qui dépasse les 65% de polyphénols totaux par 100 gramme de matière sèche est obtenu.

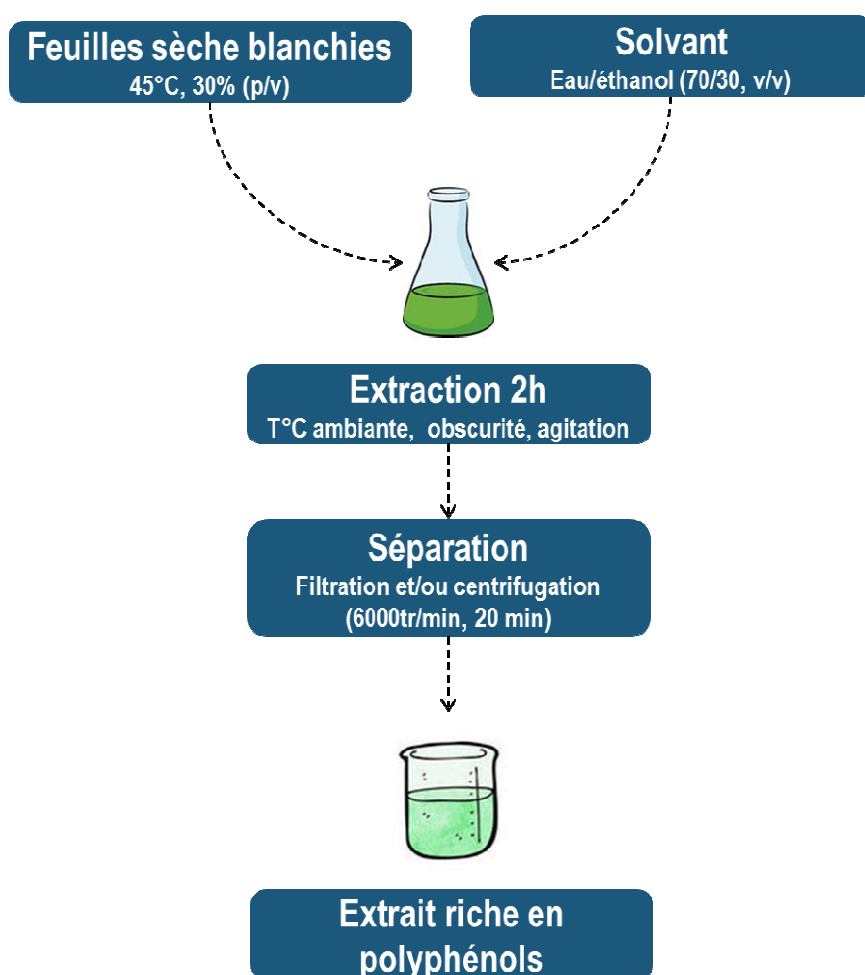


Figure 30 : Méthode optimale pour l'extraction solide liquide des polyphénols à partir des feuilles d'olivier.

L'activité antioxydante de cet extrait s'est avérée plus importante que celle de l'acide ascorbique. Les résultats obtenus montrent clairement que les polyphénols extraits de la feuille d'olivier sont des vrais concurrents pour le BHT et pour l'acide ascorbique. De plus, ils ont l'avantage d'être d'origine naturelle. L'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait des feuilles d'olivier sur les rats a montré qu'il présente une activité anti-inflammatoire très importante que le médicament Indométacine.

Ainsi, les études cliniques réalisées chez l'Homme seront nécessaires pour révéler l'un intérêt thérapeutique des polyphénols extraits des feuilles d'olivier. Toutefois, de nombreuses études fondamentales seront encore nécessaires pour comprendre les mécanismes d'action et les effets au niveau cellulaire et intégré de ces composés.

En revanche, les systèmes technologiques industriels peuvent donc exploiter les feuilles d'olivier en tant que matière première très riche en polyphénols, afin de les employer à la place des antioxydants synthétiques dangereux.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

Andrikopoulos, N.K., Antonopoulou, S., Kaliora, A.C (2002). Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35, 479–484.

Baracco A., Bertin G., Gnocco E., Legorati M., Sedocco S., Catinella S., Favretto D., Traldi P (1995). A comparison of the combination of fast-atom bombardment with tandem mass spectrometry and of gas chromatography with mass spectrometry in the analysis of a mixture of kaempferol, kaempferide, luteolin and oleuropein. *Rapid Commun Mass Spectrom.*; 9: 427–436. doi:10.1002/rcm. 1290090512.

Bartosz G (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A., (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* leaves. *Food Chem.* 68 (4), 457–462.

Benlemlih M, Ghanam J (2012). Polyphénols d’huile d’olive trésors santé, Polyphénols aux actions antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, anti-vieillessement et protectrices cardio-vasculaires. Embourg, Belgique : marco pietteur, éditeur, ISBN 978–2–87211–117–6.

Benzie I. F., Strain J (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Bimbenet J. J., Duquenoy A. et al. (1993). Génie des procédés alimentaires des bases aux applications. Paris.

Bird R. B., Steward W.E. et al., (1976). Diffusivity and the mechanisms of mass transport in Transport Phenomena. New York, John Wiley & Sons.

Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A., (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* Vol. 51. (1999). pp. 971-4.

Blois M.S (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181,1199-1200.

Bonoli M., Bendini A., Cerretani L., Lercker G., Toschi TG (2004). Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J Agric Food Chem.*; 52: 7026–7032. doi:10.1021/jf048868m.

Bouaziz, M., Sayadi, S (2003). Hight yield extraction of oleuropein from chemlali olives and leaves and bioconversion to hydroxytyrosol. *Polyphénols Actual.* 23, 11–15.

Boudhioua N., Ben Slimen I., Bahloul N. et Kechaou N (2008). Etude du séchage par infrarouge de feuilles d'olivier d'origine tunisienne. *Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08 Alger* 111 – 116.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.

Brenes M., Garcia P., DuranMC., Garrido A (1993). Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives. *J Food Sci.*; 58: 347–350. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb04272.x.

Cacace J. E. and Mazza G., (2003). "Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries." *Journal of Food Engineering* 59(4): 379-389.

Campeol E., Flamini G., Chericoni S., Catalano S., Cremonini R (2001). Volatile compounds from three cultivars of *Olea europaea* from Italy. *J Agric Food Chem.*; 49: 5409–5411. doi:10.1021/jf010455n.

Capasso R., Evidente A., Scognamiglio F (1992). A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochem Anal.*; 3: 270–275. doi:10.1002/pca.2800030607.

Carluccio M., Siculella L., Ancora M, (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:622–629.

Chambers, Exaudi-Larsen C. K. et al. (1996). "Aqueous extraction of solubles from oranges: a kinetic study." *Food Chemistry* 57(4): 483-486.

Cowan M.M (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microb. Rev. Vol. 12.. pp.564-582.

Cu, J. Q., Perineau F. et al. (1989). " Comparison of the chemical composition of carrot seed essential oil extracted by different solvents." J. Flavour Fragra 4(4): 225-231.

Damtoft S., Franzyk H., Jensen SR (1995). Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: carbocyclic iridoid precursors. Phytochemistry. 40: 785–792. doi:10.1016/0031-9422(95)00210-X.

Damtoft S., Franzyk H., Jensen SR (1993). Biosynthesis of secoiridoid glucosides in *Oleaceae*. Phytochemistry.; 34: 1291–1299. doi:10.1016/0031-9422(91)80018-V.

Damtoft S., Franzyk H., Jensen SR (1992). Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior*. Phytochemistry.; 31: 4197–4201. doi :10.1016/0031-9422(92)80442 H.

De Gaulejac Saint-Cricq, Provost N., Vivas N (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 425-431.

De la Puerta R., Guttierrez VR., Hoult JRS (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. Biochem Pharmacol.; 57: 445–449. doi:10.1016/S0006-2952(98)00320-7.

De Laurentis N., Crescenzo G., Lai OR., Milillo MA (1997). Investigation on the extraction and concentration of oleuropein and flavonoids in *Olea europaea* L. based products. Pharm Pharmacol Lett.; 7: 27–30.

De Leonardis A et Macciola V (2010). Olive Biophenols as Food Supplements and Additives in “Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention” Copyright © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved . Edited by: Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson ISBN: 978-0-12-374420-3. 2010, Pages 283-289.

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

Di Donna L., Mazzotti F., Salerno R., Tagarelli A., Taverna D., Sindona G (2007). Characterization of new phenolic compounds from leaves of *Olea europaea* L. by high-

resolution tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*; 21: 3653–3657.
doi:10.1002/rcm.3262

Dibert K., (1989). contribution à l'étude de l'extraction solide-liquide de l'huile et de l'acide chlorogénique du café vert. LYON, Claude Bernard LYON I. Engineer's Handbook. New York, McGraw-Hill Book Co: 247-289.

Esmaeili-M,S., Rezaeezadeh-R,M., Esmaeilpour, K., Abbasnejad, M., Rasoulia, B., Sheibani, V., Kaeidi, A. and Hajializadeh, Z. (2010). Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *J. Ethnopharmacol*132:200-205.

Ficarra P., Ficarra R., de Pasquale A., Monforte MT., Calabro ML (1991). HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L. *Farmaco.*; 46: 803–815. PMID:1772565.

Gao L., and Mazza G., (1996). "Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls." *J. Food sci.* 61: 600-603.

Gerin M., (2002). Solvants industriels : Santé, Sécurité, Substitution. Paris, Ed. Masson.

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

Hamdi, K.H., Castellon R., (2005). Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an antitumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 769–778.

Hatzidimitriou Ef., Nenadis N., Tsimidou M.Z (2007). Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*, 105, 1504-1511.

Hua Li., Xiaoyu Wang, Peihong Li., Yong Li., Hua Wang (2008). Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (6), 67-73.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L (2005)., The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Jemai H., Bouaziz M., Fki I., El Feki A., Sayadi S., (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem. Biol. Interact.* 176, 88–98.

Krasuk, J. H., Lombardi J. L et al., (1967). I&EC Process Desing & Develop. 6(2): 56-59.

Landbo A.-K. R. and Meyer A. B. S., (2001). Enzymatic enhancement and oxidant leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res.* 66, 129–136.

Leybros J. and Frémeaux P., (1990). "Extraction solide-liquide aspects théoriques." techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06.

Liley, P. E., Reide R. C. et al., (1984). Physical and chemical data. Perry's Chemical activities of anthocyanins and other phenolic compounds in black currant juice. Biologically-active phytochemicals in food. Cambridge UK, Royal Society of Chemistry:354-356.

Mafart P. and Béliard E., (1993). Génie Industriel Alimentaire techniques séparatives.

Malik, N.S.A., Bradford, J.M., (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in "Arbequina" olives. *Sci. Hort.* 110 (3), 274–278.

Marc Fr., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C. et al (2004). Methodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences*, 20(4), 458-463.

Maria Bardoulat (2013). Pour en savoir plus, lire : « L'olivier, trésor de santé », Éditions Alpen.

Micol V., Caturla N., Pérez-Fons L., Mas V., Pérez L., Estepa A., (2005). The olive

Mohammad Mounir, S., (2007). Département Génie des procédés Industriels. La Molyneux P., The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004, 26 (2), 211-219.

Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md.*, 21(6), 895-902.

Ok-Hwan Lee, Boo-Yong Lee, Junsoo Lee, Hee-Bong Lee, Jong Youn Son, Cheon-Seok Park, Kalidas Shetty et Young-Cheul Kim (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*. 100 (23), 6107-6113.

Ollier C., (1991). l'extraction végétale en phytothérapie. faculté de pharmacie. Montpellier, Université de Montpellier I.

Omar S.H., (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm. J.* 18, 111–121. Paris, Techniques et Documentation-Lavoisier.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice- Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Ricardo da Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 549-1552.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
Rochelle, Université de La Rochelle.

Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell, G.P., Rice-Evans C.A (1995), Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339-346

Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A ., Saura-Calixto F (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.

Sanchez-Moreno C (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8 (3), 121-137.

Savournin C., Baghdikian B., Elias,R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., Balansard, G. (2001). Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *J. Agric. Food Chem.* 49, 618–621.

Sharma Om P., Bhat T.K (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113 (4),1202.

Soler-Rivas C., Espin JC., Wichers HJ (2000),. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric.* 80: 1013–1023. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C

Sudjana AN., D’Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Riley TV. et Hammer KA (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *I. J. Antimicrob. Agents.* Vol. 33. pp. 461-463.

Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J., Dommes J (2009),. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, 1226-1233.

Turker N. and Erdogan F., (2005). "Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carotavar. L.*)." *Journal of Food Engineering* In Press, Corrected Proof.

Vigneron M., (1954). Fractionnements par solvants. Paris, VIGOT Frères.

Visioli F., Bellosta S., Galli C (1998). Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* 62: 541–546. doi:10.1016/S0024-3205 (97) 01150-8.

Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., & Terao, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 1201–1204.

Yi-Zhong Cai, Mei Sun, Jie Xing, Qiong Luo, Harold Corke (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78(25), 2872-2888.

Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y., & Okuda, T. (1989). Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radicals scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1919–1921.