

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université A. Mira de Bejaia



Faculté de Technologie
Département de Génie des procédés
Laboratoire des Matériaux Polymères Avancés
Mémoire
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
Master
Domaine : Science et Technologie Filière : Génie des Procédés
Spécialité : Génie alimentaire

Présenté par

ZAMOUCHE Dyhia et MOUSSAOUI Kahina

Thème

***Optimisation des méthodes d'extraction éthanolique d'Olea
Europaea et l'étude de leurs activités biologiques.***

Soutenu le 29/06/2022

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Dr. AZZOUG M.	MCA	Université de Bejaia	Président
Dr. CHIBANI N.	MCA	Université de Bejaia	Encadrant
Dr. FATMI S.	MCA	Université de Bejaia	Examineur
Harrate I.	Doctorante	Université de Bejaia	Co- Encadrant

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciement

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de génie des procédés de la Faculté des Sciences et technologie de l'Université Abed Rahman mira.

Le grand Merci nous le réservons à DIEU le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il nous a accordé pour mener à bien notre travail.

Nous remercions profondément nos encadrants madame Chibani Nacera et madame Harrate Imene pour

leurs soutien et les efforts fournis pour nous diriger vers la bonne voie et n'oublions jamais ses critiques bénéfiques pour nous diriger vers un esprit scientifique

Nos vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par Mr Azzoug qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

A Mr Fatmi,S d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail .

Nous remercions madame bensidhoum, pour son soutien et de nous avoir donné la chance et le privilège de donné le droit pour visualisé comment travaillé au niveau de votre laboratoire bactériologique.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à tous les membres de laboratoire génie des procédés

Merci pour votre noblesse et pour ses efforts avec nous.

Dédicace

Je dédie ce travail qui est le fruit des années d'études qui sont pleines de réussite, d'amour, de joie et de bonheur, A toute ma famille et à tous ceux que j'aime.

Spécialement à ceux qui m'ont aidé dans toutes les phases de ma vie.

*Et qui s'est sacrifiée pour mon éducation et pour mon bien être ma chère mère **REBIHA**, Et mon cher père **LAHCENE** pour son soutien tout au long de mon parcours et son encouragement ; toutes les lettres ne seraient trouver les mots qu'il faut, et tous les mots ne seraient exprimer la gratitude.*

*A tous mes chers soeurs « **Katiba, Leila** ».*

*A Mes frères « **Nasreddine ,Abderzak** ».*

*A Ma belle sœur«**Siham**».*

*A Mes tantes « **djamila ,sonia**».*

*A Mes chers cousines«**Imene, Sarah, Célia**».*

*A Ma binome«**Dyhia**»et toute sa famille.*

A tous mes amis proches et la promotion 2021-2022.

A tous ceux qui m'aiment. A tous ceux que j'aime.

Que dieu les garde tous et les protège.

Kahina

DEDICACE

Dieu merci

*Je dédie ce modeste travail avec
Toute mon affection aux êtres qui me
Sont très chers au monde mes parents.*

A ma chère sœur :

«Leila»

Et à mes frères:

«Idir Et Kousseila»

Et à mes chers amis

«Yanni et sarah»

Et à ma camarade

«Kahina»

Et à toute la

Famille « Zamouche».

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AMP: adénosine monophosphate

Cm : centimètre

CMI : concentration minimale inhibitrice

CP : composé phénolique

DPPH : 1,1-Diphényle-2-picryl Hydrazyle

ERO : espèces radicalaire d'oxygène

FAO : Food and Agriculture Organisation (Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).

F-C : Folin-Ciocalteu

G : gramme

IR : infrarouge

Kbr : bromure de potassium

Kg : kilogramme

L : litre

LC : Chromatographie liquide

MAE :Extraction Assistée Par Micro-onde

Mg :milligramme

UAE : Extraction Assistée par Ultrasons.

UV : ultra-violet

% : Pourcentage

Liste des figures

Figure1 : Olivier

Figure2 : Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde

Figure3 : Zones de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen

Figure4 : Répartition de la zone oléicole en Algérie

Figure5 : Feuilles d'olivier

Figure6 : Structure de base des polyphénols

Figure7 : Structure des acides phénoliques

Figure8 : Squelette de base des flavonoïdes

Figure9 : Structure chimique des flavanones

Figure10: Structures chimiques de flavonols

Figure11: Structures chimiques de certains flavan-3-ols

Figure 12: Structure des isoflavones

Figure13: Structure des flavones

Figure14: Structure chimique de quelques anthocyanidines courantes

Figure 15 : Structure des stilbènes

Figure 16 : Structure des deux types de tanins

Figure 17 : Photographie originale des feuilles d'olivier après broyage.

Figure 18 : Photographie originale des feuilles d'olivier après broyage.

Figure 19 : Variables codés d'ESA et EAU

Figure 20: Infrarouge

Figure 21: structure chimique du DPPH. (2,2 diphenyl 1 picrylhydrazyl).

Figure 22 : Mise en évidence de l'effet antibactérienne de l'extrait des feuilles d'olives

Figure 22 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

Figure 23: Teneur en polyphénols des extraits ESA et EAU donnés par les plans d'expériences exprimés en μg EAG/mg ES.

Figure 24 : l'optimum d'ESA et d'EAU obtenu par les plans d'expériences.

Figure 25 : la teneur maximale en polyphénols totaux d'ESA et d'EAU

Figure 26 : Spectres IR-TF de la poudre et l'extrait des feuilles d'olivier.

Figure 27 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Figure 28 : teneur en flavonoïdes.

Figure 29 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

Figure 30 : teneur en tanins condensés.

Figure 31 : Activité anti-radicalaire du DPPH d'ESA.

Figure 32 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition exercés par les deux extraits (EAS et EAU) sur les champignons.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique global des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g)

Tableau 2 : Composition en acides aminées des feuilles d'olivier fraîche (exprimé en g par Kg d'azotetotal)

Tableau 3 : Composition en minéraux des feuilles d'olivier (exprimé en g par Kg de matièreSèche)

Tableau 4 : Structure des squelettes des polyphénols

Tableau 5 : Variables naturelles et codées appliquées aux facteurs investigués

Tableau 6 : Les souches microbiennes testées

Tableau 7 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition exercés par les deux extraits (EAS et EAU) sur les bactéries.

Tableau 8: Récapitulatif des résultats de l'antibiogramme.

Tableau 9 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition exercés par les deux extraits (EAS et EAU) sur les bactéries.

Table des matières

<i>Introduction</i>	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	3
I-Généralités.....	3
I.1. Intérêts des plantes	3
I.2. Olivier.....	3
I.3. Systématique.....	4
I.4. Description botanique de l'olivier	5
I.5. Répartition géographique	6
I.5.1 Dans le monde.....	6
I.5.2 En Algérie	7
I.3 Les feuilles d'olivier	8
I.3.1 Composition des feuilles d'olivier	9
I.3.2 Domaines d'utilisations des feuilles d'olivier	12
I.3.2.1 Domaine de l'alimentation animale.....	12
I.3.2.2 Domaine thérapeutique	12
I.3.2.3. Domaine pharmaceutique.....	12
I.3.2.4 Domaine cosmétologique	13
I.3.2.5 Industries Alimentaires	13
I.4 Composés phénoliques.....	13
I.4.1. Définition.....	13
I.4.2. Classification	14
I.4.2.1 Les acides phénoliques.....	15
I.4.2.1.1 Les acides hydroxybenzoïques	15
I.4.2.1.2 Les acides hydroxycinnamiques	15
I.4.2.2 Les Flavonoïdes	16
I.4.2.2.1 Les flavanones.....	16
I.4.2.2.2 Les flavonols	17
I.4.2.2.3 Les flavan-3ols.....	17
I.4.2.2.4 Les isoflavones.....	18
I.4.2.2.5 Les flavones	18
I.4.2.2.6 Les anthocyanidines	19
I.4.2. 3 Les coumarines	19
I.4.2.3.1 Propriétés biologiques des coumarines.....	20

I.4.2.4 Stilbènes.....	20
I.4.2.5 Les Tanins.....	20
I.4.2.5.1 Tanins condensés	21
I.4.2.5.2 Tanins hydrolysables.....	21
I.4.2.5.3 Propriétés biologiques des tanins	22
I.4.2.6 Les lignanes	22
I.4.3. Biosynthèse des composés phénoliques	22
I .4.4 Activités biologiques.....	23
I.4.4.1Activité anti-oxydante	23
I.4.4.1.1 Mécanisme d'action des antioxydants.....	23
I.4.4.2 Activité antimicrobienne	23
I.4.4.2.1 Mécanisme d'action	24
I .4.4.3 Activité antiallergique	24
I.4.4.4 Activité anti-inflammatoire	24
I.4.4.5 Activités antivirale	25
I.4.4.6 Activité anti-tumorale	25
I.4.4.7 Effets cardiovasculaires	25
I.4.5 Action antinutritionnel des polyphénols.....	25
I.5 Méthodes d'extraction et de quantification des composés phénoliques.....	26
I.5.1Méthodes d'extraction.....	26
I.5.1.1 Extraction ultrasonique	26
I.5.1.2 Extraction assistée par micro-ondes	27
I.5.1.3 Extraction par agitation	27
I.5.1.5 Extraction par Macération.....	28
I.5.1.7 Extraction par Décoction.....	29
I.5.1.8 Extraction par Infusion.....	29
1. 9 Extraction par évaporation	29
I.5.2 Méthodes de quantification	30
I.5.2.1 Chromatographie en phase liquide à haute performance	30
I.5.2.1.1 Théorie	30
I.5.2.1.2 Application.....	30
I.5.2.2 Spectroscopie ultraviolette	30
I.5.2.2.1 Théorie	30
I.5.2.2.2Application.....	31

I.5.2.3 Spectrométrie infrarouge	31
I.5.2.3.1 Théorie	31
I.5.2.3.2 Applications	31
I.6 Plan d'expérience méthodologie et application	32
I.6.1 Méthodologie des plans d'expérience	32
I.6.2 Analyses statistiques	32
I.6.3 Optimisation.....	34
I.6.4 Intérêt des plans d'expériences.....	34
Chapitre II. Matériels et méthodes	34
II.1. Objectif	34
II.2. Matériels végétal.....	34
II.2.1. Origine de l'échantillon	34
II.2.2. Préparation du matériel végétal.....	34
II.2.2.1. Nettoyage et séchage	34
II.2.2.2. Broyage.....	35
II.2.2.3. Tamisage.....	35
II.3. Produits chimiques	36
II.4. matériels et verrerie	36
II.5. Appareillage	37
II.6. Matériels biologique	37
II.6.1. Souches bactériennes	37
II.6.2. Souches fongiques	38
II.7. Application des plans d'expérience	39
II.8. Méthodes d'extraction	40
II.9. Analyse en infra-rouge.....	40
II.10. Dosage des composés phénoliques	41
II.10.1. Dosage des phénols solubles totaux	41
II.10.2. Dosage des flavonoïdes.....	42
II.10.3. Dosage des tannins condensés	42
II.11. Activités biologiques de l'extrait de feuilles d'olivier	43
II.11.1. Activité antioxydante	43
II.11.1.1.2. Activité antimicrobienne.....	44
II.11.2.1. Activité antibactérienne	45
II.11.3. Activité antifongique	46

Résultats et Discussion	47
III.1. Résultats de dosages de polyphénols totaux des extraits des feuilles de l'olivier	48
III.1.2 Modélisation par les plans d'expériences	48
III.1.2 Optimisation	49
III.2. Teneur en flavonoïdes	51
III.3. Dosage des tanins condensés	52
III.4. Activité antioxydante d'extraits de feuilles par le test de piégeage du radical DPPH	53
III.5 Spectrophotométrie à l'infrarouge	54
III.6 Evaluation de l'activité antibactérienne.....	56



Introduction



Introduction

La diversité végétale sert à l'humanité en tant que ressource naturelle renouvelable pour une variété de produits chimiques biologiquement actifs. Ces produits phytochimiques ont une variété de propriétés à savoir, antioxydante, antibactérienne, antifongique, antivirale, anticancéreuse, cardiotonique et autres. Ces constituants actifs des plantes médicinales et aromatiques sont moins toxiques et facilement biodégradables [1].

L'Algérie est un pays dont la flore condimentaire cultivée ou sauvage est très diversifiée et largement utilisée en alimentation et médecine traditionnelle. Depuis quelques années plusieurs groupes de recherche dans notre pays s'intéressent à la caractérisation chimique et les activités biologiques des produits naturels.

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.

Les feuilles d'olivier sont engendrées en grande quantité par l'industrie oléicole. Durant la Récolte, des feuilles pourront être cueillies avec les olives. Ces sous produits sont écartés des Olives dans les oliveraies mais aussi dans les huileries. Ils sont estimés à 10% de la masse Globale des olives récoltés [2].

Les feuilles d'olivier, biomasse produite en grande quantité dans les pays méditerranées, ne doivent pas être considérées comme un déchet encombrant, mais comme une richesse qu'on doit utiliser. La valorisation de ces résidus est devenue une nécessité pour améliorer la rentabilité du secteur oléicole [2].

Les feuilles d'olivier sont connues par leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine, due à leurs richesses en composés phénoliques, pouvoirs antioxydant, anticancéreux et antimicrobien qui les rendent très importants pour la santé et l'industrie agroalimentaire [2].

L'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale, est une étape très importante dans leurs identifications. En conséquence, les différentes méthodes d'extraction ont une influence sur les rendements d'extraction de composés phénoliques de source végétale.

Le premier aspect de ce travail consistera principalement de déterminer la meilleure méthode d'extraction (extraction assistée par ultrasons et extraction sous agitation) des feuilles d'olivier de la région de Sidi-Aich, wilaya de Bejaia par l'analyse quantitative du contenu en polyphénols totaux de ces extraits dont les résultats seront optimisés par les plans d'expériences. Le deuxième aspect du travail que nous exposerons repose sur la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, anti-oxydante et antifongique des meilleurs extraits obtenus.



Chapitre 1.

Synthèse Bibliographique



Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-Généralités

I.1. Intérêts des plantes

On estime environ, 20000 le nombre d'espèces de plantes utilisées dans le monde pour des fins alimentaires, cosmétiques, chimiques, thérapeutiques et agro- alimentaires.

Il est important de différencier l'usage des plantes spontanées et cultivées actuellement, car on observe une certaine confusion, on peut distinguer en particulier :

- Les plantes condimentaires (persil, cerfeuil, ciboulette, ail) ;
- Les plantes à boisson (fenouil, anis vert, camomille)
- Les plantes à parfum (lavande, jasmin, basilic, thym, romarin)
- Les épices
- Les plantes médicinales à grandes cultures (fenugrec)
- Les plantes à tisanes (menthe, mélisse).

Les plantes condimentaires et aromatiques sont les plus utilisées dans le monde pour aromatiser les plats et pour des fins thérapeutiques. Ces espèces contiennent diverses substances actives, à partir des quelles on extrait plusieurs essences utilisées non seulement en médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique ou en technologie alimentaire [3].

I.2. Olivier

L'olivier, arbre de la famille des oléacées, cultivé surtout dans le bassin méditerranéen depuis au moins 3500 ans avant notre ère pour produire de l'olive, qui donne une huile recherchée « l'huile d'olive ». Il était dans l'antiquité grecque et romaine, un emblème de fécondité et un symbole de paix et de gloire. Le nom scientifique de l'arbre "Olea" vient d'un mot qui

signifiait "huile" chez les grecques de l'antiquité. La culture de l'olivier prend son origine de la frontière Irano-Syrienne [4].

I.3. Systématique

L'espèce *Olea europaea* L. a été nommée par Linné en raison de son aire géographique. C'est l'unique espèce du bassin méditerranéen représentative du genre *Olea*. On distingue deux Sous-espèces, l'olivier cultivé ou olivier commun (*Olea europaea sativa.*) et l'olivier sauvage ou oléastre (*Olea europaea sylvestris*) [5].

La classification botanique de l'arbre de l'olivier [6].

*Règne: *Plantae*

*Sous-règne :*Tracheobionta*

*Division : *Magnoliophyta*

*Classe : *Magnoliopsida*

*Sous-classe : *Asteridae*

*Ordre : *Scrophulariales*

*Famille : *Oleaceae*

*Genre : *Olea*

*Espèce: *europaea*

*Sous-espèce:

- *Olea europaea* var *Europeae* olivier domestiq
- *Olea europaea* var *sylvestris* oléastre, ou olivier sauvage

I.4. Description botanique de l'olivier

L'olivier est un arbre polymorphe, de taille moyenne. Très rameux, au tronc noueux, au bois dur et dense, à l'écorce brune crevassée, il peut atteindre quinze à vingt mètres de hauteur, et vivre très longtemps. Il s'adapte aux conditions extrêmes de l'environnement, mais exige une intensité lumineuse importante et un sol aéré. L'olivier est un arbre vivace au feuilles persistantes, dur, gris-vert et ayant une forme allongée [7]. Les fleurs sont déposées en grappes sur une longue tige (l'olivier produit deux sortes de fleurs, une parfaite qui contient les deux sexes male et femelle et une staminée) [8]. Le tronc est gris-vert et lisse jusqu'à sa dixième année, il prend une couleur gris foncé. Le système racinaire s'adapte à la structure des sols, il reste à une profondeur de 500 à 700 cm et se localise principalement sous le tronc [9] (figure 1).



Figure 1 : olivier.

I.5. Répartition géographique

I.5.1 Dans le monde

La zone naturelle de répartition géographique de l'olivier dans le monde se situe principalement entre le 26e et le 45e degré de latitude nord et sud (Fig. 2), ce qui explique son introduction avec succès en Chine, au Japon, aux Etats Unis (Californie), et au Mexique pour l'hémisphère nord, en Australie, en Afrique du Sud et dans divers pays de l'Amérique du Sud pour l'hémisphère Sud.

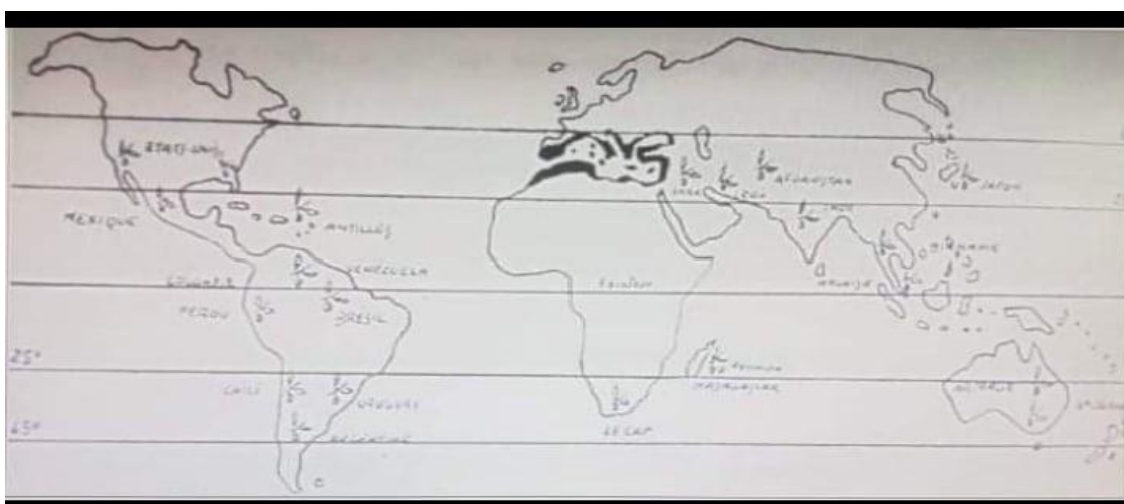


Fig. 2. Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde [10].

En Afrique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Tunisie, Maroc, Algérie, Libye, Egypte, Afrique du Sud et Angola. Les pays d'Europe qui cultivent l'olivier sont par ordre d'importance : L'Espagne, l'Italie, la Grèce, le Portugal, l'Albanie, Chypre, la France, la Slovénie et Malte. Au Moyen Orient et en Asie, les pays cultivateurs d'olivier sont par ordre d'importance Turquie, Syrie, Palestine, Liban, Israël, Jordanie, Irak, Iran et Chine. En Amérique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Argentine, Mexique, Chili, Pérou, Uruguay, Brésil et Etats Unis (Californie). L'Australie fait partie des nouveaux producteurs. Cependant, environ 97% des 850 millions d'oliviers, qui couvrent une superficie de 9500000hectares, dans le monde poussent en région méditerranéenne [11]. Le bassin méditerranéen en reste une zone privilégiée par rapport au reste du monde pour la culture de l'olivier grâce à son climat adéquat tant au niveau de la température mais aussi au niveau de l'hydrométrie (Fig. 3).



Fig. 3. Zones de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen.

I.5.2 En Algérie

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est plus favorable à la culture de l'olivier où il constitue une des principales essences fruitières à l'échelle nationale [12]. L'oléiculture algérienne est constituée d'environ 32 millions d'arbres répartie sur une superficie d'environ 328.884 hectares (FAO, 2013), soit 34,09% du verger arboricole national [13].

L'olivier, de par ses fonctions multiples de lutte contre l'érosion, de valorisation des terres agricoles et de fixation des populations dans les zones de montagne, s'étend sur tout le territoire national. il se concentre notamment dans trois principales régions : la région du Centre (54%), la région de l'Est (29%) et la région de l'Ouest (17 %). Pour la région centre, l'essentiel du verger oléicole de cette zone (95%) est occupé par les wilayas de Bejaïa, Tizi-Ouzou et Bouira (Figure 4).

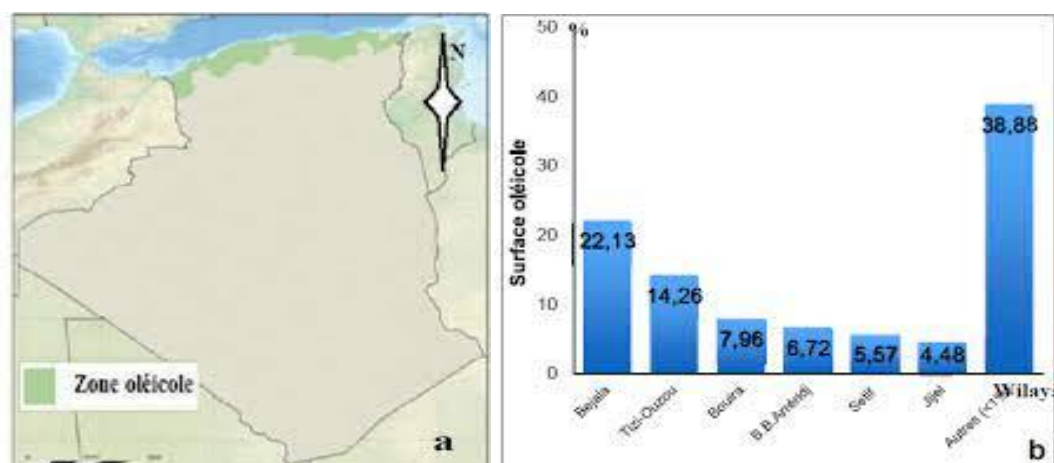


Fig04. Répartition de la zone oléicole en Algérie (**a**: la carte géographique, **b**: pourcentage de production) [14].

I.3 Les feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier sont opposées, ovales allongées, portées par un court pétiole, coriaces, entières, enroulées sur les bords, d'un vert foncé luisant sur la face supérieure, et d'un vert clair argenté avec une nervure médiane saillante sur la face inférieure (figure5). Le feuillage est persistant, donc toujours vert, mais cela ne veut pas dire que ses feuilles sont immortelles. Elles vivent en moyenne trois ans puis jaunissent et tombent, principalement en été. En cas de sécheresse, les feuilles sont capables de perdre jusqu'à 60% de leur eau, de réduire fortement la photosynthèse et de fermer les stomates permettant les échanges gazeux pour réduire les pertes en eau par évapotranspiration, permettant ainsi la survie de l'arbre au détriment de la production fructi-florale[15].



Fig05. Feuilles d'olivier

I.3.1 Composition des feuilles d'olivier

Les feuilles fraîches d'olivier sont caractérisées par une matière sèche aux alentours de 50%. Le Tableau 01 montre sa composition chimique globale [16]. La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations [17]. Les feuilles sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tel que les tannins) et principalement par des polysaccharides (tel que cellulose, hémicelluloses). La teneur en protéine est faible dans les feuilles d'olivier. Le Tableau 02 présente sa composition en acides aminés, qui est particulièrement diversifié. La composition en minéraux des feuilles d'olivier est présentée dans le Tableau 03. Le minéraux le plus abondant dans les feuilles est le fer avec une concentration de 273 g/ Kg de matière sèche.

Tableau 01. Composition chimique global des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g) [18].

Composition(en %)	Erbay et Icier,	Martin-Garcia
Eau	49,8 a	41,4 a
Protéines	5,4 a	7,0 b
Lipides	6,5 a	3,2 b
Minéraux	3,6 a	16,2 b
Carbohydrates	27,5	Nd
Fibres brutes	7,0 a	Nd
Cellulose	Nd	Nd
Hémicellulose	Nd	Nd
Lignin	Nd	Nd
Polyphénolstotaux	Nd	2,5 b
Tannins solubles	Nd	Nd
Tannins condensés	Nd	0,8 b

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

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

nd : valeur non déterminée

Tableau 02. Composition en acides aminés des feuilles d'olivier fraîche (exprimé en g par Kg d'azote total) [19].

Acides aminés	Concentration
Acide aspartique	27,5
Acide glutamique	35,1
Serine	44,5
Glycine	79,6
Histidine	25,4
Arginine	162,0
Threonine	46,8
Alanine	73,8
Proline	84,2
Tyrosine	32,3
Valine	74,8
Méthionine	5,3
Cysteine	1,6
Isoleucine	58,8
Leucine	104
Phénylalanine	51,8
Lysine	91,1
Acides aminés essentiels	547
Acides aminés non essentiels	379
Acides aminés totaux (sans tryptophane)	926

Tableau 03. Composition en minéraux des feuilles d'olivier (exprimée en g par Kg de matière sèche) [20].

Minéraux	Concentration (g/Kg MS)
Calcium (Ca)	12,7
Phosphore (P)	2,1
Manganèse (Mg)	1,9
Potassium (K)	6,3
Fer (Fe)	273,0
Cuivre (Cu)	10,7
Zinc (Zn)	21,3
Magnésium (Mn)	50,0

I.3.2 Domaines d'utilisations des feuilles d'olivier

I.3.2.1 Domaine de l'alimentation animale

Les feuilles sont utilisées dans l'alimentation des moutons et chèvres. Elles sont également utilisées dans l'alimentation des dindes pour améliorer la qualité de leurs viandes [23].

I.3.2.2 Domaine thérapeutique

La consommation humaine d'infusion des feuilles d'olivier est bénéfique pour la santé. Les feuilles d'olivier ont un pouvoir anti-inflammatoire, antifongique et antimicrobien [24].

I.3.2.3. Domaine pharmaceutique

La valorisation concerne l'extraction des tocophérols et de l'oleuropéine, ainsi que la production de l'hydroxytyrosol. D'autres substances extraites des feuilles d'oliviers sont également aussi valorisées, tels que les flavonoïdes les stérols et les alcools gras [25].

I.3.2.4 Domaine cosmétologique

Les feuilles sont utilisées dans la formulation des produits cosmétiques, tel que les savons, les crème [26].

I.3.2.5 Industries Alimentaires

Les feuilles peuvent être utilisées comme ingrédients dans la formulation d'aliments pour les hyper-glycémiques, stabilisant de l'huile de tourne et de l'huile d'olive [27].

I.4 Composés phénoliques

I.4.1. Définition

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, et sont distribués dans tous les organes de la plante [28]. Ils sont caractérisés par la présence dans leur structure d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une fonction éther, ester, ou hétéroside [29]. (Figure.6).

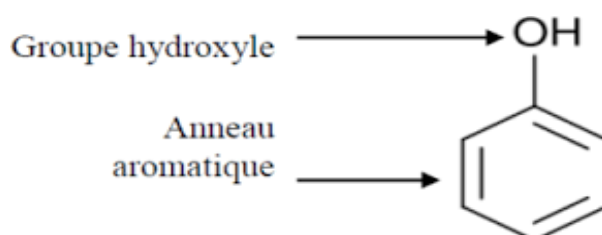


Fig.06 : Structure de base des polyphénols[30].

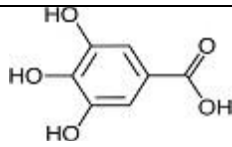
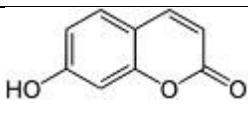
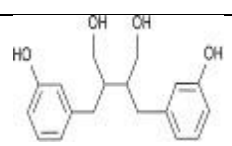
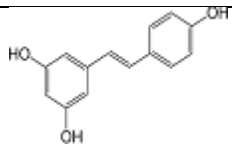
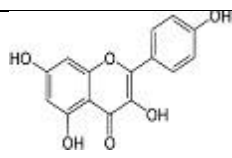
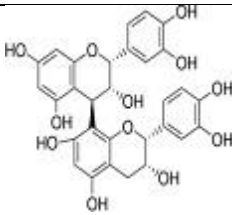
Les composés phénoliques diffèrent dans leur structure selon le nombre et la position des groupements hydroxyles méthyles du cycle aromatique [31].

Les composés phénoliques sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits [32].

I.4.2. Classification

La classification de ces substances a été proposée par [33]. On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base [34]. On distingue les acides phénoliques (phénols simples), les flavonoïdes, les stilbènes et les tanins [35]

Tableau 04: Structure des squelettes des poly-phénols [36].

Classification	Squelette	Structure
Acides phénolique	C6-C1	
Flavonoïdes	C6-C3-C6	
Lignanes	(C6-C2)2	
Stilbènes	C6-C2-C6	
Coumarines	C6-C3	
Tanins	(C6-C3-C6)n	

I.4.2.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont les dérivés hydroxylés des acides benzoïques et cinnamiques [37]. (figure.07)

I.4.2.1.1 Les acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque, et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les hydroxybenzoïques incluent plusieurs molécules et les plus fréquentes sont; L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoïques [38].

I.4.2.1.2 Les acides hydroxycinnamiques

Ils dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, induisent une réactivité chimique importante de ces molécules, par exemple on cite l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique, et l'acide sinapique [38].

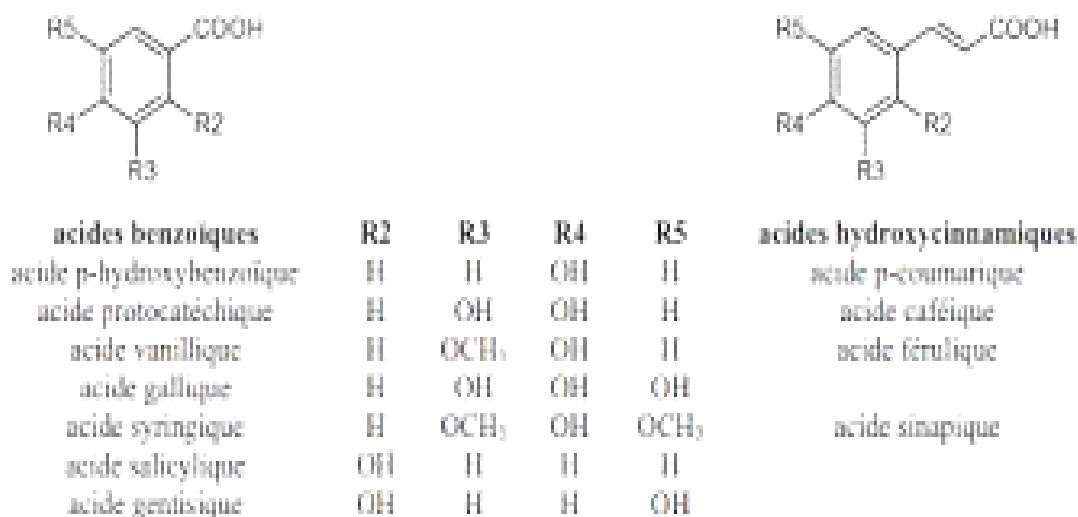


Fig.07 Structure des acides phénoliques [38].

I.4.2.2 Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 (Fig.08) [39]. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [40].

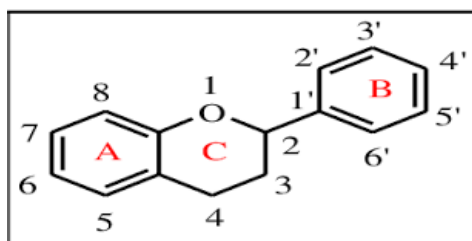


Fig08: Squelette de base des flavonoïdes [40].

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavanones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides [41].

I.4.2.2.1 Les flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2 [41]. Les agrumes constituent la principale source alimentaire de flavanones. Les principaux aglycones sont l'ériodictyol dans le citron, la naringénine dans le pamplemousse et l'hésperitine dans l'orange (Fig.09) : un jus d'orange contient entre 200 et 600 mg d'hésperitine/L [42].

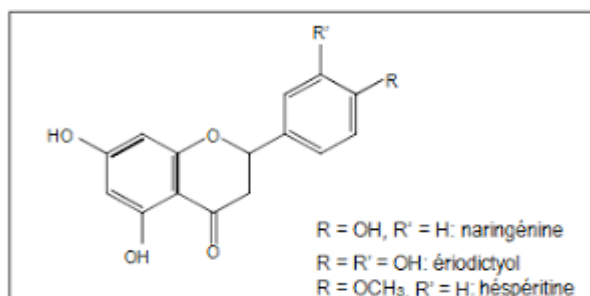


Fig09: Structure chimique des flavanones [40].

I.4.2.2.2 Les flavonols

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison en C2-C3 (Fig.09). Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses: D-glucose et Lrhamnose [40]. Leurs principaux représentants sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons (350-1200mg/kg de matière fraîche) le poireau, le chou et les baies telles que le cassis (115 mg/kg de matière fraîche) [43].

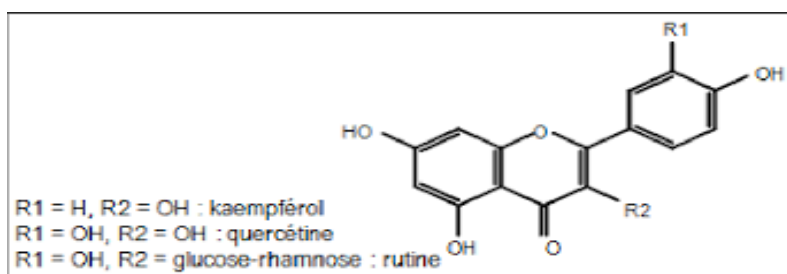


Fig10: Structures chimiques de flavonols [40].

I.4.2.2.3 Les flavan-3-ols

Les flavan-3-ols ou dérivés de catéchine sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composés vont des simples monomères, (+)-catéchine et son isomère (-)- épicatechine, jusqu'aux oligomères et polymères, les proanthocyanidines. De plus, les flavan-3-ols peuvent être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines (épicatechine gallate, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate) (Fig.10) [41].

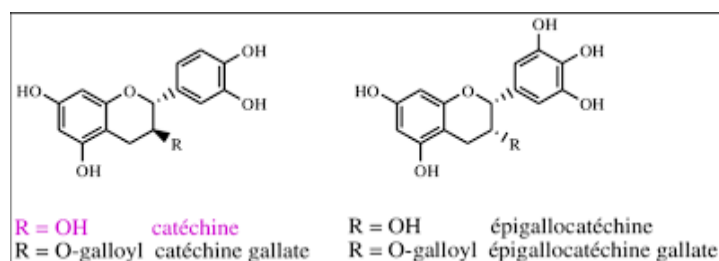


Fig11: Structures chimiques de certains flavan-3-ols [41].

I.4.2.2.4 Les isoflavones

Les isoflavones sont une sous-classe distinctive des flavonoïdes. Ils sont caractérisés par un motif 1,2-diphénylpropanique [44]. (figure11).

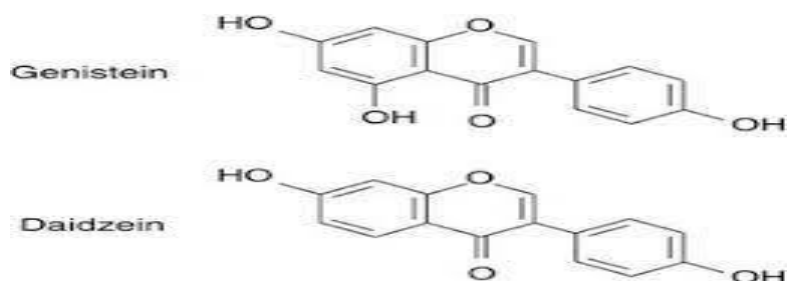


Fig.12 Structure des isoflavones [44].

I.4.2.2.5 Les flavones

Les flavones ont une double liaison entre le C2 et le C3, et sont les flavonoïdes moins communs. Ils sont structurellement très proche des flavonols, la différence provenant de l'hydroxyle en C3 [45]. figure12.

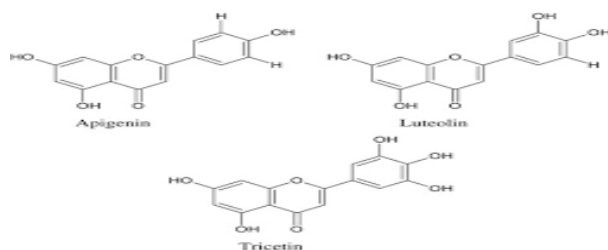


Fig.13 Structure des flavones [44]

I.4.2.2.6 Les anthocyanidines

Ce sont des pigments, principalement sous formes de glycosides stables et hydrosolubles, rouges en milieu acide, virant au bleu-violet en milieu neutre ou faiblement alcalin. Les composés les plus courants sont la pélagonidine, la cyanidine et la malvidine (Fig.13) [46].

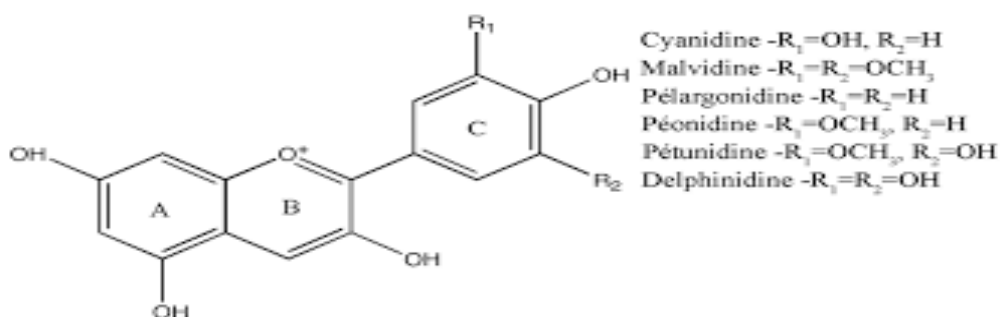


Fig14 : Structure chimique de quelques anthocyanidines courantes [47].

I.4.2. 3 Les coumarines

Les coumarines sont des solides cristallisés blancs ou jaunâtres. Ce sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Isolées la première fois de *Coumarouna odorata* par Vogel, aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les micro-organismes. Du point de vue structural, on les classe en coumarines simples avec des substituants sur le cycle du benzène, les furanocoumarines, les pyranocoumarines, ceux substitués en position 3 et ou 4 et le dernier groupe serait celui des dimères [48].

I.4.2.3.1 Propriétés biologiques des coumarines

Les coumarines augmentent la résistance et diminuent la perméabilité des veines et des capillaires (propriété vitamine P). Les coumarines complexes sont surtout responsables d'accidents photo-sensibilisants. Cela se présente parfois par une hyper-pigmentation de la peau [49].

I.4.2.4 Stilbènes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C6-C2-C6 (deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylique) [33] (figure14). Ce sont des phytoalexines produits par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales. Le Resveratrol est le stilbène le plus commun [44].

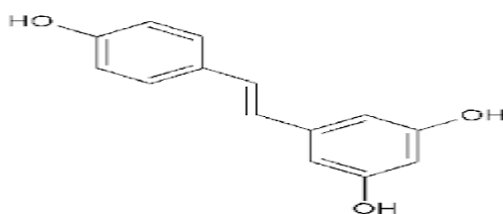


Fig.15 Structure des stilbènes [44]

I.4.2.5 Les Tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation [48].

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 daltons qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. Ils sont divisés en deux groupes de Tanins, hydrosoluble et condensée [49].

I.4.2.5.1 Tanins condensés

Appelés aussi polyphénols ou Pro-anthocyanidines, sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique [50]. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétrique C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées) (Figure 7) [51].

I.4.2.5.2 Tanins hydrolysables

Sont des esters de glucides ou d'acide phénol, ou de dérivés d'acides phénols. La molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales. Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central, le glucose et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbone à carbone entre noyaux (liaisons biphenyle réalisées par couplage oxydatif) conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins éllagiques (Fig.08) [51].

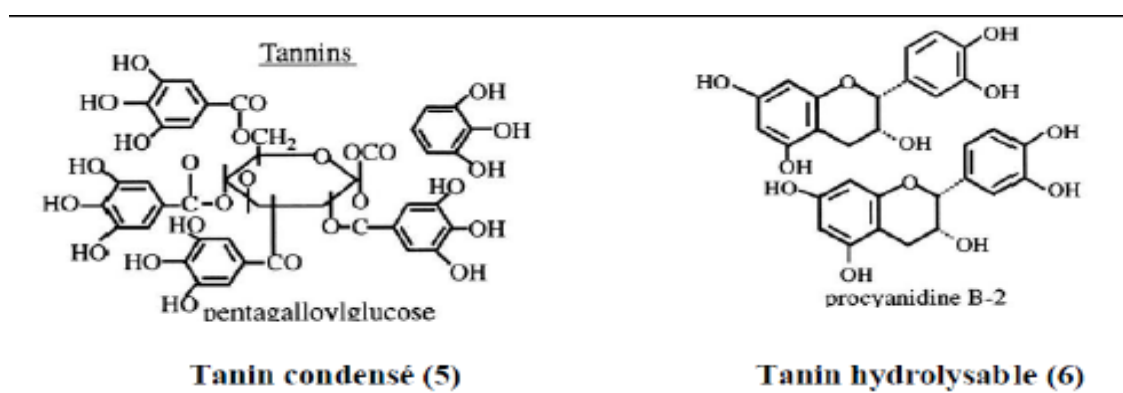


Fig. 16: Structure des deux types de tanins [52].

I.4.2.5.3 Propriétés biologiques des tanins

Ils découlent essentiellement de leurs propriétés à former des complexes avec les macromolécules. Les propriétés biologiques des tannins sont :

- Action astringente qui correspond à la précipitation des glycoprotéines. C'est la propriété la plus importante des tannins ;
- Action antidiarrhéique : Les tannins vont imperméabiliser les couches externes de la peau et les muqueuses et surtout la muqueuse intestinale d'où cette action ;
- Action antiseptique qui se traduit par des effets antibactériens et antifongiques ;
- Piégeurs de radicaux libres comme tous les polyphénols (propriétés antioxydantes) ;
- Pouvoir cicatrisant : ils favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ;
- Les Catéchols (catéchine et épicatechine) exercent une activité cardioprotectrice, anti-inflammatoire et anti-thrombotique et jouent un rôle dans la prophylaxie de certains cancers (peau et poumons) [49].

I.4.2.6 Les lignanes

Ils répondent à une représentation structurale de type $(C_6C_3)_2$; l'unité C_6C_3 est considérée comme un propylbenzène. Les plantes les élaborent par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique. Quand cette dimérisation implique une liaison oxydante par les C-8 des chaînes latérales propényles de deux unités d'alcool coniférique liées, formant la liaison C8 – C8', les métabolites résultants portent le nom de lignane. Le terme neolignane est employé pour définir tous les autres types de liaison. Lorsqu'il n'y a pas de liaison directe C–C entre les unités C_6C_3 mais liés par un atome d'oxygène d'éther, le composé est appelé oxynéolignane. Il existe d'autres types de lignanes tels que les esquinéolignanes (ayant trois unités de C_6C_3) et les dinéolignanes (contenant quatre unités de C_6C_3) [48].

I.4.3. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétique

- La voie de shikiamat : cette voie conduit après transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples [53] ;

- la voie d'acétate : qui conduit à des poly *B*-coesters (Poly acétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones [54].

I.4.4 Activités biologiques

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical et biotechnologique où on leur reconnaît des activités antivirales, antidiabétiques, anti-inflammatoires, antiallergiques, anti-oxydantes et antimicrobiennes.

I.4.4.1 Activité anti-oxydante

Des essais ont permis d'observer que l'oleuropéine des feuilles d'olivier a des propriétés anti-oxydantes [55]. L'oleuropéine et ses dérivés l'hydroxytyrosol et le tyrosol ont montré un pouvoir anti radicalaire important. Ils sont capables de piéger les ERO et les espèces réactives de l'azote ce qui permet la protection d'ADN contre les lésions. Les flavonoïdes exercent aussi leur activité anti-oxydante via leur groupe hydroxyle. Cette action est également due à la présence de triterpènes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices [56].

I.4.4.1.1 Mécanisme d'action des antioxydants

En règle générale, les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ERO ou l'effet scavenger.
- La protection des systèmes de défense antioxydants (en majorité des systèmes enzymatiques).
- l'inhibition ou l'activation d'enzymes impliquées dans la protection des ERO [56].

I.4.4.2 Activité antimicrobienne

Les effets antimicrobiens des phénols issus de l'olive, l'huile d'olive et les feuilles de l'olivier ont été le sujet de différentes recherches qui confirment l'effet antimicrobien des polyphénols. Il a été établi que les sécoiridoïdes (oleuropéine et ses dérivés), une des classes principales de

polyphénols contenues dans l'olive, l'huile d'olive et feuilles d'olivier, empêche ou retarde le taux de croissance d'une gamme de bactéries et de microchampignons. L'*Olea europaea* peut être considéré comme une source potentielle d'agents antimicrobiens prometteurs pour le traitement des infections des systèmes gastro intestinal ou respiratoire de l'homme. La feuille d'olivier elle même est un fongicide et contient un antibactérien l'oleuropéine, qui protège l'arbre des champignons et moisissures [57].

I.4.4.2.1 Mécanisme d'action

Les composés phénoliques sont reconnus d'être synthétisés par les plantes en réponse à l'infection microbienne. En effet, ils sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, possédants des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes. L'intensité et le spectre d'activité antimicrobienne varient selon la bactérie et le type d'extrait et le type de bactéries [56]. L'action antibactérienne des phénols est liée à leurs capacités à dénaturer les protéines et sont généralement classés comme agents agissant en surface. Leur action conduirait à la fuite des constituants cellulaires des bactéries tels que les protéines, le potassium et le phosphate. Ces effets pourraient être dus à la destruction du peptidoglycane ou aux dommages de la membrane cellulaire. L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonoles est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer entre les phospholipides membranaires et d'exercer leurs effets antibactériennes à l'intérieur de la cellule.

I.4.4.3 Activité antiallergique

Ces effets sont attribués à l'influence des polyphénols sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles [58].

I.4.4.4 Activité anti-inflammatoire

Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la

lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase [59].

I.4.4.5 Activités antivirale

Plusieurs études ont permis de valider l'usage traditionnel de l'olivier en temps qu'anti infectieux. Des chercheurs ont démontré l'action inhibitrice d'extraits de feuilles d'Olivier sur de nombreux virus, en particulier virus grippe, herpès, virus pseudorabies et autre études in vitro ont montré que l'oleuropéine inhibait l'activité du virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV), un rhabdovirus des almonidés [56].

I.4.4.6 Activité anti-tumorale

La plupart des flavonoïdes sont antimutagènes ; à l'exception de quelques flavonols qui sont sur les mêmes modèles mutagènes et un petit nombre d'entre eux sont anti-cancérogènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales. Les effets anti-carcinogènes de la quercétine et d'autres flavonoïdes deviennent de plus en plus évidents [60]. Tieppo a démontré que la quercétine n'était pas génotoxique et en revanche, elle a augmenté la stabilité génomique chez les rats ayant une cirrhose biliaire induite par la ligature cholagogue. En plus de l'activité antioxydante, Li a observé une activité anticancéreuse, pour l'épicatéchine, procyanidine B2, procyanidine B4 de la fraction d'acétate d'éthyle des extraits du litchi.

I.4.4.7 Effets cardiovasculaires

Récemment, beaucoup d'études se sont concentrées sur les effets cardiovasculaires des flavonoïdes. Les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes. Parmi les 17 flavonoïdes examinés par Xu. Les agents de relaxation vasculaires les plus efficaces sont l'apigénine, lutéoline, kaempferol et lagénisteine [61]. Cette relaxation est attribuée à l'action directe des flavonoïdes sur le muscle lisse vasculaire [62].

I.4.5 Action antinutritionnel des polyphénols

La caractéristique fondamentale des tannins est leur capacité à précipiter les protéines. Les tannins réduisent la digestibilité d'azote en se liant à la protéine diététique et aux enzymes digestives dans l'intestin [63]. Ils présentent plusieurs sites réactifs à partir desquels différents

types de liaisons peuvent être engendrés. A titre d'exemple, des liaisons hydrogènes peuvent se former entre les fonctions hydroxyles des groupements phénol des tanins et les groupements amines peptidiques [64]. Toutes ces liaisons sont réversibles. Seule l'oxydation des groupements phénol ou la présence groupements aldéhyde sur le corps du tanin (comme le sucre des tanins hydrolysables) peuvent engendrer des liaisons covalentes, c'est-à-dire une situation irréversible

Les interactions non-covalentes et covalentes entre les composés phénoliques et les protéines dépendent non seulement du rapport de composé phénolique/protéine, mais également des facteurs tels que la polarité de la protéine et du composé phénolique impliqué. Par conséquent, la nature et l'ordre des résidus d'acides aminés dans la chaîne de protéine sont d'importance particulière [65].

I.5 Méthodes d'extraction et de quantification des composés phénoliques

I.5.1 Méthodes d'extraction

L'extraction des CP est une procédure assez difficile en raison de leur grande diversité structurale, ainsi que leur sensibilité aux modifications chimiques, sous l'effet de la température, l'air et la lumière, et aux modifications enzymatiques. Il n'existe aucune méthode permettant d'extraire de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des CP ou une classe bien spécifique [66].

A l'heure actuelle, nombre de méthodes alternatives éliminant ou réduisant significativement leur utilisation et qui introduisent une certaine forme d'énergie additionnelle au processus afin de faciliter le transfert des analytes à partir de l'échantillon vers le solvant, sont mises en œuvre [67].

I.5.1.1 Extraction ultrasonique

Les méthodes d'extractions ultrasoniques assistées ont été employées pour un grand nombre de matière végétale [68]. Elle tire ses avantages de la haute température (qui augmente la solubilité et la diffusion) et de pression (qui favorise le transport et la pénétration) appliquées à l'interface entre la solution de solvant qui est soumise à l'énergie ultrasonique et une matrice solide. Combinée avec l'énergie oxydative des radicaux créés durant la sonolyse, la méthode donne puissant pouvoir d'extraction.

- L'extraction par ultrason est une alternative peu coûteuse, simple et efficace aux techniques conventionnelles d'extraction. Les principaux avantages de l'utilisation des ultrasons dans l'extraction de solide-liquide incluent : L'augmentation de la cinétique et du rendement d'extraction ;
- Réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles ;
- Faible coût de l'appareillage et facilité de l'opération par comparaison à d'autres nouvelles techniques d'extraction telles que l'extraction assistée par micro-ondes ;
- Possibilité d'utilisation de n'importe quel solvant ce qui permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels.

I.5.1.2 Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (MAE) consiste à appliquer les micro-ondes aux solides traités (secs ou humides) et le solvant d'extraction, transparent totalement ou partiellement. Il est possible d'atteindre en moins d'une minute des rendements d'extraction habituellement atteints après plusieurs heures d'extraction. Elle consiste à chauffer le solvant, ayant une bonne polarité, en contact avec l'échantillon au moyen de l'énergie des micro-ondes. Ce qui augmenterait la pénétration du solvant dans la matrice, permettant la dissolution des composés à extraire [71].

L'EAM a été considérée en tant qu'alternative à l'extraction solide-liquide traditionnelle des métabolites pour plusieurs raisons :

- La réduction du temps d'extraction ;
- La réduction de la quantité de solvant utilisée ;
- L'amélioration du rendement d'extraction ;

Par comparaison avec d'autres techniques modernes d'extraction telles que l'extraction par fluide supercritique, l'EAM présente les avantages de la simplicité d'utilisation et du faible coût.

I.5.1.3 Extraction par agitation

L'agitation magnétique est de loin la plus pratique et la plus simple à mettre en œuvre. On place un barreau magnétique recouvert d'un revêtement inerte (le plus souvent TEFLON,

quelque fois du verre) dans le mélange à agiter, suivant les récipients, il existe différentes formes de barreau : des barreaux simples pour les récipients à fond plat, en forme d'olive pour les ballons et en forme de croix pour les tubes à essai. Le barreau magnétique présent dans le milieu est entraîné par un aimant tournant situé sous le récipient [70].

I.5.1.4 Extraction par centrifugation

La centrifugation est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange en fonction de leur densité en les soumettant à une force centrifuge. Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide.

Le champ d'accélération terrestre ($g = 9.8 \text{ ms.}^{-2}$) ne permet que la sédimentation de grosses particules (c'est ce qu'on appelle la décantation). Pour les plus petits éléments, la diffusion s'oppose à la sédimentation. Il faut donc faire appel à des accélérations importantes → on utilise des centrifugeuses ou des ultracentrifugeuses [69].

I.5.1.5 Extraction par Macération

La macération est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans un solvant pendant une période donnée, pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes). Une quantité de poudre fine est macérée dans une quantité suffisante du solvant, ce dernier doit couvrir la poudre. L'opération de macération doit être répétée trois fois avec renouvellement à chaque fois du solvant pour extraire le maximum du produit bioactif, l'extrait obtenu est filtré par papier Whatman [70].

I.5.1.6 Extraction par Soxhlet

Soxhlet est l'une des techniques classiques permettant l'extraction des principes actifs à partir des matrices végétales. L'extraction par Soxhlet est une technique généralement bien établie, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles. L'extraction par Soxhlet dépend fortement des caractéristiques de la matrice solide et de la dimension des particules vu que la diffusion interne est souvent l'étape limitant pendant l'extraction [72].

Les avantages de l'extraction par Soxhlet incluent :

- Le déplacement de l'équilibre de transfert en mettant à plusieurs reprises le solvant frais en contact avec la matrice solide ;
- Le maintien d'une température relativement élevée d'extraction avec la chaleur du ballon à distiller ;
- Aucune nécessité de filtration après l'extraction. En outre, la méthode de Soxhlet est très simple et bon marché.

Cependant, cette méthode présente des inconvénients :

- Le temps d'extraction est long,
- Une grande quantité de solvant est nécessaire,
- Il est impossible d'accélérer le processus par agitation,
- La grande quantité de solvant utilisée exige une étape d'évaporation / concentration
- La possibilité de dégradation thermique des composés cible ne peut pas être ignorée vu que l'extraction s'opère habituellement au point d'ébullition du solvant pendant un temps assez long.

La grande quantité de solvant ainsi que la longue durée de l'opération ont conduit à de larges critiques de cette méthode.

I.5.1.7 Extraction par Décoction

La décoction est une opération dans laquelle le solide est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable [71].

I.5.1.8 Extraction par Infusion

L'infusion est une décoction durant laquelle le solvant est chauffé sans être mis en ébullition, suivie du refroidissement du mélange. La préparation du thé est l'exemple type de cette opération qui permet d'extraire les principes actifs des plantes ainsi que leurs arômes [72].

1. 9 Extraction par évaporation

Après filtration, le solvant d'extraction est éliminé par l'évaporation sous pression réduite dans un rota-vapeur (température d'évaporation de l'éthanol). Les résidus obtenus représentent l'extrait brut qui doit être conservé à 4°C jusqu'à son utilisation [73].

I.5.2 Méthodes de quantification

I.5.2.1 Chromatographie en phase liquide à haute performance

I.5.2.1.1 Théorie

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est la plus puissante de toutes les techniques chromatographiques. C'est une technique qui découle de l'application à la chromatographie liquide (LC) des théories et de l'instrumentation développées à l'origine pour la chromatographie en phase gazeuse (GC). La chromatographie en phase liquide à haute performance base sa technique sur la pression de la phase mobile (l'éluant). Elle se différencie de la chromatographie sur colonne du fait que l'élution se fait par une pompe qui confère une forte pression agissante sur la séparation des composés [74].

I.5.2.1.2 Application

La HPLC est une méthode qui a beaucoup d'application surtout au niveau de la chimie des substances naturelles. En effet, elle est utilisée dans la séparation ou l'identification de composés. Elle est souvent couplée avec la spectrométrie de masse ou la spectrométrie UV visible. La HPLC est également utilisée pour l'identification, la séparation et la quantification de certaines familles de molécules dans les extraits de plantes [75].

I.5.2.2 Spectroscopie ultraviolette

I.5.2.2.1 Théorie

La spectroscopie UV (ultraviolet) visible est une technique de caractérisation de molécules. En effet, elle est basée sur la capacité des composés à absorber un faisceau lumineux. A chaque fonction organique correspond une plage d'absorption de rayonnement lumineux dans le spectre UV-visible. L'intensité de l'absorption est aussi fonction de la nature de liaisons chimiques (liaison σ ou π ...) dans les molécules [76].

I.5.2.2 Application

La spectroscopie UV-visible permet également de déterminer la concentration d'une famille de molécules dans un extrait tel que le dosage des anthocyanes, polyphénol totaux, flavonoïdes totaux [77].

I.5.2.3 Spectrométrie infrarouge

I.5.2.3.1 Théorie

La spectroscopie infrarouge traite de l'enregistrement de l'absorption des rayonnements dans la région infrarouge du spectre électromagnétique. La position d'une absorption infrarouge donnée est exprimée en termes de longueur d'onde (en micron μ) ou plus communément en termes de nombre d'onde ν en cm^{-1} puisqu'il est directement proportionnel à l'énergie. La région infrarouge ordinaire 2,5 -15 μ ($4000\text{-}667\text{ cm}^{-1}$) est la plus pratique pour les organiciens. La région 0,8 -2,5 μ ($12500\text{ - }4000\text{ cm}^{-1}$) s'appelle proche infrarouge et la région 15-200 μ ($667\text{-}50\text{ cm}^{-1}$) s'appelle l'infrarouge lointain. L'absorption du rayonnement infrarouge par une molécule se produit en raison des changements d'énergie vibratoires et rotatifs quantifiés lorsqu'ils sont soumis à une irradiation infrarouge. Ainsi, les spectres IR sont souvent appelés spectres de rotation vibratoire. Les différentes bandes observées dans un spectre IR correspondent à divers groupes fonctionnels et des liaisons présentes dans la molécule. Ainsi, la spectroscopie infrarouge est largement utilisée pour la détection de groupes fonctionnels et l'identification de composés organiques[69].

I.5.2.3.2 Applications

La spectroscopie IR est une méthode utilisée pour la détermination de la structure des composés organiques. En effet, les vibrations moléculaires dépendent des distances interatomiques, des angles de liaison et des forces de liaison plutôt que des propriétés en vrac du composé. Ainsi, la spectroscopie infrarouge est utilisée en chimie organique pour la détection des groupes fonctionnels, la confirmation de l'identité des composés et le suivi des réactions.

I.6 Plan d'expérience méthodologie et application

I.6.1 Méthodologie des plans d'expérience

La méthodologie des plans d'expérience repose sur l'élaboration d'une série de tests expérimentaux, ayant pour but d'obtenir divers renseignements sur les effets des paramètres impliqués sur un critère d'optimisation. De manière classique, la méthodologie consiste à fixer tous les paramètres et à n'en faire varier qu'un, tout en observant une réponse investiguée (critère d'optimisation). Ceci peut représenter un nombre d'essais considérable augmentant de façon quasi-exponentielle avec le nombre de facteurs (variables impliquées dans le modèle étudié) et de niveaux (états distincts pouvant prendre chaque facteur) impliqués. Ainsi, pour trois facteurs testés à cinq niveaux différents, il serait nécessaire de réaliser $5^3 (= 125)$ expériences différentes de manière à étudier la totalité du domaine expérimental. Cette étude semble être inconcevable en laboratoire et encore moins au niveau industriel à cause de l'investissement matériel et financier qu'il implique. Les analyses multivariées trouvent ici tout leur intérêt ; elles vont permettre de réduire le nombre d'expériences nécessaires à l'étude de façon importante tout en offrant une complète exploration du domaine expérimental étudié sans pour autant nuire à la précision des résultats. De nombreuses informations utiles, comme l'influence des variables, les interactions entre les facteurs ou les paramètres optimums pourront ainsi être définis.

I.6.2 Analyses statistiques

Les diverses réponses, analyses de données et interprétations seront réalisées en utilisant un logiciel informatique de plans d'expériences statistiques Stratigraphiques Plus 2000 (Stratigraphiques, Manugistics, Rockville, USA). La méthodologie des surfaces de réponses va permettre de modéliser les réponses étudiées sous la forme d'une équation polynomiale du second degré présentée ci-après :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (1)$$

Où :

- Y représente la réponse ou critère d'optimisation étudié (rendement, acides gras...);

- β_0 représente la moyenne des réponses obtenues aux répliques du centre du domaine expérimental ;
- n représente le nombre de variables impliquées dans le modèle ;
- $\beta_{i,j}$ sont des constantes représentant les coefficients de régression du modèle mathématique adopté, ils ne sont pas connus et seront déterminés grâce à l'étude des résultats n expérimentaux ;
- X_i illustre les variables opératoires impliquées dans le modèle mathématique, X représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur afin de réaliser un essai ;
- ε représente l'erreur expérimentale.

Le logiciel statistique concédera la réalisation de différentes opérations fondées sur l'analyse de la variance permettant, in fine, de proposer un modèle polynomial comme présenté ci-dessus (01). Cette analyse de la variance concédera la détermination des divers coefficients de régression du modèle mathématique et permettra d'évaluer si une variable quantitative est significativement influente ou non. L'analyse de la variance consiste à tester une hypothèse nulle (les moyennes sont égales entre elles) contre l'hypothèse alternative (au moins une moyenne différente). Le principe est alors de comparer la variance de diverses répétitions d'un échantillon à la variance des moyennes entre tous les échantillons [78]. Le rapport entre ces deux variances est appelé ratio-F. cette valeur est comparée à une tables statistique permettant l'acceptation ou le rejet de l'hypothèse nulle de départ. Pour chacun des paramètres, la significativité des effets linéaires, quadratiques et des interactions intervenant entre les variables est ainsi testée puis représentée sur un diagramme de Pareto. Ces tests permettront de juger de la pertinence des variables et de modéliser au final la réponse étudiée, sous la forme d'un modèle polynomial du 2nd degré [84]. L'adéquation du modèle par rapport aux mesures expérimentales pourra être exprimée à l'aide d'un coefficient de détermination R^2 (le modèle sera d'autant plus adapté que la valeur de R^2 sera proche de 1). Enfin, le modèle mathématique pourra être représenté graphiquement à l'aide de surfaces de réponses permettant de visualiser l'évolution de la variable réponse étudiée, ainsi que les zones où elle est maximale, en fonction des effets des facteurs.

I.6.3 Optimisation

L'optimisation vise à modéliser, à analyser et à résoudre analytiquement ou numériquement les problèmes consistant à minimiser ou maximiser une fonction sur un ensemble [79]. Il existe de nombreuses méthodes d'optimisation de modèle dont la méthode de simplex et l'algorithme génétiques ont parmi les plus simples et les plus utilisées dans les modèles linéaires.

I.6.4 Intérêt des plans d'expériences

Il existe de nombreux plans d'expériences pouvant être adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. Leur utilisation vise les objectifs suivants :

- La détermination des facteurs clés dans la conception d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé ;
- L'optimisation des réglages d'un procédé de fabrication ou d'un appareil de mesure ;
- La prédiction par modélisation du comportement d'un procédé.

Les plans d'expériences s'inscrivent dans une démarche générale d'amélioration de la qualité. Le succès de la démarche originale des plans d'expériences réside dans la possibilité d'aboutir aux résultats escomptés et d'interpréter ces résultats avec un effort minimal sur le plan expérimental. La minimisation du nombre d'expériences à effectuer pour une étude donnée permet un gain en temps et en coût financier [80].



Chapitre II. Matériels et Méthodes



Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Objectif

L'objectif du présent travail se résume en premier lieu sur l'optimisation de l'extraction puis l'estimation quantitative et qualitative des différents composés phénoliques contenus dans des feuilles d'olivier.

II.2. Matériels végétal

II.2.1. Origine de l'échantillon

Notre étude a été réalisée sur les feuilles d'oliviers : *Olea europaea* var. *Europeaea* (l'olivier cultivé), récoltées durant le mois d'avril 2022 à partir de la région de SIDI AICH (BEJAIA).

II.2.2. Préparation du matériel végétal

II.2.2.1. Nettoyage et séchage

Après la récolte, les feuilles fraîches ont été transportées au laboratoire puis nettoyées à l'eau pour enlever la poussière puis étalées et séchées sur un filet à l'air libre (à l'abri du soleil) et à température ambiante dans un endroit sec, ventilé et ombragé. Ensuite, ces feuilles ont été séchées à 40°C dans une étuve pendant 48h.



Figure 17 : les feuilles d'oliviers avant et après séchage.

II.2.2.2. Broyage

Les échantillons séchés sont réduits en poudre grâce à un broyeur électrique.



Figure 18 : Photographie originale des feuilles d'olivier après broyage.

II.2.2.3. Tamisage

Les feuilles d'Olivier ont été tamisées à l'aide d'un tamis de diamètre inférieur à 0.5 μm de mailles. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des bocaux en verre fermés hermétiquement et placés à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

II.3. Produits chimiques

- L'eau distillée
- Ethanol
- Méthanol
- Folin-Ciocalteu
- Carbonate de sodium
- Acide chlorhydrique
- Bromure de potassium
- Nitrite de sodium
- Trichlorure d'aluminium
- Hydroxyde de sodium
- Vanilline
- Acide gallique
- quercitrine
- Catéchine
- DPPH

II.4. matériels et verrerie

- Tubes à essais
- Cristallisoirs
- Béchers
- Boite de pétri
- Eprovettes
- Fioles jaugées
- Entonnoirs
- Ecouvillon stérile
- Papier filtre

II.5. Appareillage

- Agitateur magnétique
- Autoclave
- Bain Mari
- Broyeur électrique
- rotavapeur
- Balance de précision
- Étuve
- Micropipette
- Réfrigérateur
- Bec benzène
- Ultra son
- Spectromètre UV
- Spectromètre IFTR

II.6. Matériels biologique

Pour étudier l'activité antimicrobienne de l'extrait des feuilles d'olivier, quatre souches bactérienne (dont trois à Gram positif et une à Gram négatif) : *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ; *Staphylococcus clinique* ; *Bacillus subtilis* ATCC14579; *Klebsiella Pneumoniae* 2042, et deux souches fongique : *Penicillium SP* et *Aspergillus niger* sont utilisées. Les souches sont fournies par le laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables de l'Université de Bejaia.

II.6.1. Souches bactériennes

- *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries de forme sphériques (coques) aéro-anaérobies facultatifs à Gram positif, résistantes dans le milieu extérieur et peu exigeantes en culture [81]. *Staphylococcus aureus* communément appelé staphylocoque doré est l'espèce la plus

pathogène du genre staphylococcus. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisés et dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles. L'homme est le principal réservoir, mais ces bactéries sont également retrouvées dans l'environnement (eau, air, surfaces et aliments) et chez l'animal notamment l'élevage [82].

- Klebsiella Pneumoniae

Le genre Klebsiella de la famille des entérobactéries comporte cinq espèces dont l'espèce type est Klebsiella Pneumoniae. Les klebsiella sont des Enterobacteriaceae, bacilles gram négatif, immobiles et capsulées. Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des animaux et de l'homme en tant que bactéries commensales. Elles sont abondantes dans le sol et les eaux [83].

-Bacillus Subtilis

Bacillus subtilis est une bactérie gram-positive, aéroanaérobie, catalase positive, sporulée et mésophile, retrouvée principalement dans le sol.Elle appartient à l'embranchement des Firmicutes, à la classe des Bacilli, à l'ordre desBacillales, à la famille des Bacillacées et au genre Bacillus. Elle est non pathogène et est unorganisme d'altération des produits alimentaires. Elle est capable de se développer dans de larges gammes de facteurs environnementaux, de sporuler et de former des biofilms[84].

II.6.2. Souches fongiques

- Aspergillus niger

Aspergillus niger, est un champignon filamenteux qui se développe sur la matière organique. Dans la nature, on le trouve dans le sol et la litière, dans le compost et sur le matériel végétal en décomposition. Aspergillus niger est capable de se développer sur une large gamme de températures allant de 6 à 47 ° C, avec une température optimale relativement élevée entre 35 et 37 ° C. Cette espèce se développe dans les céréales et les denrées alimentaires et elle est présente dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air [85].

- Penicillium Sp

Les *Penicillium* sont des champignons filamenteux, polyphages, ils peuvent être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les matières organiques en décomposition, le compost, les denrées alimentaires et les céréales. Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus* [86].

II.7. Application des plans d'expérience

L'optimisation et l'évaluation de la performance de l'enrichissement assisté par ultrasons et agitation ont été exécutées à l'aide d'une méthodologie expérimentale statistique. Après avoir achevé une étude préliminaire, deux variables ont été retenues comme pertinentes. Ces paramètres opératoires ont pu être étudiés à l'aide d'un plan composite centré et sont définis ci-après :

- Le temps requis pour effectuer l'étape d'extraction (d'enrichissement),
- La masse de la matière végétale (poudre des feuilles d'oliviers)

Les variables codées appliquées aux valeurs naturelles des trois variables du plan factoriel complet sont représentées sur le tableau 7. Ces paramètres ont été étudiés de manière à optimiser le taux des polyphénols totaux des feuilles d'oliviers.

Tableau 5 : Variables naturelles et codées appliquées aux facteurs investigués

Facteurs	Niveaux		
	-1	0	1
La masse (g)	5	12.5	20
Le temps (min)	40	50	60

	1	2	3		1	2	3
1	Exp No	masse	temps	1	Exp No	masse	temps
2	1	-1	-1	2	1	-1	-1
3	2	1	-1	3	2	1	-1
4	3	-1	1	4	3	-1	1
5	4	1	1	5	4	1	1
6	5	-1	0	6	5	-1	0
7	6	1	0	7	6	1	0
8	7	0	-1	8	7	0	-1
9	8	0	1	9	8	0	1
10	9	0	0	10	9	0	0
11	10	0	0	11	10	0	0
12	11	0	0	12	11	0	0

Figure 19 : Variables codés d'ESA et de l'EAU données par les plans d'expériences

II.8. Méthodes d'extraction

Des extractions par agitation et ultrason de 5, 12,5 et 20g de poudre des feuilles d'olivier dans 100ml d'éthanol, pendant 40, 50 et 60 min à température ambiante ont été réalisées.

II.9. Analyse en infra-rouge

- **Mode opératoire**

Cette analyse se déroule en deux étapes : la préparation de la pastille à analyser et l'analyse proprement dite.

20% de l'échantillon à analyser est pesée, puis la masse est complétée avec 80% du bromure de potassium (KBr). L'ensemble est mélangé puis broyé manuellement en une fine poudre qui est ensuite pressée à l'aide d'une presse manuelle jusqu'à 200 bars pendant 2 minutes. Une pastille est obtenue par cristallisation de la poudre. Cette pastille est introduite dans la chambre optique du spectroscope pour analyse. Une pastille neutre (ne contenant que du KBr) est utilisée pour la mise à niveau de l'appareil. Un ordinateur couplé à l'appareil permet de recueillir le spectre de l'échantillon.



Figure 20: Infra-rouge

II.10. Dosage des composés phénoliques

II.10.1. Dosage des phénols solubles totaux

Le réactif de Folin-Ciocalteu a été employé pour déterminer la teneur en phénols totaux des extraits d'échantillons selon la méthode rapportée par [87].

II.10.1.1 Principe

Le réactif de F-C se compose d'une solution acide jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) [88].

Ce réactif oxyde les phénolates, ayant pour résultat la production du complexe bleu de molybdène-tungstène. La coloration produite, absorbe fortement à une longueur d'onde de l'ordre de 760 nm. Elle est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [88].

II.10.1.2 Mode opératoire

Un volume de 200 μ l de l'extrait brut éthanolique est introduit dans des tubes à essai, le mélange (1ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5%) est additionné. Les tubes sont agités et conservés pendant 30 minutes à la température

ambiante. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV [89].

II.10.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode de dosage utilisée afin de déterminer la teneur flavonoidique des extraits de feuilles d'olivier est la méthode colorimétrique [90].

II.10.2.1 Principe

Le dosage des flavonoïdes repose sur la capacité de ces derniers à former des complexes jaunâtres flavonoïde-aluminium par chélation des métaux [91].

II.10.2.2 Mode opératoire

500 µl de l'extrait brut éthanolique des feuilles convenablement dilué sont mélangés avec 1500 µl d'eau distillée, suivis de 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5%. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10% (m/v) est rajouté au mélange. Après 6 min d'incubation à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est exprimée en microgramme (µg) équivalent de la catéchine par milligramme de l'extrait (µg EC/mg) [91].

II.10.3. Dosage des tannins condensés

II.10.3.1 Principe

Le réactif vanilline-HCl est spécifique pour les flavan-3-ols et les proanthocyanidines. La réaction est basée sur la condensation de l'aldéhyde phénolique (vanilline) avec la structure des flavan-3-ols et proanthocyanidines dans des conditions acides [92].

II.10.3.2 Mode opératoire

Un volume de 50 μl de l'extrait brut est ajouté à 1500 μl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 μl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6504 UV/VIS. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en microgramme (μg) équivalent de la catéchine par milligramme de l'extrait ($\mu\text{g EC/mg}$) [91].

II.11. Activités biologiques de l'extrait de feuilles d'olivier

II.11.1. Activité antioxydante

II.11.1.1 Principe

En présence des piègeurs 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 [93].

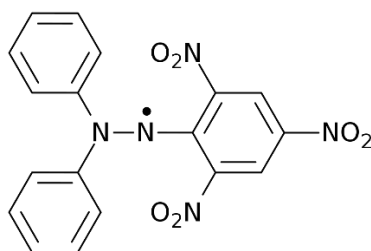


Figure 21: structure chimique du DPPH. (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl).

II.11.1.2 Méthode

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol (6×10^{-5} M). 25 μl des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 975 μl de solution méthanolique de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité

pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle contenant la solution de DPPH et d'éthanol est mesurée à 517 nm [93].

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.

Nous avons utilisé différentes concentrations (2, 4, 6, 8,10 mg/ml) des échantillons étudiés en même temps que le control acide ascorbique.

Le contrôle : est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant : 975 µl de solution méthanolique de DPPH + 25 µl d'éthanol, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min. Le blanc : pour réglage d'appareil est constitué par 1 ml d'éthanol [93].

II.11.11.2. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique des feuilles d'oliviers est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide. Cette méthode consiste à déposer à la surface d'un milieu géloséensemencé par les microorganismes à tester, des disques chargés de l'extrait, puis les boîtes sont portées à l'incubation [94]. Les souches microbiennes utilisées dans ce test sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Les souches microbiennes testées

Microorganismes	Souches testées
Bactéries	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus</i> - <i>baccillus subtilis</i> - <i>Klebsiella sp</i>
Champignons	<i>Pinicillium sp</i> <i>Aspergillus niger</i>

II.11.2.1. Activité antibactérienne

a) Préparation des suspensions bactériennes

À partir d'une culture bactérienne jeune de 24 heures, 3 à 5 colonies bien isolées ont été prélevées dans 10ml de bouillon nutritif pour préparer une suspension bactérienne de 108 UFC/ ml suivis d'une agitation à l'aide d'un vortex.

b) Ensemencement

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage. Le milieu de Mueller-Hinton est coulé dans des boîtes de pétri. Les boîtes sont refroidies et séchées à température ambiante puis sont ensemencées par des suspensions bactériennes à l'aide d'écouvillons stériles. L'écouvillon est imbibé de la suspension bactérienne puis essoré contre la paroi interne du tube à essai. L'ensemencement se fait par des stries serrées, de haut en bas et l'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. L'écouvillon est par la suite passé sur toute la périphérie de la gélose. Les disques préparés de papier wattman N°3 de 6 mm de diamètre stérilisés à 180°C pendant 30 minutes ont été déposés sur le milieu ensemencé à l'aide d'une pince stérile (3 disques dans chaque boîte). 20µl d'extrait éthanolique de feuilles d'olivier ont été injectés sur les disques déposés

et les disques témoins ont reçu 10µl de DMSO (fig. 23). Les boîtes sont ensuite mises dans le réfrigérateur à 4°C /2h puis incubées à 25°C pendant 24 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions autour des disques [95].

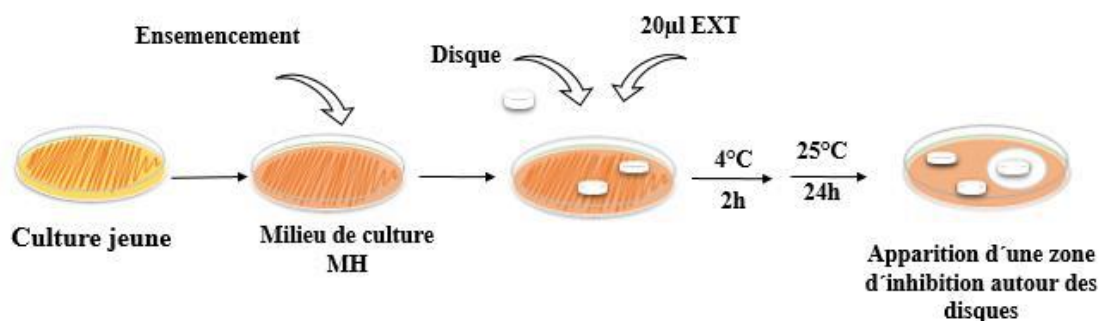


Figure 22 : Mise en évidence de l'effet antibactérien de l'extrait des feuilles d'olives

II.11.3. Activité antifongique

a) Préparation des cultures fongiques

Les cultures fongiques sont préparées par ensemencement d'une suspension sporale sur milieu PDA, puis incubée à 25 °C pendant 3 à 7 jours.

b) Ensemencement

Le milieu de culture utilisé est le milieu PDA additionné de 5 % de tween 80. Dans ce tests, l'inoculum est prélevé par un écouvillon à partir d'une boîte contenant l'espèce fongique à tester, puis le frotter à trois reprises sur toute la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60 ° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Une fois les boîtes sont ensemencées et les extraits sont déposés, les boîtes sont incubées à 25 °C pendant 48 h jusqu'à 72 h. Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés [95].



Chapitre III. Résultats et Discussion



CHAPITRE III.

RESULTATS et DISCUSSION

III.1. Résultats de dosages de polyphénols totaux des extraits des feuilles de l'olivier

L'expérimentation a mis en jeu trois facteurs : méthode d'extraction, la masse d'échantillon et le temps d'extraction.

Les analyses quantitatives des phénols totaux d'ESA et d'EAU par spectrophotomètre UV-visible ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard (figure 22). Les valeurs obtenues sont exprimées en μg EAG/mg ES.

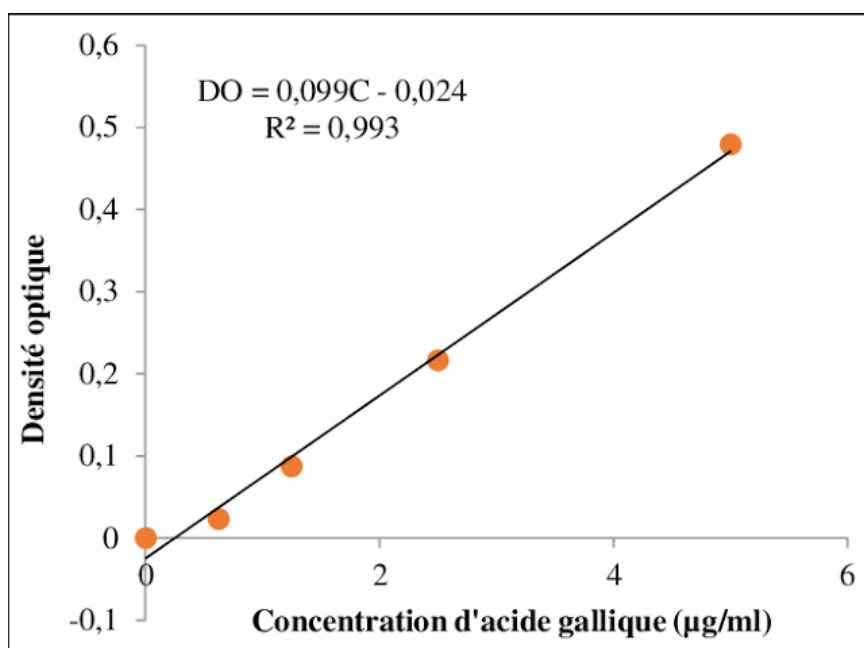


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

III.1.2 Modélisation par les plans d'expériences

La modélisation par les plans d'expériences a donné les équations qui décrivent au mieux les variations du rendement des deux techniques en fonction de temps d'extraction et la masse d'échantillon (tableau), les résultats obtenus sont représentés dans la figure 23.

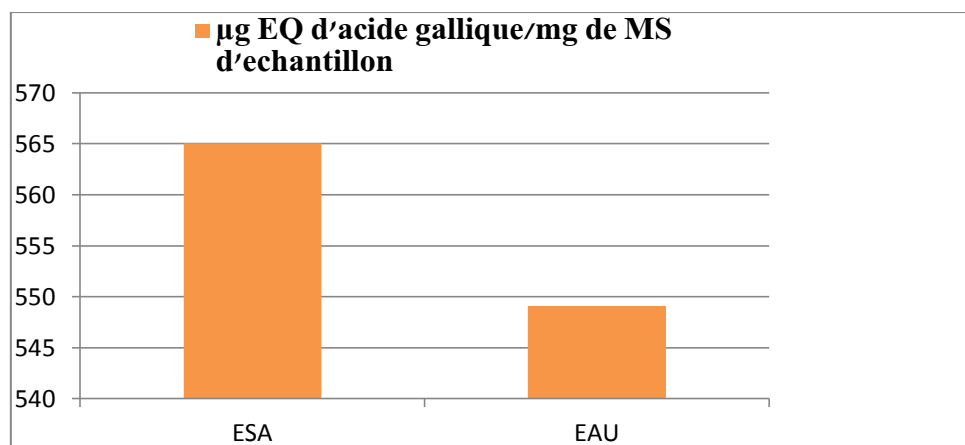


Figure 25 : la teneur maximale en polyphénols totaux d'ESA et d'EAU

III.2. Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430nm. La quantité des flavonoïdes a été rapportée en microgramme d'équivalent de la quercétine par milligramme de l'extrait (μg EQ/mg E) figure 27. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 28.

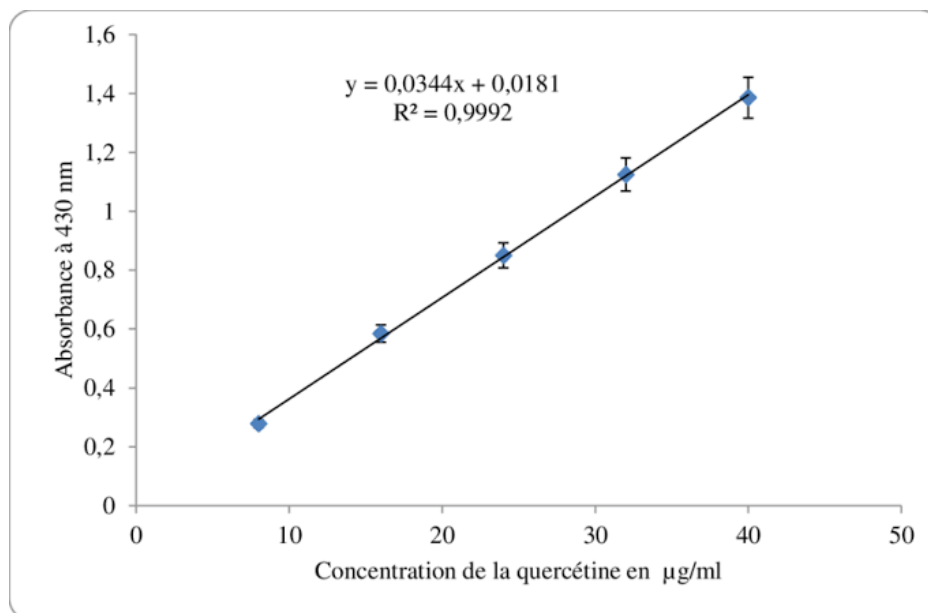


Figure 27: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Il ressort à travers les résultats obtenus, que la teneur la plus élevée en flavonoïdes est enregistrée pour l'EAU ($209.69 \mu g$ EQ/mg ES) par rapport à l'ESA ($135.32 \mu g$ EQ/mg ES).

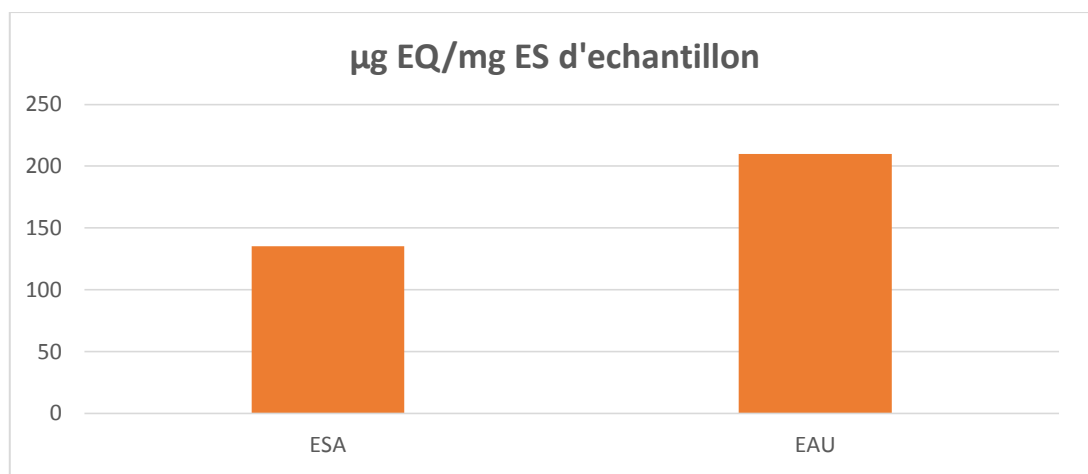


Figure 28 : teneur en flavonoïdes.

III.3. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé selon la méthode de vanilline, la catéchine a été utilisée comme étalon (Figure 29). L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 550 nm. La quantité des tanins condensés a été rapportée en microgramme d'équivalent de la catéchine par milligramme de l'extrait ($\mu\text{g ECT/mg ES}$). Les résultats obtenus sont représentés dans la (Figure 30).

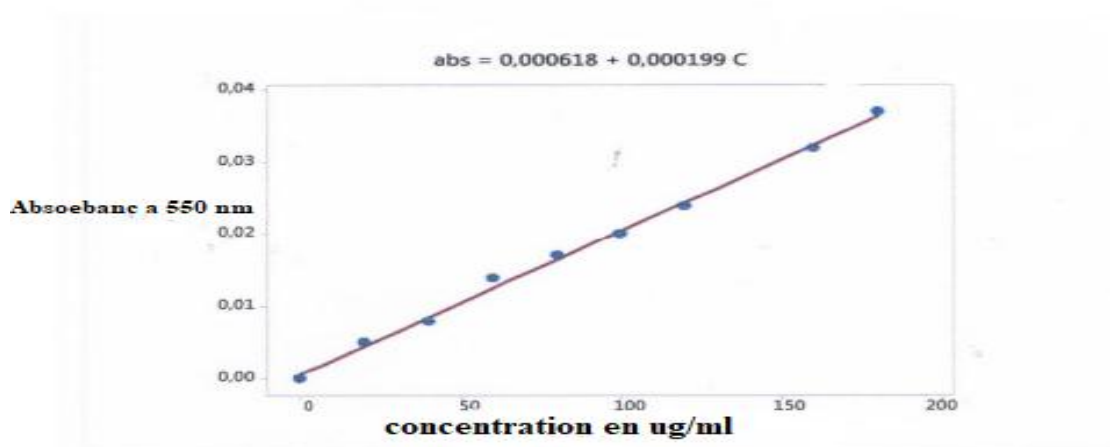


Figure 29: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

Le dosage quantitatif des tanins condensés sur les deux extraits (ESA et EAU) révèle que l'extrait préparé par l'agitation est plus riche par rapport à l'extrait ultrasonique (332,331 et 159,273 $\mu\text{g ECT/mg ES}$, respectivement).

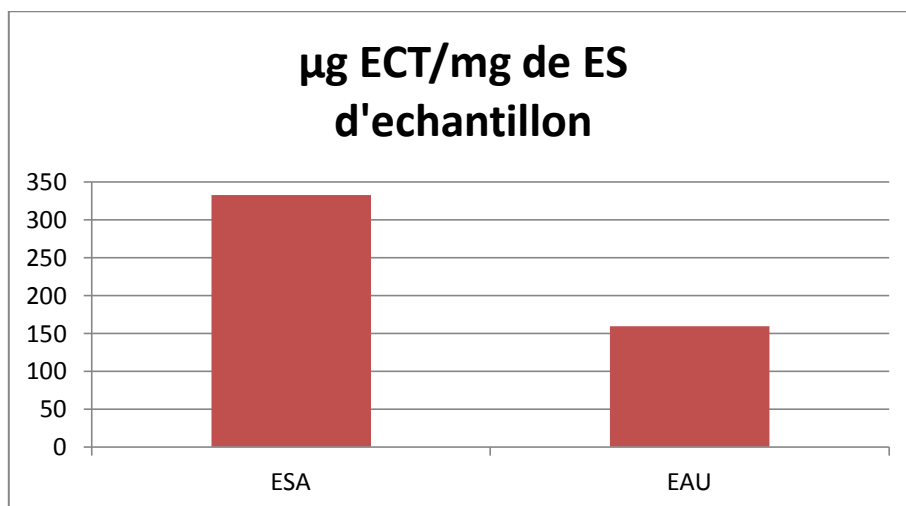


Figure 30: teneur en tanins condensés

III.4. Activité antioxydante d'extraits de feuilles par le test de piégeage du radical DPPH

La méthode de piégeage du radical libre (DPPH) a été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de feuilles d'olivier obtenus par l'agitation et l'ultrason, car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical. Les résultats obtenus sont illustrés dans (figure 31).

L'ESA se caractérise par une activité de piégeage du radical DPPH un peu plus forte par rapport à l'EAU 87,67% et 80,67% respectivement.

Le test au DPPH n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger ce radical et ainsi d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques et donc d'après le résultat obtenu on constate que l'ESA est le plus riche en polyphénols.

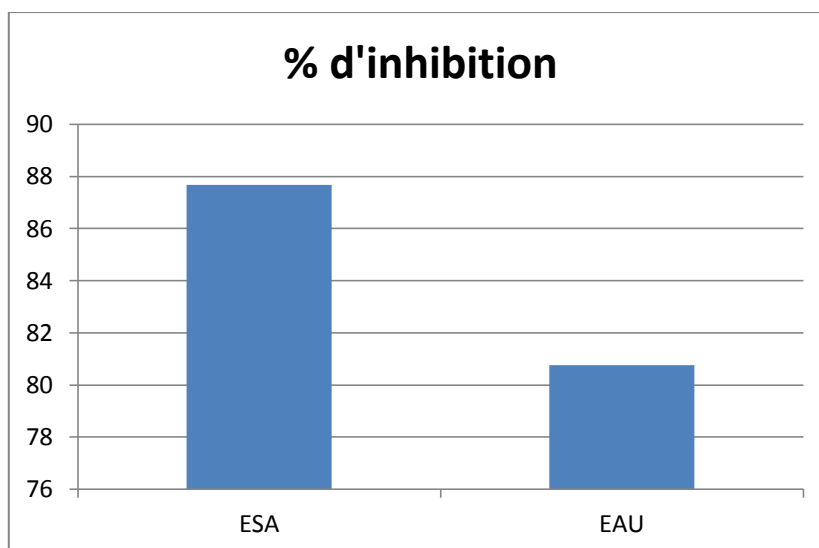


Figure 31:Activité anti-radicalaire du DPPH d’ESA.

D’une manière générale, la teneur en composés phénoliques des extraits varie non seulement d’une plante à une autre de la même famille (lié aux propriétés génétiques des plantes, à l’origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte), mais également en fonction des paramètres de l’extraction solide-liquide des polyphénols, le solvant d’extraction, et le coefficient de diffusion du solvant [97].

Boudhrioua a rapporté que les variations en teneur de polyphénols est dépendante des conditions climatiques et géographiques, des conditions de culture et le degré de maturité, mais aussi de l’état Physiologique et l’âge de la plante.

Altiok dans son étude a démontré que la solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, du poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique du squelette de base. Plusieurs facteurs influencent l’extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale tels que le type et le volume du solvant utilisé, la taille des particules de l’échantillon, le temps d’extraction, les conditions de stockage de l’échantillon, le pH et la température.

III.5 Spectrophotométrie à l’infrarouge

Les spectres infrarouges de la poudre et l’extrait des feuilles d’olivier obtenus par agitation et ultrason sont regroupés dans la **figure 26**.

Après adsorption, on remarque que la poudre et l'extrait des feuilles d'olivier ont une même structure. Par ailleurs on observe l'augmentation de l'intensité des différentes bandes d'absorptions d'extrait obtenu par agitation par rapport à celle de la poudre, et une diminution de l'intensité des bandes d'absorption de l'extrait ultrasonique par rapport à celle de la poudre.

La variation des bandes de chacun d'ESA, EAU et la poudre revient au fait que dans le cas des extraits il y a présence de solvant qui est l'éthanol dont les groupements de ce dernier apparaissent dans les bandes et participent dans l'augmentation de leurs intensités.

L'interprétation possible du spectre peut être faite comme suite :

- Une large bande d'absorption située aux alentours de 3600 cm^{-1} , elle est attribuée aux vibrations d'élongations des groupements OH d'alcool (phénol) ;
- Dans le domaine $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, deux pics sont observés à $2924,31\text{ cm}^{-1}$ et $2846,63\text{ cm}^{-1}$ résultant principalement des vibrations d'élongation de C-H des molécules aliphatiques ;
- Une bande située aux alentours de 1700 cm^{-1} qui est attribuée aux vibrations d'élongations des groupements C=O des acides carboxyliques et des cétones ;
- Dans le domaine $1625\text{-}1685\text{ cm}^{-1}$, on observe deux pics intenses à $1652,36\text{ cm}^{-1}$ et $1683,37$ correspondant aux vibrations d'élongation du groupe C=C alcènes ;
- On observe un pic à 1383 cm^{-1} caractéristique au mouvement d'élongation C-C d'un alcane ;
- Dans le domaine $1100\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, un pic intense est observé à $1160,44\text{ cm}^{-1}$ correspondent au mode de vibration d'élongation P=O des groupes d'hydrogène liés par les phosphates ou polyphosphates, de la vibration d'élongation O-C dans la liaison P-O-C et P=OOH correspondant aux groupements phosphates, groupements anhydride et carboxyliques ;
- Dans le domaine $560\text{-}830\text{ cm}^{-1}$, un pic est observé à $667,94\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux vibrations de déformation du C-H [98].

Ces résultats confirment la richesse des feuilles d'olivier polyphénols.

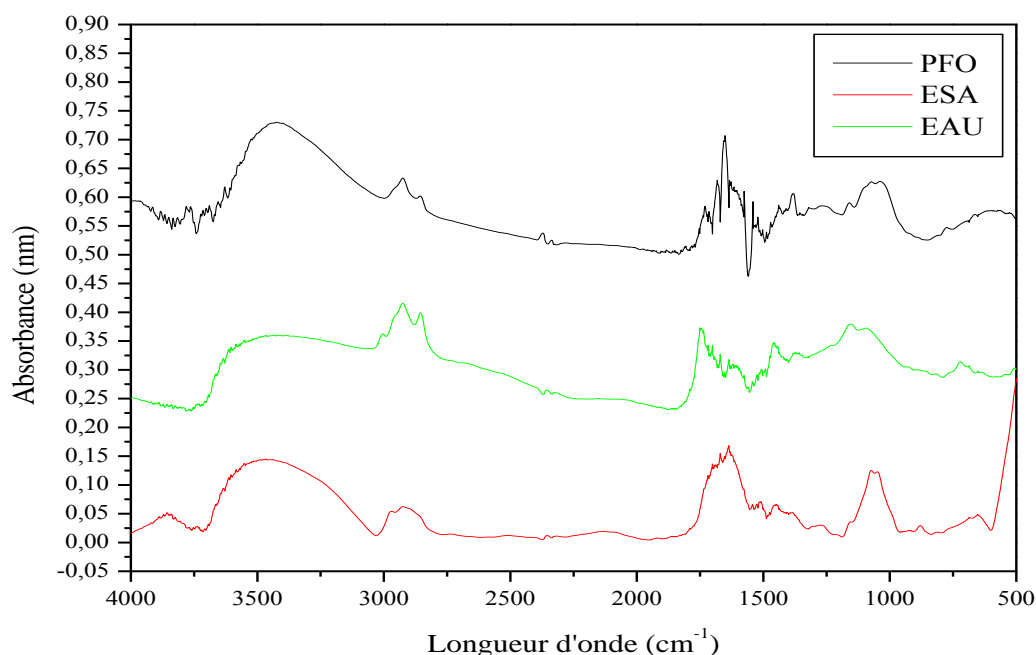


Figure 26 : Spectres IR-TF de la poudre et les extraits des feuilles d'olivier.

III.6 Evaluation de l'activité antibactérienne

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien de l'extrait des feuilles d'olivier obtenu par deux méthodes d'extraction (agitation (ESA) et ultrason (EAU)) par la méthode des disques sur un milieu gélosé solide (Mueller-Hinton). L'activité antibactérienne de l'extrait a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis de quatre (04) souches référencées dont trois (3) bactéries Gram + et une (1) bactérie Gram -.

Un test préliminaire a été réalisé afin de tester si le solvant de dilution (DMSO) ne représente aucune activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées.

Les résultats n'ont montré aucune zone d'inhibition autour des disques du solvant. A partir de là le DMSO a été choisi comme témoin négatif de l'activité antibactérienne testée, ainsi comme solvant pour la dissolution des extraits.

La mesure des halos d'inhibition (\emptyset) nous permet de classer les bactéries suivant leur degré de sensibilité aux extraits étudiés [56].

- $\emptyset \leq 8$ mm : bactérie non sensible ou résistante ;

- $9 \leq \emptyset \leq 14$ mm : bactérie sensible ;

- $15 \leq \emptyset \leq 19$ mm : bactérie très sensible;

- $\emptyset \geq 20$ mm : bactérie extrêmement sensible.

Les résultats sont représentés dans le tableau 7, les diamètres d'inhibition marqués par chaque extrait (ESA et EAU) à concentration de 0.2g/ml sont rapportés dans le tableau 8 et la figure 32.

Tableau 8 : Récapitulatif des résultats de l'antibiogramme.

Souches	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	ESA	EAU	DMSO	MH
	11	11	-	-
SA	14.33	13.33	-	-
SC	14.66	14.33	-	-
SB	10.33	10	-	-

(-) absence de l'activité antibactérienne

D'après les résultats obtenus, l'extrait de chaque méthode (ESA et EAU) exerce une activité anti bactérienne sur les bactéries testées.

Une activité est prononcée forte dans le cas de *S. aureus* et *Staphylococcus* vis -à-vis de l'extrait ESA avec un diamètre de 14,66 mm et 14,33 successivement.

Cette activité est dite modérée dans le cas de *S. aureus* vis -à-vis de l'extrait ultrasonique avec un diamètre de 13,33 mm et s'avère forte pour *Staphylococcus* vis-à-vis de même extrait avec un diamètre de 14,33 mm.

Une sensibilité est notée chez *klebseilla sp* avec une zone d'inhibition de 11 mm vis-à-vis des deux extraits étudiés.

Cette sensibilité est dite modérée dans le cas de *B. subtilis* vis-à-vis des extraits ESA et EAU avec un diamètre de 10,33 et 10 mm successivement.

Les taux de l'activité antibactérienne exercée par les extraits éthanoliques des feuilles d'olivier obtenus par les deux méthodes d'extraction, révèlent une différence significative ; toutefois l'extrait obtenu par l'agitation (ESA) possède une activité antibactérienne plus importante que l'extrait ultrasonique (EAU). Cette différence revient à la teneur des deux extraits en molécules bioactives.

Les polyphénols, tel que les tanins et les flavonoïdes, ont une activité antibactérienne importante [99]. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes est due à leur capacité de solubiliser les protéines et de former des complexes avec la paroi cellulaire pendant que les tanins peuvent être en rapport avec leur capacité de désactiver des adhésions microbiennes, enzymes et les protéines de la membrane cellulaire [100].

Les extraits d'*Olea europaea* (feuilles) manifestent une activité antibactérienne variable vis-à-vis des souches étudiés. Nos résultats s'accordent avec les données de nombreux auteurs qui ont révélés une activité contre des bactéries gram - et gram + [101].

La différence de sensibilité entre les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif est due à la différence de structure de la paroi bactérienne de ces deux groupes bactériens [102]. Les bactéries Gram (+) sont généralement plus sensible aux extraits que les bactéries Gram (-). Ceci pourrait être expliqué par la différence importante de la couche externe des Gram (+) qui influence sur la perméabilité de la paroi bactérienne. Cette dernière chez Gram (-) est généralement moins efficace que celle chez les Gram (+) ; ceci est due probablement à la présence d'un taux élevé de phospholipides dans la paroi des Gram (-) et de molécules polysaccharidiques dans la membrane externe ; imperméable aux molécules antibiotiques et composés lipophiles (dont les polyphénols font partie) et un espace périplasmique riche en enzymes qu'on ne retrouve pas chez les Gram (+) [103].

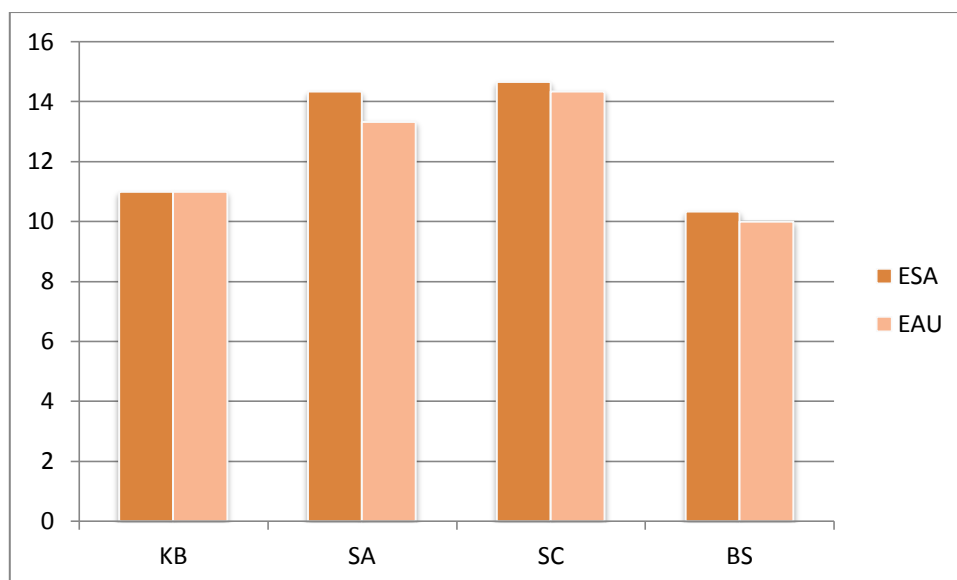

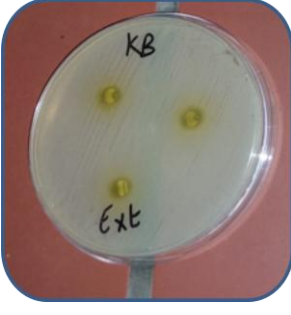





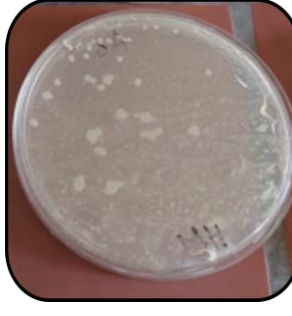



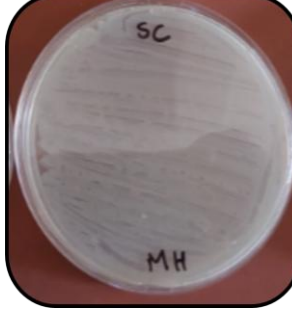

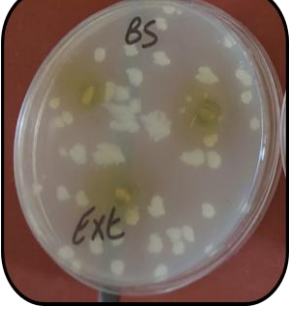




Figure 32: Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition exercés par les deux extraits (EAS et EAU).

Tableau 9 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition exercés par les deux extraits (EAS et EAU) sur les bactéries.

	ESA	EAU	DMSO	MH
K B				
SA				
SC				
BS				

III.6. Evaluation de l'activité antifongique

Nous avons étudié l'activité antifongique des deux extraits contre deux souches de champignons : *Prnicillium sp* et *Aspergillus niger*, les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :

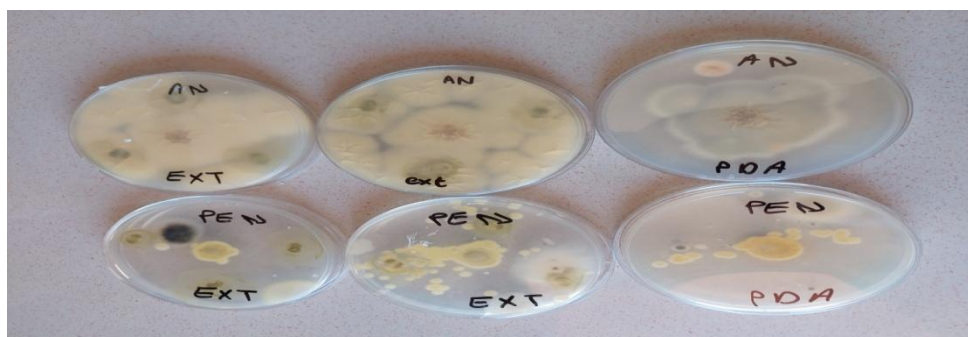


Figure 33 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition exercés par les deux extraits (EAS et EAU) sur les champignons.

D'après les résultats, aucune activité inhibitrice n'est enregistrée contre les souches testées par les deux extraits. Et cela signifie que ces deux dernières sont résistantes et que nos extraits sont en faibles concentrations en composés actifs capables d'inhiber ou de dénaturer les souches choisies. Ce résultat est confirmé également par [104] qui ont rapporté que *C. albicans* était le microorganisme le plus résistant à l'extrait de feuilles d'olivier.

Une autre étude réalisée sur une collection importante de 30 souches de champignons filamenteux dans le but d'identifier l'activité inhibitrice des extraits des feuilles d'olivier par la méthode de diffusion sur disque. Selon cette référence, toutes les souches fongiques testées ont montré divers degrés de sensibilité aux extraits dont les souches correspondant à *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. parasiticus* (1-4 souches), *A. tamari*, *N. crassa*, *M. racemosus*, *P. griseofulvum* et *R. oligosporu* ont présenté une résistance à l'égard des extraits testés.

La différence entre les activités antifongiques de l'extrait pourrait être attribuée à l'origine de l'échantillon, à une procédure d'extraction différente et à un profil chimique différent de l'extrait [105].



CONCLUSION



Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacologie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins ainsi que les effets antioxydants et l'effet antimicrobien de l'extrait éthanolique de la partie aérienne (feuilles) de l'olivier a été évalué dans le présent travail.

L'optimisation par les plans d'expériences de l'analyse quantitative des extraits éthanoliques préparés a montré que l'extrait préparé sous agitation s'est révélé plus riche en polyphénols totaux, par rapport à l'extrait ultrasonique (565,047 et 549,076 µg EAG/mg ES, respectivement).

L'activité antioxydante des différents extraits d'*Olea europaea* a été évaluée par la méthode de réduction du radical libre DPPH. En effet, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans l'extrait obtenu par agitation 87,67%. Par contre elle est inférieure pour l'extrait ultrasonique 80,76%.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les résultats indiquent que les deux extraits possèdent une activité antibactérienne qui varie d'une souche à une autre comme suite :

*une activité inhibitrice de 14,66 et 13,33 mm de diamètre exercée par l'ESA et l'EAU sur *Staphylococcus* respectivement.

*une zone d'inhibition de 14,33 et 13,33 mm enregistrée cas de *S. aureus* par l'ESA et l'EAU respectivement.

* un diamètre d'inhibition de 11mm est enregistré cas de *Klebsiella* par les deux extrait.

*une activité de 10,33 mm de diamètre cas de *S. subtilis* par l'ESA et de 10mm par l'EAU.

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer la richesse des feuilles d'*Olea europaea* en substances chimiques et qui pourraient représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives en thérapeutique.

A l'issue de la présente étude les perspectives suivantes peuvent être dégagées :

- ✓ Il serait intéressant de déterminer la composition chimique de chacun des deux extraits des feuilles d'olivier.
- ✓ D'autres tests antibactériens plus avancés sont nécessaires pour l'évaluation de cet effet antibactérien des polyphénols, afin de valoriser ces produits naturels et les utiliser en phytothérapie et la pharmacologie.
- ✓ Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes et de faire des tests afin de déterminer de nouveaux agents thérapeutiques.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



Références Bibliographiques

- [1] : **Fawcett, C.H. et Spencer, D.M. (1970).**Plant chemotherapy with natural products. Ann. Rev. phytopath. 403-418.
- [2]: **Aouidi, F. (2012).**Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa)Leaves. Molécules, Etude de la valorisation des feuilles d'Olivier *Olea Europaea* dans L'industrie Agro-Alimentaire. Thèse e doctorat, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (Tunisie). 1153-1162.
- [3]: **Hmamouchi, M., (1997).** Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc. 89 -108
- [4] :**LOUSSERT,L., AND BROUSSE,G. (1978).**L'OLIVIER TECHNIQUES AGRICOLES ET PRODUCTION MEDITERRANES, (EDS) MAISONNEUVE ET LAROUSSE, PARIS, FRANCE,PAGE 480.
- [5]: **TOURTE, Y., AND BORDONEAN, M., (2005).**LE MONDE DES VEGETALES : ORGANISATIONS, PHYSIOLOGIE ET GENOMIQUE. Eds. DUNOD. PARIS. FRANCE. 25-26.
- [6]: **CRONQUIST, A. (1981).** AN INTEGRATED SYSTEM OF CLASSIFICATION OF FLOWERING PLANTS. COLUMBIA UNIVERSITY PRESS.
- [7]: **METZIDAKIS I T, (1997).** PROCEEDINGS OF THE THIRD INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OLIVE GROWING: ACTA HORTICULTURE, CRETE, CHANIA & GREECE. 1(474).
- [8]: **BURNIE, G., FORRESTER, S., GREIG, D., &GUEST, S. (2006).** BOTANICA: ENCYCLOPEDIÉ DE BOTANIQUE ET D'HORTICULTURE. MENGES, PARIS
- [9]: **LANDOLFI R., MOWER R.L., STEINER M. (1984).**MODIFICATION OF PLATELET FUNCTION AND ARACHIDONIC ACID METABOLISM BY BIOFLAVONOIDS. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONS, BIOCHEM PHARMACOL 33 :1525-1530.
- [10] : **PAGNOL, J., (1996).** L'OLIVIER. AUBANEL ED, FRANCE.
- [11] : **VERDIER, E., (2003).** L'HUILE D'OLIVE.
- [12]: **BABOUCHE ET KELLOUCHE A., (2012).** ETUDE DE L'ENTOMOFAUNE DEL'OLIVERAIE DE LA REGION DE TIZI-OUZOU. OP LABORATOIRE D'ENTOMOLOGIE. DEPARTEMENT DE BIOLOGIE FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES. UNIVERSITE DE TIZI-OUZOU ALGERIE.
- [13] : **BENSEMMANE A., (2009).** L'OLEICULTURE: DEVELOPPONS LE SECTEUR DE L'HUILE D'OLIVE.
- [14] : **OREGGIA C., MARINELLI M., (2017).** FLOSOLEI. DEL TRIBUNAL DI ROMA. ITALIE.
- [15]: **GHEDIRA K, (2008).** L'OLIVIER, PHYTOTHERAPIE . 6: 83–89.

- [16]: **ERBAY, Z., ICIER, F., (2009).** OPTIMIZATION OF HOT AIR DRYING OF OLIVE LEAVES USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*, 91, 533-541.
- [17]: **NEFZAOUI A., (1995).** FEEDING VALUE OF MEDITERRANEAN RUMINANT FEED RESOURCES. ADVANCED COURSE. SYRIA 12-23 MARCH 1995.
- [18]: **MARTIN-GARCIA, I., YANEZ RUIZ, D., MOUMEN, A., MOLINA ALCALDE, E., (2006).** EFFECT OF POLYETHYLENE GLYCOL, UREA AND SUNFLOWER MEAL ON OLIVE (OLEAEUROPAEA VAR. EUROPAEA) LEAF FERMENTATION IN CONTINUOUS FERMENTORS. *SMALL RUMINANT RESEARCH*, 61, 53-61.
- [19]: **MARTIN-GARCIA, A.I., MOLINA-ALCAIDE, E., (2008).** EFFECT OF DIFFERENT DRYING PROCEDURES ON THE NUTRITIVE VALUE OF OLIVE (OLEAEUROPAEA VAR. EUROPAEA) LEAVES FOR RUMINANTS. *ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 142, 317-329.
- [20]: **FEGEROS, K., ZERVAS, G., APSOKARDOS, F., VASTARDIS, J., APOSTOLAKI, E. (1995).** NUTRITIVE EVALUATION OF AMMONIA TREATED OLIVE TREE LEAVES FOR LACTATING SHEEP. *SMALL RUMINANT RESEARCH*, 17, 9-15.
- [21] : **Boudjouref M. (2011).**Evaluation de l'activité antioxydant et antimicrobienne des extraits phénoliques d'Urticadioica Mémoire de fin d'études En vue de l'obtention de diplôme de master académique en Biologie, Université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou.
- [22] : **Maurice N. (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris, 12- 14.
- [23]: **Botsoglou E., Govaris A., Christaki E. and Botsoglou N. (2010).** Effect of dietary olive leaves and/or a-tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry* 121, 17-22.
- [24] **Talhaoui N., Taamalli A., Gómez-Caravaca A. M., Fernández-Gutiérrez A. and Segura- Carretero A. (2015).** Phenolic compound in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International* 77, 92–108.
- [25]: **Orozco-Solano M., Ruiz-Jiménez J. and Luque de Castro M.D. (2010).** Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 1227-1235.
- [26]:**Tadashi U. (2006).** Antiaging food compositions containing collagen, and their manufacture. Patent written in Japanese, 7.
- [27]: **Bouaziz M. and Sayadi S. (2003).** Hight yield extraction of oleuropein from chemlali olive and leaves and bioconversion to hydroxytyrosol. *Polyphénols actualités* 23,11-15.

- [28] : **APAK R., GÜÇLÜ K., DEMIRATA B., ÖZYÜREK M., ÇELİK S., BEKTAŞOĞLU B., BERKER K. AND ÖZYURTD.COMPARATIVE (2007).** EVOLUTION OF VARIOUS TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY ASSAYS ARTAUD MONIQUE. L'OLIVIER ET CES CONTRIBUTIONS DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DU SYNDROME METABOLIQUE, 06-07.
- [29]: **HANDIQUE J., AND BARUAH B. (2002).** POLYPHENOLIC COMPOUND : AN OVERVIEW. REACT.FUNCT. POLYM 52,193 188.
- [30] : **MANALLAH A. (2012).** ACTIVITES ANTIOXYDANTE ET ANTICOAGULANTE DES POLYPHENOLS DE LA PULPE D'OLIVE OLEA EUROPAEA L. POUR OBTENIR LE DIPLOME DE MAGISTER, OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE. UNIVERSITE FERHAT ABBAS- SETIF, 87.
- [31]: **BOURGOU S., KSOURI R., BELLILA A., SKANDRANI I., FALLEH H., MARZOUK B. (2008).** PHENOLIC COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF TUNISIAN NIGELLA SATIVA L. SHOOTS AND ROOTS.C. R. BIOLOGIES, 48-55.
- [32] : **BOIZOT N. ET CHARPENTIER J.P. (2006).** METHODE RAPIDE D'EVALUATION DU CONTENU EN COMPOSES PHENOLIQUES DES ORGANES D'UN ARBRE FORESTIER. LE CAHIER DES TECHNIQUES DE L'INRA, 79-82.
- [33] : **HARBORNE, J.B. (2013).** THE FLAVONOIDS:ADVANCES IN RESEARCH SINCE 1980. SPRINGER.
- [34] : **MACHEIX J., FLEURIET A ET SARNI-MANCHADO P. (2006).** LES POLYPHENOLS EN AGROALIMENTAIRE. ED. TECHNIQUE ET DOCUMENTATION, PARIS. FRANCE, 398 P.
- [35]:**BOROSB., JAKABOVA S., DORNYEI A., HORVATH G., PLUHARE Z., KILARF F AND FELINGERA, A. (2010).** DETERMINATION OF POLYPHENOLIC COMPOUND BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROSCOPY IN THYMUS SPECIES. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY 51, 7972-7980.
- [36]: **CROZIER A., CLIFFORD M.N., ASHIHARA H. (2006).** PLANT SECONDARY METABOLITES: OCCURRENCE, STRUCTURE AND ROLE IN THE HUMAN DIET. EDT BLACKWELL PUBLISHING LTD.
- [37]: **PONS I.B., AURA A.M., VUORELA S., KOLEHMAINEN M., MYKKANEN H AND POUTANEN K (2009).** REY PHENOLICS IN NUTRITION AND HEALTH. JOURNAL OF CEREAL SCIENCE DOI: 10,1016/J.JCS.
- [38] : **CHIRA K, SUH J.H, SAUCIER C AND TEISSÈDRE P.L (2008).** LES POLYPHENOLS DU RAISIN PHYTOTHERAPIE.6 : 75-82.
- [39] : **DE SOUZAR.F., W.F., DE GIOVANI. (2004).** ANTIOXIDANT PROPERTIES OF COMPLEXES OF FLAVONOIDS WITH METAL IONS. REDOX REPORT. 9(2): 97-104.
- [40]: **KORKINA L.G., AFANAS'EV I.B. (1997).** ANTIOXIDANT AND CHELATING PROPERTIES OF FLAVONOIDS. ADV. PHARMACOL. 38: 151–163.

- [41]: AFANAS'EVA, I.B., OSTRAKHOVITCH, E.A., MIKHAL'CHIK, E.V., IBRAGIMOVA, G.A., KORKINA, L.G. (2001). ENHANCEMENT OF ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF BIOFLAVONOID RUTIN BY COMPLEXATION WITH TRANSITION METALS. BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY. 677-684.
- [42]: MUROTA K., MITSUKUNI Y., ICHIKAWA M., TSUSHIDA T., MIYAMOTO S., ET TERAO J. (2004). QUERCETIN-4'-GLUCOSIDE IS MORE POTENT THAN QUERCETIN-3'-GLUCOSIDE IN PROTECTION OF RAT INTESTINAL MUCOSA HOMOGENATES AGAINST IRON ION-INDUCED LIPID PEROXIDATION. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY.1907-1912.
- [43]: KOSTYUK, V.A., POTAPOVICH A.I., KOSTYUK T.V., CHERIAN M.G. (2007). METAL COMPLEXES OF DIETARY FLAVONOIDS: EVALUATION OF RADICAL SCAVENGER PROPERTIES AND PROTECTIVE ACTIVITY AGAINST OXIDATIVE STRESS IN VIVO. CELL. MOL. BIOL. 62-69.
- [44]: MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., RÉMÉSY C AND JIMÉNEZ L (2004). POLYPHÉNOLS; FOOD SOURCES AND BIOAVAILABILITY. AM J CLIN NUTR.79: 727-747.
- [45]: D'ARCHIVIO M., FILES C., DI BENEDETTOR., GIOVANNINI C AND MASLLAR (2007). POLYPHÉNOLS, DIETY SOURCE AND BIOAVAILABILITY. ANN LST SUPER SANITA 383-361.
- [46]: BAI Y., SONG F., CHEN M., XING J., LIU Z., LIU S. (2004). CHARACTERIZATION OF THE RUTINMETAL COMPLEX BY ELECTROSPRAY IONISATION TANDEM MASS SPECTROMETRY. ANALYTICAL SCIENCES. 20: 1147-1151.
- [47]: CHUNG, J. H., LEE, C. S., SHIN, Y. K., LEE, K. S. (1991). INHIBITORY ACTIONS OF QUERCETIN AND RUTIN ON FE 2+-INDUCED LIPID PEROXIDATION. KOREAN J. PHARMACOL. 27: 69-80.
- [48]: HEMINGWAY, R. W., OHARA, S., STEYNBERG, J. P., BRANDT, E. V., & FERREIRA, D. (1992). CH HETCOR NMR STUDIES OF PROANTHOCYANIDINS AND THEIR DERIVATIVES. IN PLANT POLYPHENOLS (PP. 321-337). SPRINGER US.
- [49]: COWAN, M. M. (1999). PLANT PRODUCTS AS ANTIMICROBIAL AGENTS. CLIN MICROBIOL 564-582.
- [50] : GUIGNARD J.L., (1996). ABREGE DE BIOCHIMIE VEGETALE, ED. MASSON, PARIS, 160
- [51] : BESSAS, A;BENMOUSSA, L; KERARMA, M. ; (2007). DOSAGE BIOCHIMIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES DATTES ET LE MIEL RECOLTES DANS LE SUD ALGERIEN.
- [52] : GHESTEM A, SEGUIN E, PARIS M, ORECCHIONI A.M., (2001). LE PREPARATEUR EN PHARMACIE. DOSSIER 2, BOTANIQUE, PHARMACOGNOSIE, PHYTOTHERAPIE. HOMEOPATHIE. TEC ET DOC (Ed), 272.
- [53]: KNAGGS A.R. (2003). THE BIOSYNTHESIS OF SHIKIMATE METABOLITES. NATURAL PRODUCT REPORTS 20,36- 119.

- [54]:NACKS M., SHAHIDI F. (2004). EXTRACTION AND ANALYSIS OF PHENOLICS IN FOOD. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY ,11-95.
- [55]: WOJCIKOWSKI K., STEVENSON L, (2007). ANTIOXIDANT CAPACITY OF 55 MEDICINAL HERBS TRADITIONALLY USED TO TREAT THE URINARY SYSTEM: A COMPARISON USING A SEQUENTIAL THREE-SOLVENT EXTRACTION PROCESS, J ALTERN COMPLEMENT MED;103-10.
- [56] :DJENANE, E., YANGUELA ,J., DERRICHE ,F., BOUARAB, L., ET RONCALES, P.,(2012).EXTRAIT DE FEUILLES D'OLIVIER ; TESTS IN VITRO VIS-A-VIS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS,SALMONELLAENTERITIDIS ET PSEUDOMONAS AERUGINOSA ; APPLICATION SUR LA VIANDE DE DINDE. PHYTOTHERAPIE,10-18.
- [57] : BISIGNANO G., TOMAINO A., LO CASCIO R., CRISAFI G., UCCELLA N., SAIJA A (1999).ACTIVITE ANTIMICROBIENNE IN VITRO DE L'OLEUROPEINE ET DE L'HYDROXYTYROSOL, J PHARMPHARMACOL,51.
- [58]: DI CARLO G., MASCOLO N., IZZO, A.A., CAPASSO F, (1999). FLAVONOIDS: OLD AND NEW ASPECTS OF A CLASS OF NATURAL THERAPEUTIC DRUGS, REVIEW. LIFE SCI. 1999, 65: 337-53.
- [59]: LANDOLFI R., MOWER R.L., STEINER M (1984). MODIFICATION OF PLATELET FUNCTION AND ARACHIDONIC ACID METABOLISM BY BIOFLAVONOIDS. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONS, BIOCHEMPHARMACOL 1525-1530.
- [60]: Tieppo, J., Vercelino, R., Dias, A., Silva Vaz, M., Silveira, T. et Marroni, C., (2007). Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. Food and Chemical Toxicology,1140- 1146.
- [61]: Macheix, J.-J., A. Fleuriet, et al. (1990). Fruit phenolics. Boca Raton.
- [62] : 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.
- [63]: SKOPEC M. M, HAGREMAN A AND KARASOVW.H (2004). DO SALIVARY PROLINE-RIEH PROTEIN CONTERACTDIETY HYDROLYSABLE TANNIN IN LABORATORY RATS? JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY.1679-1692.
- [64] : (ZIMMER N ET CORDESSE R (1996). INFLUENCE DES TANINS SUR LA VALEUR NUTRITIVE DES ALIMENTS DES RUMINANTS. INRA PROD AMIN. 167-179.
- [65] : RIBEREAU-GAYON, P (1968). LES COMPOSES PHENOLIQUES DES VEGETAUX. EDITION DUNOD, PARIS 254.
- [66]: NACZK M., SHAHIDI F. (2004). EXTRACTION AND ANALYSIS OF PHENOLICS IN FOOD. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 95–111.

- [67]: **TSAO R. AND DENG Z. (2004)**. SEPARATION PROCEDURES FOR NATURALLY OCCURRING ANTIOXIDANT PHYTOCHEMICALS. J. CHROMATOGR. B, 812, 85-99.
- [68]: **USAQUEN-CASTRO X., MARTINEZ-RUBIO M., AYA-BAQUERO H AND GONZALEZ-MARTINEZ G. (2006)**. ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM RED-GRAPE (VITISVINIFERA) RESIDUES. IUFoST, 1315- 1324.
- [69]: **Yadav, L.D.S. (2013)**. **Organic spectroscopy. Springer Science & Business Media.**
- [70]: **Tariq M., Jennifer N. Haque., Kevin J. Roberts., Dominic Rhodes., Derek Wilkinson. (2009)**. Measurements and modelling of free-surface turbulent flows induced by a magnetic stirrer in an unbaffled stirred tank reactor. Chemical Engineering Science, 4197-4209.
- [71]: **Brachet, A., P. Christen, et al. (2002)**. "Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves." Phytochemical Analysis, 162-169.
- [72]: **Luque de Castro, M. D. and L. E. Garcia-Ayuso (1998)**. "Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future,1-10.
- [73] : **BENALIA H., NAILI D. (2020)**. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANT DE L'EXTRAIT DES FEUILLES D'OLIVIER, THESES DE MAGISTER, UNIVERSITE MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI, B.B.A, 26-27
- [74] : **Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W., (2011)**.Introduction to modern liquid chromatography.
- [75]: **Bobzin, S.C., Yang, S., Kasten, T.P, (2000)**. Application of liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy to the identification of natural products. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App., Hyphenated Techniques in LC and their input in Biosciences ,259–267.
- [76]: **Stem, E.S., Timmons, C.J., (1970)**. Electronic absorption spectroscopy in organic chemistry. Arnold Lond.
- [77]: **Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., (2001)**. Characterization and measurement of anthocyanins by UVvisible spectroscopy. Curr. Protoc. Food Anal. Chem.
- [78]: **KOSTYUK V.A., POTAPOVICH A.I., VLADYKOVSKAYA E.N., KORKINA L.G., AFANAS'EV I.B.A. (2001)**. INFLUENCE OF METAL IONS ON FLAVONOID PROTECTION AGAINST ASBESTOS-INDUCED CELL INJURY. ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 129-137.
- [79]: **MORIDANI M.Y., POURAHMAD J., BUI H., SIRAKI A., O'BRIEN P.J. (2003)**. DIETARY FLAVONOID IRON COMPLEXES AS CYTOPROTECTIVE SUPEROXIDE RADICAL SCAVENGERS. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, 243-253.
- [80]: **J. Goupy. (2001)**. Introduction aux plans d'expériences . 2ème Ed. Dunod, Paris.

- [81]: **Licitra G. (2013)**. Etymologia:Staphylococcus. Emerging Infections Diseases ,19 ,1553.
- [82]: **Wertheim Hf, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. (2005)**. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. Lancet Infect Dis, 62-751.
- [83]: **Miller VL, Lawlor MS, Hsu J, Rick PD. (2005)**. Identification of KlebsiellaPneumoniae virulence determinants using an intranasal infection model. Molecular Microbiology, 1054-1073.
- [84]:**Vlamakis H, Chai Y, Beauguard P, Losick R, Kolter R,(2013)**.Sticking together: building a biofilm the Bacillus subtilis way. Nat RevMicrobiol,157–68.
- [85]: **Morin O. (1994)**.*Aspergillus* et aspergillose : biologie. Edition techniques Encyclopédie Médico-chirurgicale (Elsevier Paris), Maladies infectieuses, 8-600-A-10.
- [86]: **Pitt, JI. (1988)**. An appraisal of identification methods for Penicillium species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. Mycology,1135-1157.
- [87]: **SINGLETON V.L., Orthofer R and Lamnela-Raventous R.M (1999)**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxydants by means of Folinicalteu reagent. Methods Enzymology,152-178.
- [88] : **Boizot N.,Charpentier JP,(2006)**.Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'Inra, 79.
- [89] : **Lamaison J.L et Carnat A (1990)**. Teneursen principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de Crataegus monogyna Jacq. Et de Crataegus laevigata (Poiret) DC en fonction de la végétation. PL.Med. Phytother.12-16.
- [90]: **BahorunT., Gressier B., Trotin F., Brunet C, Dine T., Locks M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. and pinkas M (1996)**. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical préparations. Arzneimtte-Forschung/ Drug Reseach.1086-1108.
- [91] : **Ribereau-Gayon P (1968)**. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254.
- [92]: **reed J.D (1995)**. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in Forage Legumes. J. h i m. Sci.1516-1528.
- [93]: **Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP. (2008)**. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. Phytochemistry, 1732 – 1738.

- [94] : **Belaiche P (1979)**. Les techniques de laboratoire et l'aromatogramme. In : traité de la phytothérapie et l'aromathérapie, 121-132.
- [95] : **Karabay-Yavasoglu NU, Sukatar A, Ozdemir G, Horzum Z. (2007)**. Antimicrobial Activity of volatile components and various extracts of the red aglaJaniarubens. *Phytotherapie research*,153-156.
- [96] : **Leybros, J. and P. Frémeaux (1990)**. "Extraction solide-liquide aspects théoriques." techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06.
- [97]: **Naczka M and Shahidi F (2004)**. Extraction and analysis of phenolics in food. *journal of chromatography* 95-111.
- [98]: **Ulloa P, Vidal J, Lopéz de Dicastillo C, Rodriguez F, Guarda A, Cruz RMS, Galotto MJ (2018)**. Development of poly (lactic acid) films with propolis as a source of active compounds : Biodegradability, physical, and functional properties. *Journal of appliedpolymer science*,1-11.
- [99]: **MACHADO T.D., LEAL I.C.R., AMARAL A.C.F., DOS SANTOS K.R.N., DA SIVAM.G., KUSTER R.M. (2002)**. Antimicrobial ellagitannin of Punicagranutum fruits. 606-610.
- [100]: **RAVIKUMAR S., NAZAR S., NURALSHIEFA A., ABIDEEN S. (2005)**. Antibacterial activity of traditional therapeutic coastal medicinal plants against some pathogens. 83-386. Pub Med Abstract.
- [101] :**Djenane, E., Yanguela, J., Derriche, F., Bouarab, L., et Roncales, P., (2012)**. Extrait defeuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de Staphylococcus aureus, SalmonellaEnteritidis et Pseudomonasaeruginosa ; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie.*, 10-18.
- [102]: **Kiyomizu ,K., Yoshida ,H., Minami, R .,Tanimura ,A., Karasuno ,T., Hiraoka ,A.,(2008)**. Fulminant septicemia of Bacillus cereus resistant to carbapenem in a patient withbiphenotypic acute leukemia, 361-367.
- [103]: **Sousa A., Ferreira I., Calhella R., Andrade P.B., Valentao P., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J. (2006)**. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stonedtable olives 'alcaparra', 8533–8538.
- [104]: **Korukluoglu M., Sahan Y, Yigit A., Karakas R. (2006)**. Antifungal activity of olive leaf (*OleaEuropaea L.*) extracts from the Trilye Region of Turkey, 359-362.

[105]: Pereira AP., Ferreira I., Marcelino F., Valentão P., Andrade P.B., SeabraR., Estevinho L., Bento A., Pereira J.A. (2007). Phenolic Compounds and AntimicrobialActivity of Olive (*Olea europaea* L. Cv.

Résumé

L'objectif de ce travail est l'optimisation des techniques d'extractions de l'extrait des feuilles d'olivier. Tout d'abord, deux méthodes d'extraction à savoir l'agitation et l'ultrason ont été utilisées pour l'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des feuilles d'olivier.

Une application des plans d'expérience est envisagée à fin d'optimiser les conditions d'extraction. L'effet des variables indépendantes (le temps d'extraction et la masse de l'échantillon) sur la réponse (la teneur en polyphénols totaux) a été évalué en utilisant le logiciel MODDE6.0. Ensuite, les extraits obtenus par les conditions optimales ont soumis à différentes analyses : spectroscopie UV-visible, caractérisation structurale par IRTF, évaluation de l'activité antioxydante ; antibactérienne et antifongique.

Le dosage de l'extrait ethanolic a fait ressortir les résultats suivants

- ✓ La teneur en composés phénoliques des extraits ESA et EAU sont respectivement 565,047 et 549,076 ($\mu\text{g EAG/mg ES}$).
- ✓ Pour les flavonoïdes, on a obtenu une valeur de 209,69 ($\mu\text{g EAG/mg ES}$) pour EAU et une valeur de (135,32 $\mu\text{g EQ/mg ES}$).
- ✓ Les tannins 332,331 ($\mu\text{g ECT/mg ES}$) pour ESA, 159,273 ($\mu\text{g ECT/mg ES}$) pour EAU.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la méthode de réduction du radical Libre DPPH. Les pourcentages de piégeage du DPPH d'ESA et d'EAU respectivement ont été estimés à : 87,67% et 80,76% respectivement.

Les résultats de l'activité antimicrobienne a montré que les deux extraits ont exercé une activité antibactérienne contre des quatre souches testées (*B.subtilis*, *S.aureus*, *Staphylococcus* et *Klebsiella sp*) tandis que aucune activité n'est enregistrée contre les champignons testés (*pinicillium sp* et *aspergillus niger*)

Mots clés : *Olea europaea* L, optimisation, extraction, ultrason, agitation, activité antioxydante, activité microbienne,