

Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Investigation des voies de valorisation des
feuilles de l'olivier.**

Présenté par :

Dalil Nardjes & Ounnas Cylia

Soutenu le : 26 Juin 2023

Devant le jury composé de :

Mr	<i>Bouadam S.</i>	MAA	Président
Mr	<i>Benadjaoud A.</i>	MCA	Encadreur
Mme	<i>Ali Hussein A.</i>	Dr	Co-encadreur
Mme	<i>Meziani S.</i>	MCB	Examineur

Année universitaire : 2022 / 2023

Le grand merci est réservé au Dieu le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il nous a accordé pour mener à bien notre travail.

Nous présentons nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidés dans l'élaboration de ce mémoire de recherche :

M. Benadjaoud Ali, notre promoteur pour son encadrement de qualité, sa motivation professionnelle, ses conseils et critiques, ses corrections, sa gentillesse et sa patience ainsi que pour le temps qu'il a consacré à la réalisation de ce travail.

Madame Ali Hussein A., Mr Zeghib W. et Mr Boudjouan F. pour toute l'aide et les explications apportées. Ils nous ont été d'un grand secours durant notre pratique. Tout le mérite leur revient.

L'ensemble du personnel technique de laboratoire pédagogique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Bejaia, qui nous ont bien reçus et accueillis.

Nous remercions Mr Bouadam S. d'avoir accepté de présider ce jury de soutenance et Mme Meziani S. qui a accepté d'examiner ce travail. Qu'ils trouvent ici notre gratitude.

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 «**RACHIDA**», Et mon cher père «**MHAND**» 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 Ma belle chère sœur «**Siham**» et son fiancé «**Fahim**» qui m'a aidé à chaque fois que j'en avais besoin.

Ames chères frères «**Kheirddine**», «**Riad**» et «**Nafaa**».

A tous mes amis proches et la promotion 2022-2023.

À toutes la famille **Dalil & Raid**.

Ma binôme «**Cylia**» et toute sa famille.

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

Que dieu les garde tous et les protège.

Nardjes

Dédicace

Avec tous mes sentiments de respect, avec l'expérience de ma reconnaissance, je dédie de remise de diplôme et ma joie

À mes parents **Salem & Hafida**, mes premiers supporteurs et ma plus grande force. La source de ma joie et mon bonheur, mon courage, l'espoir qui allumer mon chemin, ma source de vie, d'amour et d'affection, merci de n'avoir jamais douté de moi.

À mon frère aîné **Amazigh**, mon idole, mon bras droit qui n'a pas cessé de me conseiller, m'encourager et me soutenir.

À mon adorable petit frère **Lounas** ma source de joie à qui je souhaite la réussite.

À la mémoire de mon grand père Abdenour mes tantes Zoulikha & Houa que dieu les garde dans son vaste paradis

À toutes la famille **OUNNAS & ADJAOUD**.

À ma binôme « **Nardjes** » et toutes sa famille.

à toutes mes chères amies

À tous ceux qui m'aiment

Que Dieu les garde tous et les protège

Cylia

%	Pourcentage
°	Degré
°C	Degré Celsius
±	Plus ou moins
[]	Concentration
λ	Longueur d'onde
ABTS	Azino-bis(3-éthylbenzon thiazoline-6-sulfonique)
Al(III)	Aluminium
e⁻	Electron
EAG	Equivalent acide gallique
Fig.	Figure
h	Heure
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
M	Molarité
mn	Minute
MS	Matière sèche
N	Normalité
pH	Potentiel hydrogène
R	Ratio
T	Température
t	Temps
Tab.	Tableau
tr	Tours
Trolox	Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyan-2-carboxylique

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
I. Introduction	01
Synthèse bibliographique	
II. Synthèse bibliographique	03
<i>Olea europaea</i> L.	03
Position systématique et subdivision	03
Distribution et habitats	04
Description botanique	05
Habitat et écologie	06
Importance et usages	07
Biomasse foliaire de l'olivier	08
Composition chimique globale des feuilles	08
Composition chimique particulière des feuilles	09
Bienfaits sur la santé humaine	11
Possibilités de valorisation de la biomasse foliaire de l'olivier	12
Utilisation antérieure	12
Utilisation présente	12
Technologies appliquées aux feuilles de l'olivier	13
Facteurs influençant la stabilité des extraits de feuilles	14
III. Matériel et méthodes	16
Matériel	16
Matériel végétal	16
Collecte des feuilles	16
Traitements appliqués aux feuilles	17
Préparation des extraits de feuilles	17
Méthodes	19
Dosage des composés phénoliques totaux	19
Principe	19
Dosage proprement dit	19
Gamme étalon et expression des résultats	20

	Dosage des flavonoïdes totaux	20
	Principe	20
	Dosage proprement dit	21
	Gamme étalon et expression des résultats	22
	Potentiel antioxydant	22
	Capacité antioxydante équivalent Trolox	22
Principe	23	
Mode opératoire	24	
Gamme étalon et expression des résultats	24	
	Capacité antioxydante totale par le test du phosphomolybdate	25
	III.2.3.2.1. Principe	25
Mode opératoire	25	
Gamme étalon et expression des résultats	26	
	Analyse statistique	26
IV. Résultats & Discussion		27
	Résultats	27
	Principaux enseignements tirés des analyses statistiques	27
	Contenu total en composés phénoliques	27
	Potentiel antioxydant équivalent Trolox® via l'ABTS	28
	Principaux enseignements tirés des modèles mathématiques	30
	Corrélations	30
	Régression polynomiale	30
	Analyse de la variance_coefficient de régression R ²	33
	Plan de surface de réponse – Plan de Box-Behnken	34
	Opération de quantification	36
	Contenu total en composés phénoliques	37
	Contenu total en flavonoïdes	39
	Capacité antioxydante équivalent Trolox®	41
	Capacité antioxydante totale par le test au phosphomolybdate	43
	Discussion	44
V. Conclusion		51
VI. Références bibliographiques		52

N°	Titre	Page
01	Répartition mondiale des zones de production d' <i>Olea europaea</i> L. Zones oléicoles et limites de culture (Ali et al. 2014).	04
02	Planche botanique d' <i>Olea europaea</i> L. <i>Source</i> : http://phytomag.com/olivier	05
03	Optimum écologique de l'olivier (<i>Olea europaea</i> L.) exprimé par rapport aux différentes caractéristiques du climat et du sol. <i>Source</i> : https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-44593-ecologie	06
04	Bénéfices de l'olivier (<i>Olea europaea</i> L.) en terme d'huile, d'olives de table et de bois. <i>Source</i> : https://www.holylandmarket.com/blogs/news/olive-wood-the-history .	07
05	Composés chimiques caractéristiques des feuilles de l'olivier et leurs effets potentiels sur la santé humaine via le microbiote intestinal (Žugčić et al. 2019).	11
06	Différentes applications et bénéfices des extraits de feuilles d'olivier (Selim et al. 2022).	12
07	Facteurs influençant la qualité des extraits de feuilles d'olivier (Selim et al. 2022).	14
08	Arbres et lieu de provenance des échantillons de feuilles d' <i>Olea europaea</i> L. collectés des régions de <i>Béni-Maouche</i> (zone montagneuse) et de <i>Seddouk</i> (zone proche d'une voie de circulation).	16
09	Collecte des feuilles d' <i>Olea europaea</i> L. et opération de séchage après lavage.	17
10	Poudres finement tamisée obtenue des feuilles d' <i>Olea europaea</i> L. provenant de deux régions différentes.	17
11	Paramètres considérés (poids, température et temps d'extraction) lors de l'extraction depuis les poudres tamisées de feuilles d'olivier.	18
12	Principe de dosage des polyphénols totaux dont le mécanisme de base est une réaction d'oxydation / réduction. <i>Source</i> : https://libios.fr/solutions-analytiques/stress-oxydatif-capacite-anti-oxydante/	19
13	Structure chimique basique des flavonoïdes (a) ; illustration de la formation d'un complexe Al(III) – Quercétine (b) ; et formation d'un	21

complexe Al(III) – flavonoïde (quercétine pris comme exemple) en présence du NaNO₂ (c). Source : **Mekonnen and Desta, 2021 ; Shraim et al. 2021**).

- 14 Opération de quantification des flavonoïdes totaux : blanc (a) ; l'extrait de feuilles d'olivier (b) et l'extrait de feuilles d'olivier + AlCl₃ (c). Lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 415$ nm. 22
- 15 Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•]. Le radical ABTS^{•+} (absorbant à 734 nm) est formé par un arrachement d'un électron e⁻ à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H[•]), l'atome d'azote concerné piège un H[•], conduisant à l'ABTS⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution (**Marc et al. 2004**). 23
- 16 Représentation schématique de la méthode de piégeage du radical ABTS (**Üstündaş et al. 2018**). 24
- 17 Changement de couleur de l'extrait du jaune au vert après rajout du molybdate d'ammonium en milieu acide. Lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 695$ nm. 25
- 18 Représentation schématique du plan de Box-Behnken pour trois facteurs. 34
- 19 Diagrammes de surface de réponse montrant les effets du ratio (en g), de la température (en °C) et du temps d'application (en mn) sur l'extraction des composés phénolique (en A) et l'ABTS (en B) à partir des feuilles d'*Olea europaea* L. 35
- 20 Profileur de prédiction pour les conditions optimums obtenues pour l'extraction des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant depuis les feuilles d'*Olea europaea* L. par la méthode de décoction. 36
- 21 Courbe étalon réalisée à l'aide de différentes concentrations en acide gallique (densité optique lue à $\lambda = 760$ nm) qui servira au dosage des polyphénols totaux. 37
- 22 Effets de la provenance sur le contenu total en composés phénoliques (TPC) des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. L'échantillon provenant de la région de *Beni-Maouche* est hypothétiquement considéré comme sain, celui de *Seddouk* est supposé pollué. Les résultats ont été rapportés en mg d'équivalent en acide gallique / g de matière végétale sèche (mg EAG/g MS) et représentent une valeur moyenne de 5 essais différents \pm écart-type. 38

-
- 23** Courbe étalon réalisée à l'aide de différentes concentrations en quercétine (densité optique lue à $\lambda = 415$ nm) qui servira au dosage des flavonoïdes totaux. **39**
- 24** Effets de la provenance sur le contenu total en flavonoïdes (TFC) des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. L'échantillon provenant de la région de *Beni-Maouche* est hypothétiquement considéré comme sain, celui de *Seddouk* est supposé pollué. Les résultats ont été rapportés en mg d'équivalent en quercétine / g de matière végétale sèche (mg E quercétine/g MS) et représentent une valeur moyenne de 5 essais différents \pm écart-type. **40**
- 25** Courbe étalon réalisée à l'aide de différentes concentrations en Trolox® (densité optique lue à $\lambda = 734$ nm), qui servira à quantifier la capacité antioxydante équivalent Trolox®. **41**
- 26** Effets de la provenance sur la capacité antioxydante équivalent Trolox® des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. L'échantillon provenant de la région de *Beni-Maouche* est hypothétiquement considéré comme sain, celui de *Seddouk* est supposé pollué. Les résultats ont été rapportés en mg d'équivalent en Trolox® / g de matière végétale sèche et représentent une valeur moyenne de 5 essais différents \pm écart-type. **42**
- 27** Courbe étalon réalisée à l'aide de différentes concentrations en acide ascorbique (densité optique lue à $\lambda = 695$ nm), qui servira à quantifier la capacité antioxydante totale suite au test au phosphomolybdate. **43**
- 28** Effets de la provenance sur la capacité antioxydante totale par le test au phosphomolybdate des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. L'échantillon provenant de la région de *Beni-Maouche* est hypothétiquement considéré comme sain, celui de *Seddouk* est supposé pollué. Les résultats ont été rapportés en mg d'équivalent en acide ascorbique / g de matière végétale sèche et représentent une valeur moyenne de 5 essais différents \pm écart-type. **44**
- 29** Structure des principaux composés phénoliques composant les feuilles d'olivier (Munekata et al. 2020). **46**

N°	Titre	Page
I	Composition chimique globale des feuilles de l'olivier (exprimé en g/100g) selon plusieurs auteurs cités par Aouidi (2012) .	08
II	Structure chimique des principaux composés retrouvés au niveau des parties foliaires de l'olivier (Talhaoui et al. 2015).	09
III	Données qualitatives et quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait de feuilles de l'olivier selon Benavente-Garcia et al. (2000) cité par Aouidi (2012) .	10
IV	Contenu total en composés phénoliques (TPC – mg équivalent d'acide gallique / 1 g de matière végétale sèche) obtenu des différentes modalités d'extraction (extraits) alignés par ordre croissant et analysés statistiquement via le logiciel <i>Statistica 8.1</i> .	27
V	Activité antioxydante totale de l'extrait de feuilles d'olivier (ABTS – mg équivalent Trolox / 1 g de matière végétale sèche) obtenu des différentes modalités d'extraction (extraits) alignés par ordre croissant et analysés statistiquement via le logiciel <i>Statistica 8.1</i> .	29
VI	Corrélation TPC – ABTS ($p < 0,001$; $N = 135$; *** très hautement significatif).	30
VII	Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré des composés phénoliques totaux (TPC) (* Valeur significative à $p \leq 0,05$).	31
VIII	Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré de la méthode TEAC (<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>) via l'ABTS.	32
IX	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur le contenu total en composés phénoliques (TPC) et l'activité antioxydante ABTS.	33
X	Absorbances lues au spectrophotomètre par rapport aux concentrations d'acide gallique utilisées.	37
XI	Absorbances lues au spectrophotomètre par rapport aux concentrations de quercétine utilisées.	39
XII	Absorbances lues au spectrophotomètre par rapport aux concentrations de Trolox® utilisées.	41
XIII	Absorbances lues au spectrophotomètre par rapport aux concentrations de l'acide ascorbique utilisées.	43

INTRODUCTION

I- Introduction

Olea europaea L. tend à se retrouver partout dans le monde, mêmes en zones dont les conditions environnementales sont défavorables, en raison de sa capacité à supporter notamment un déficit hydrique et des températures élevées durant l'été (**Ray et al. 2015**). Son importance est capitale pour ses trésors qu'il recèle dans toutes ses parties, tant de point de vue productivité qu'intérêt.

En terme de productivité justement, son fruit qui se décline en olives de table ou transformé en huile d'olives accapare le marché mondial. On en a comptabilisé respectivement plus de 2885 et 3398 millions de tonnes produites durant la campagne 2022/2023 selon les chiffres du Conseil Oléicole International (**COI, 2022**). L'Algérie y contribue par une part très importante notamment pour l'olive de table (302,5 millions de tonnes) par rapport à l'huile d'olive (91 millions de tonnes) pour la même campagne de l'année 2022-2023 (**COI, 2022**) <https://www.internationaloliveoil.org>.

En terme d'intérêt, les qualités nutritionnelles des olives associées à l'odeur, la saveur et le goût sont réputés et très appréciés (**Guo et al. 2018**). La consommation de l'huile d'olive est également associée à un meilleur état de santé, une réduction du risque de développer des maladies cardiovasculaires, le diabète, la gestion de l'obésité et d'autres maladies (**Gorzynik-Debicka et al. 2018 ; Gavahian et al. 2019**).

La valeur commerciale ajoutée, l'importance nutritionnelle et les effets bénéfiques de l'olive sur la santé ne sont pas en marge de ce que peut procurer également leur transformation : feuilles résiduelles, grignons et margines. Environ 10% de sous-produits en sont issus de l'industrie de transformation des olives, abandonnés à la nature ou brûlés pour une grande partie. Les possibilités d'utilisation de cette matière première au bénéfice par exemple de l'agriculture ou de l'industrie alimentaire après valorisation n'apporteront que des avantages à l'environnement et à l'économie (**Doula et al. 2017 ; Souilem et al. 2017**). A cet effet, l'impératif d'aller vers une production d'aliments fonctionnels élaborés à partir d'extraits naturels de l'olivier ne peut constituer qu'une excellente stratégie en industrie alimentaire. C'est ce qui est préconisé pour les feuilles d'olivier y compris les branches, récupérées lors d'une campagne oléicole, depuis la cueillette et les tailles qui s'effectuent dans des oliveraies aux résidus retrouvés après nettoyage et séparation au niveau des huileries (**Alirezalu et al. 2020**).

Cette matière première est justement riche en polyphénols, qui se caractérisent par un large spectre d'activités biologiques. En conséquence, ces composés si précieux tirés de cette matière peuvent valoir une utilisation dans la préparation de compléments alimentaires, d'aliments fonctionnels, de nutraceutiques et de produits pharmaceutiques (**El and Karakaya, 2009 ; Granato et al. 2020**).

A ce titre, les nombreux composés phénoliques constitutifs des feuilles d'olivier ont suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. En plus des effets bénéfiques sur la santé déjà cités, des études ont été menées sur des animaux et des êtres humains, mettant en exergue une capacité antioxydante élevée (**Benavente-Garcia et al. 2000 ; Özcan and Matthäus, 2017**). Elle serait due notamment aux principaux composés phénoliques retrouvés au niveau de ces feuilles. Les plus communs sont l'oleuropéine ou oléopicine, l'hydroxytyrosol, la verbascoside, l'apigénine-7-glucoside et la lutéoline-7-glucoside (**Hayes et al. 2011 ; Goldsmith et al. 2014**).

Notre contribution par ce travail a été axée sur le dosage du contenu total en composés phénoliques et en flavonoïdes, suivie d'une mise en évidence d'une capacité antioxydante susceptible d'être jouée par ces composés.

La méthode d'extraction choisie est une décoction dans de l'eau. Une optimisation au préalable des paramètres de l'extraction a été étudié ; il s'agit du ratio, de la température et du temps, les plus idéales pour avoir les meilleurs taux en composés phénoliques et en activité antioxydante.

Une fois défini, le meilleur rapport/quantité a été testé sur les feuilles d'olivier cueillies directement depuis des oliviers de deux provenances différentes : une provenance de la région de Béni-Maouche et une autre de la région de Seddouk. Une étude comparative a été menée, sachant que la première provenance est censée être hypothétiquement à l'abri d'une quelconque pollution, notamment atmosphérique ; la seconde provenance est située aux abords d'une route très fréquentée par la circulation automobile et autres moyens de transport, et donc hypothétiquement polluée.

***SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE***

II- Synthèse bibliographique

II-1- *Olea europaea* L.

Olea europaea L. est une espèce d'un grand intérêt, aux potentialités énormes. C'est l'une des plus anciennes cultures du bassin méditerranéen (Blady, 1990). C'est un arbre qui peut atteindre jusqu'à 10 m de long. Il est facilement reconnaissable par son tronc courbé, ses feuilles oblongues à ovales-lancéolées et ses fleurs réunies en petites inflorescences en grappes dressées (Arab et al. 2013).

Plusieurs aspects morpho-physiologique procurent à l'olivier une forte capacité adaptative à différents types d'environnements. Ces aspects se regroupent entre autres par rapport à la spécificité morphologique de ses feuilles, de son système racinaire et à son potentiel de régénération morphogénétique (Allalout & Zarrouk, 2013).

II-1-1- Position systématique et subdivision

La classification hiérarchique de l'olivier d'Europe, *Olea europaea* L., 1753 est ainsi donnée (http://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/110002/tab/taxo) :

Règne : Plantae Haeckel, 1866

Sous-Règne : Viridiaeplantae

Classe : Equisetopsida C. Agardh, 1825

Clade : Spermatophyta

Sous-Classe : Magnoliidae Novák ex Takht., 1967

Super-Ordre : Asteranae Takht., 1967

Ordre : Lamiales Bromhead, 1838

Famille : Oleaceae Hoffmanns. & Link, 1809

Tribu : Oleae Hoffmanns. & Link ex Dumort., 1827

Sous-Tribu : Oleinae E. Wallander & V.A. Albert, 2001

Genre : *Olea* L., 1753

Espèce : *Olea europaea* L., 1753

L'espèce *Olea* a été subdivisée en premier lieu en 2 sous-espèces, *olea europaea* var. *europaea* pour l'olivier domestique, et *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr pour l'oléastre, ou olivier sauvage. Cette subdivision est devenue avec le temps obsolète, en raison de l'absence de frontière entre les populations sauvages et les populations cultivées, tant de point de vue génotypique que phénotypique (Breton, 2006).

Cinq autres sous-espèces d'olivier existent, il s'agit de *Olea europaea laperrinei* (Sahara) ; *Olea europaea cerasiformis* (Ile de Madère) ; *Olea europaea guanchica* (Iles Canaries) ; *Olea europaea maroccana* (Maroc) et *Olea europaea cuspidata* (Asie, Arabie, Afrique de l'Ouest et Afrique du Sud).

Il y a lieu de noter que les populations sauvages possèdent une grande diversité génétique, tandis que la population constituée de variétés cultivées bien qu'elle soit importante en terme du nombre d'individus se présente avec un polymorphisme beaucoup plus faible. Parmi les espèces cultivées, on recense plus de 2000 variétés d'olivier dans le monde et chacun des pays privilégie certaines variétés (et/ou cultivars) sur d'autres. L'ensemble est le fruit d'une domestication ainsi que de la reproduction sexuée à l'état domestiqué, sous la pression sélective de l'utilisation humaine vers des variétés plus performantes et plus productives d'olives et de l'huile (Breton, 2006).

II-1-2- Distribution et habitats

Au vu de son importance, l'olivier est l'une des espèces les mieux considérées au monde, 24^{ème} sur 35 espèces cultivées. Il se retrouve dans les 5 continents, poussant dans les régions à climat méditerranéen d'Australie, d'Afrique du Sud, d'Amérique du Nord et d'Amérique du Sud, couvrant environ 11 millions d'hectares, dont 98% sont situés dans le bassin méditerranéen. Près de 80% de la surface oléicole cultivée se trouve dans les pays du nord de la méditerranée (Espagne, Italie, Grèce, Turquie), 17% au Moyen-Orient (Jordanie, Syrie, Irak, Iran) et en Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Egypte), et seulement 2% en Amérique du Nord (Etats-Unis) et du Sud (Mexique, Argentine, Pérou) (Fig. 1) (Ali et al. 2014).

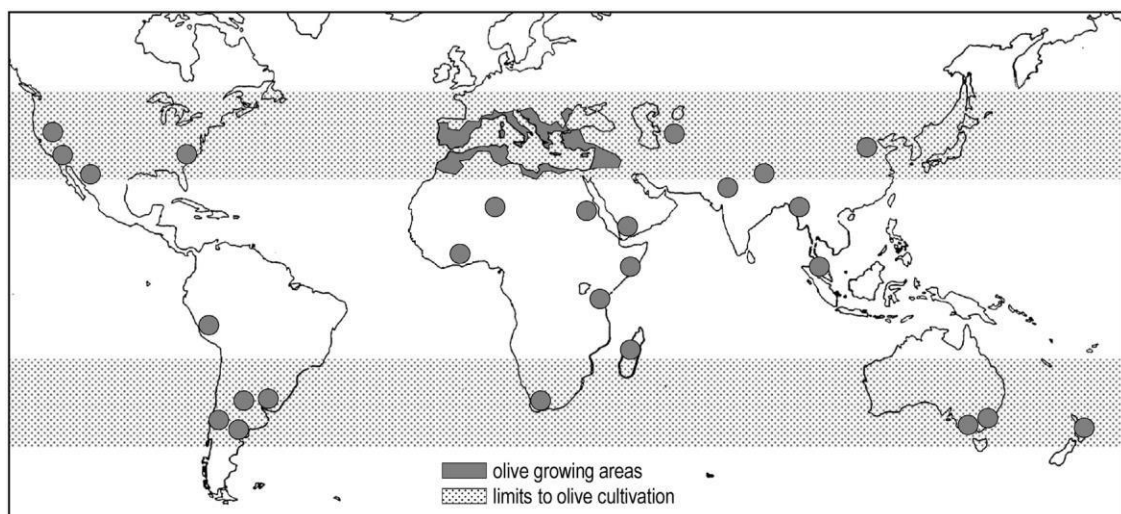


Figure 1 : Répartition mondiale des zones de production d'*Olea europaea* L. Zones oléicoles ■ et limites de culture □ (Ali et al. 2014).

II-1-3- Description botanique

Olea europaea L. est un arbre vivace, à forte longévité, possédant un aspect buissonnant et dont la taille n'excède généralement pas 10 m de hauteur à l'état âgé. Son tronc est lisse, de couleur gris-verdâtre pour les jeunes arbres, devenant crevassé et noueux avec l'âge (**Fig. 2**). Son système racinaire est très étendu, de type mixte, à la fois fasciculé et pivotant (**Pagnol, 1996**).

Il possède des feuilles simples, opposées, persistantes, faiblement pétiolées, de consistance coriace, vertes sur la face supérieure et blanchâtres sur la face inférieure, de forme ovale elliptique, souvent pointues à leur extrémité (**Fig. 2**) (**Villa, 2003 ; Rameau et al. 2008**).



Figure 2 : Planche botanique d'*Olea europaea* L. *Source* : <http://phytomag.com/olivier>

Les fleurs s'ouvrent d'avril à juin et sont monoclines, de couleur blanc lait et disposées en grappes contractées (**Fig. 2**). Le périanthe est constitué d'un calice tétramère gamosépale très réduit et d'une corolle actinomorphe, rotacée, tétramère, gamopétale à sa base, mais laissant largement voir ses quatre pétales étalés. L'androcée est formé de deux étamines dont les filets sont très courts, prenant naissance sur la base de la corolle. Le gynécée est bicarpellaire gamocarpique (**Loussert & Brousse, 1978 ; Rameau et al. 2008**).

Le fruit, l'olive, est une drupe à mésocarpe charnu, de forme sphérique, ovoïde ou allongée, verte lorsqu'elle est jeune et noire à maturité (**Fig. 2**). Il est recouvert par un péricarpe lisse,

pendant que l'endocarpe est fusiforme, assez dur protégeant l'amande. La fécondation et la nouaison du fruit se déroulent en mai, l'endocarpe se sclérifie entre juillet et août et les fruits grossissent pour atteindre leur taille normale et leur maturité vers la mi-novembre (Wallali et al. 2003 ; Rameau et al. 2008).

II-1-4- Habitat et écologie

Olea europaea L. est une espèce typique des milieux xérophiles, thermophiles et héliophiles (garrigues, matorrals, maquis, etc.) du bassin méditerranéen, aussi bien sur sol calcaire que sur sol schisteux (Rameau et al. 2008). Les caractéristiques exprimées par l'olivier vis-à-vis du climat et du sol sont résumées dans la figure ci-dessous (Fig. 3), où l'optimum écologique est échelonné par rapport aux exigences de l'espèce (Julve, 2021).

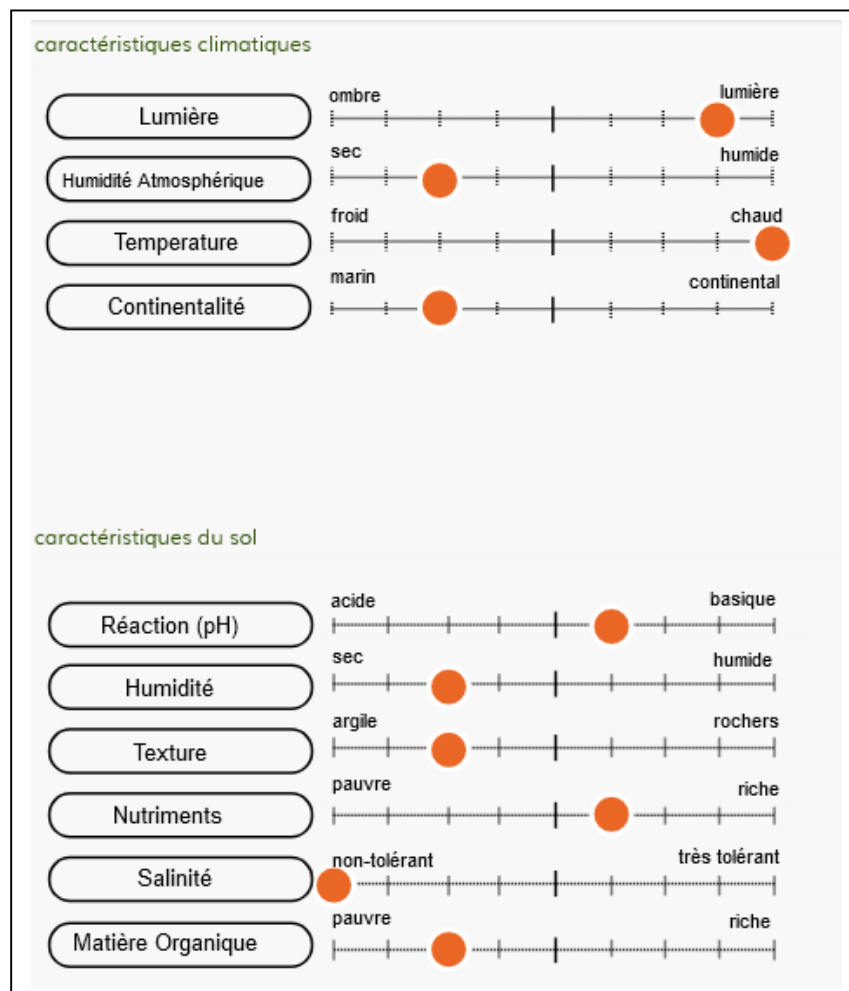


Figure 3 : Optimum écologique de l'olivier (*Olea europaea* L.) exprimé par rapport aux différentes caractéristiques du climat et du sol. *Source* : <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-mn-44593-ecologie>

II-1-5- Importance et usages

Au-delà de son importance économique, l'olivier est l'une des espèces cultivées les plus emblématiques de la région méditerranéenne. C'est une espèce d'abord appréciée pour ses fruits et son bois, puis pour son huile (**Fig. 4**).

Le fruit étant comestible et toutes ses parties contiennent de l'huile non siccative. L'olive se consomme comme condiment, elle doit être saumurée afin de se débarrasser de son amertume naturelle. On peut la déguster entière ou sous forme de tapenades, salades et autres plats. L'olive contient certaines vitamines (E et K) et elle est riche en minéraux et oligoéléments (K, Ca, P, Cu, Fe, Mn, etc.), et bien sûr, en lipides, et ce d'autant plus que l'olive est mûre. Ces lipides sont composés pour 75% d'acides gras monoinsaturés, essentiellement de l'acide oléique (**Guerrero et al. 2016 ; Özcan and Matthäus, 2017**).

Le bois de l'olivier est noble aux caractéristiques structurelles très contrastées entre des lignes brunes alliées à des stries jaunes. C'est aussi un bois lourd et très résistant, utilisé en menuiserie pour la fabrication de meubles et en travaux artisanaux (objets de décoration et ustensiles de cuisine). Il est facilement sculpté en raison de son excellent équilibre entre la forme et la couleur qu'il présente. Il est très apprécié comme bois de chauffage, brûlant même lorsqu'il est humide (**Cuneo and Leishman, 2006**).

L'huile d'olive est riche en acides gras insaturés dont 76% sont monoinsaturés (essentiellement de l'acide oléique) et 9% polyinsaturés (acide linoléique). Elle contient aussi des vitamines (E et pro-A), des stérols, des squalènes et des polyphénols. Elle est traditionnellement utilisée pour l'assaisonnement ainsi que pour la cuisson, résistant bien aux températures élevées. Néanmoins, préférentiellement consommée crue, conservant tous ses atouts bénéfiques pour la santé, puisque les acides gras polyinsaturés sont sensibles aux températures élevées. L'huile d'olive peut également être utilisée pour les soins de la peau, des ongles et des cheveux (**Şahin and Bilgin, 2017 ; Munekata et al. 2020**).



Figure 4 : Bénéfices de l'olivier (*Olea europaea* L.) en terme d'huile, d'olives de table et de bois. *Source* : <https://www.holylandmarket.com/blogs/news/olive-wood-the-history>

II-2- Biomasse foliaire de l'olivier

En plus de la production de l'huile d'olive, le processus de transformation laisse deux résidus potentiellement valorisables, l'un liquide (margines) et l'autre solide (grignons). De plus, la culture oléicole laisse des feuilles dont une partie est collectée lors de la production de l'huile d'olive (10% environ) et une autre résultant de la taille et de secouage des oliviers (25 kg de feuilles et brindilles produites par an et par arbre). C'est une matière première bon marché peut être utilisée pour rentabiliser le secteur oléicole et comme source de produits à haute valeur ajoutée (Aouidi, 2012 ; Reboredo et al. 2021).

II-2-1- Composition chimique globale des feuilles

La composition chimique des feuilles de l'olivier varie selon les variétés, les conditions climatiques, la période de prélèvement et l'âge de la plante. Néanmoins, la matière sèche avoisine globalement les 50%, dont une grande partie est représentée par des polysaccharides et des lignines (Tab. 1).

Tableau I: Composition chimique globale des feuilles de l'olivier (exprimé en g/100g) selon plusieurs auteurs cités par Aouidi (2012).

Composition (en %)	Boudhrioua et al., 2009	Erbay et Icier, 2009	Martin-Garcia et al., 2006	Garcia-Gomez et al., 2003	Fegeros et al., 1995
Eau	46,2-49,7 a	49,8 a	41,4 a	nd	44,0 a
Protéines	5,0-7,6 a	5,4 a	7,0 b	nd	nd
Lipides	1,0-1,3 a	6,5 a	3,2 b	6,2 b	nd
Minéraux	2,8-4,4 a	3,6 a	16,2 b	26,6 b	9,2 b
Carbohydrates	37,1-42,5 a	27,5 a	nd	nd	nd
Fibres brutes	nd	7,0 a	nd	nd	18,0 b
Cellulose	nd	nd	nd	19,3 b	11,4 b
Hémicellulose	nd	nd	nd	25,4 b	13,3 b
Lignin	nd	nd	nd	30,4 b	14,2 b
Polyphénols totaux	1,3-2,3 b	nd	2,5 b	nd	nd
Tannins solubles	nd	nd	nd	nd	0,3 b
Tannins condensés	nd	nd	0,8 b	nd	1,0 b

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

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

nd : valeur non déterminée

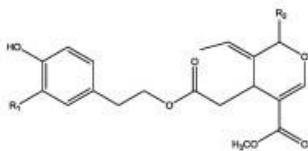
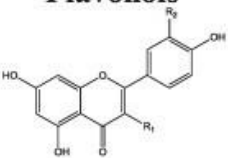
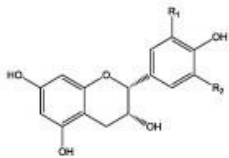
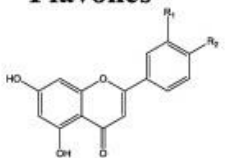
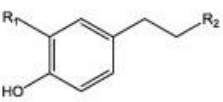
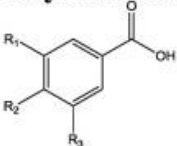
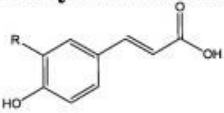
La teneur en protéines est faiblement représentée au niveau des feuilles de l'olivier. Elle varie de 5,0 à 7,6 g/100 g de matière végétale fraîche (Boudhrioua et al. 2009). Seulement, la composition en acides aminés est particulièrement diversifiée. Les plus représentés sont l'arginine (162,0 g/Kg d'azote total) et la leucine (104,0 g/Kg d'azote total) suivis de la proline (84,2 g/Kg d'azote total), de la glycine (79,6 g/Kg d'azote total), de la valine (74,8 g/Kg d'azote total) et de l'alanine (73,8 g/Kg d'azote total) (Martin-Garcia & Molina-Alcoide, 2006).

En terme de contenu minéral, c'est le fer qui est le mieux représenté avec une concentration de 273 g/Kg de matière sèche, suivi de loin par le magnésium avec 50,0 g/Kg de matière sèche (Fegeros *et al.* 1995).

II-2-2- Composition chimique particulière des feuilles

Globalement, les feuilles d'olivier sont riches en séco-iridoïdes (oleuropéside et ses dérivés, oléoside et ses dérivés et l'oléacine qui est un aldéhyde sécoiridoïque non hétérosidique) (Tab. 2). Ces feuilles sont également riches en triterpènes tels que l'acide oléanolique et l'acide maslinique. Les feuilles contiennent aussi des composés phénoliques comme les flavonoïdes (lutéoline, kaempférol, myricétine et leurs glycosides) et les acides phénols (acide caféique, acide chlorogénique, acide coumarique et verbascoside) (Tab. 2) (Sedef & Karakaya, 2009 ; Acar-Tek & Ağagündüz, 2020).

Tableau II : Structure chimique des principaux composés retrouvés au niveau des parties foliaires de l'olivier (Talhoui *et al.* 2015).

Secoiridoïds		
	Oleuropein ($R_1=OH, R_2=Glc$) Ligstroside aglycone ($R_1=H, R_2=OH$) Oleuropein aglycone ($R_1=OH, R_2=OH$)	
Flavonoids		
Flavonols	Flavanols	Flavones
		
Quercetin ($R_1=OH, R_2=OH$) Isorhamnetin ($R_1=OH, R_2=OCH_3$) Rutin ($R_1=Rut, R_2=OH$)	Catechin ($R_1=OH, R_2=H$) Gallocatechin ($R_1, R_2=OH$)	Apigenin ($R_1=H, R_2=OH$) Luteolin ($R_1, R_2=OH$)
Simple phenols		
Phenylethanoids	Hydroxybenzoic acids	Hydroxycinnamic acids
		
Tyrosol ($R_1=H, R_2=OH$) Hydroxytyrosol ($R_1, R_2=OH$)	<p><i>p</i>-hydroxybenzoic acid ($R_1, R_3=H, R_2=OH$) Gallic acid ($R_1, R_2, R_3=OH$)</p>	<p><i>p</i>-coumaric acid ($R=H$) Caffeic acid ($R=OH$) Ferulic acid ($R=OCH_3$)</p>

La teneur en composés phénoliques dans les feuilles de l'olivier varie de 2,8 mg/g de matière sèche à 44,3 mg/g de matière sèche, pouvant même dépasser 250 mg/g de matière sèche. Cette variabilité dépend non seulement de la variété considérée, des conditions climatiques, de la période de l'échantillonnage, de l'âge, mais aussi des méthodes de préparation des feuilles, des traitements et des procédés appliqués pour l'extraction de ces composés ainsi que les techniques d'analyses qualitative et quantitative adoptées (Aouidi, 2012).

A titre indicatif, les données quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait des feuilles d'olivier trouvent que l'oleuropéine est le composé majoritaire, représentant plus de 24% en terme de pourcentage d'abondance dans un extrait de feuilles d'olivier (Tab. 3).

Tableau III : Données qualitatives et quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait de feuilles de l'olivier selon Benavente-Garcia et al. (2000) cité par Aouidi (2012).

Composés phénoliques	Pourcentage d'abondance dans un extrait (%)	Activité antioxydante TEAC (mM)
Hydroxytyrosol	1.46	1.57
tyrosol	0.71	0.35
catéchine	0.04	2.28
acide caféique	0.34	1.37
acide vanilique	0.63	0.67
vanilline	0.05	0.13
rutine	0.05	2.75
luteolin-7-glucoside	1.38	0.71
verbascoside	1.11	0.02
apigénine-7-glucoside	1.37	0.42
diosmétine-7-glucoside	0.54	0.64
oleuropéine	24.54	0.88
lutéoline	0.21	2.25
diosmétine	0.05	1.42
Extrait de feuille d'olivier		1.58

L'extrait phénolique des feuilles de l'olivier est caractérisé par un pouvoir antioxydant important. Cette activité antioxydante est la résultante des synergies et antagonismes qui s'exercent entre les divers composés qui le constituent. Les flavonoïdes tels que la catéchine, la lutéoline ou encore la rutine sont les composés qui montrent un pouvoir antioxydant des plus élevés (Tab. 3) (Benavente-Garcia et al. 2009 ; Aouidi, 2012).

II-2-3- Bienfaits sur la santé humaine

En plus du pouvoir antioxydant et antimicrobien, les feuilles de l'olivier se distinguent par des effets bénéfiques sur la santé humaine grâce aux propriétés des composés chimiques qu'elles comptent (**Fig. 5**).

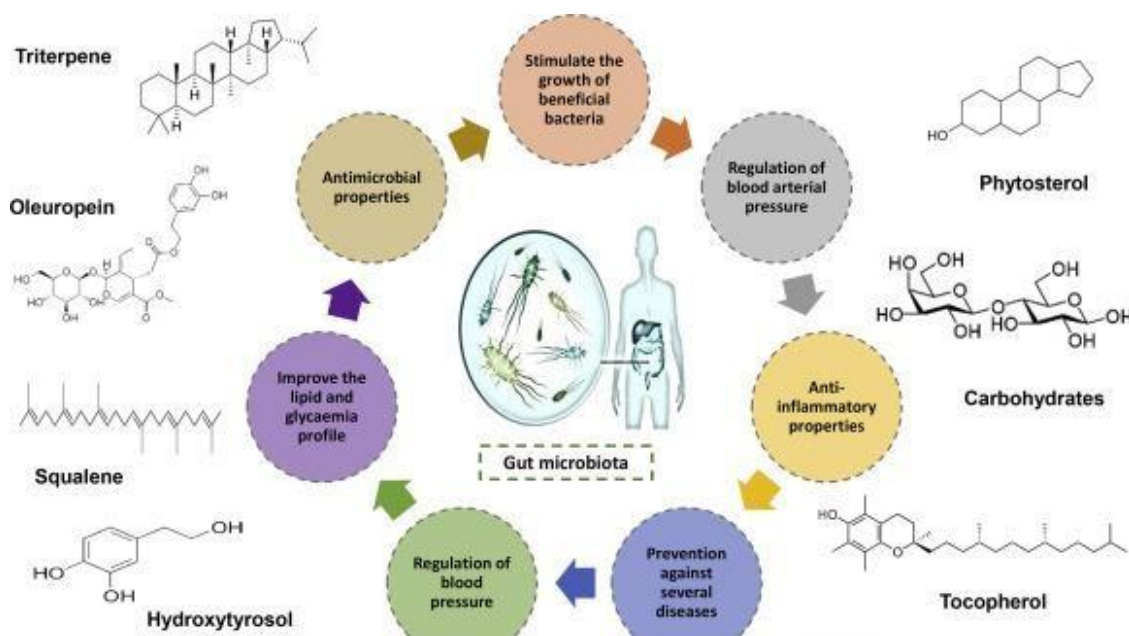


Figure 5 : Composés chimiques caractéristiques des feuilles de l'olivier et leurs effets potentiels sur la santé humaine via le microbiote intestinal (**Žugčić et al. 2019**).

Ainsi, elles possèdent une activité hypotensive confirmée. Elle est due essentiellement à l'oleuropéside qui présente un effet vasodilatateur coronarien, il augmente le débit sanguin au niveau coronarien. En plus, les produits de l'hydrolyse enzymatique des séco-iridoïdes sont responsables de l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ce qui a pour effet, une action vasodilatatrice directe au niveau périphérique.

Des effets hypoglycémiant et hypocholestérolémiant significatifs accompagnés d'une diminution du cholestérol LDL ont été attribués également à l'oleuropéside des feuilles de l'olivier. L'activité antidiabétique pourrait s'expliquer par une potentialisation de la libération d'insuline par le glucose ou bien par une augmentation du re captage du glucose au niveau périphérique. Les études cliniques ont montré qu'après un traitement au long cours par les feuilles de l'olivier, on observe une stabilisation de la tension artérielle chez des sujets présentant une hypertension modérée. Les feuilles peuvent également être utilisées comme traitement adjuvant dans les formes légères du diabète au cours de la grossesse ou en cas d'obésité (**Lee & Lee, 2010 ; Sedef & Karakaya, 2009 ; Acar-Tek & Ağagündüz, 2020**).

II-3- Possibilités de valorisation de la biomasse foliaire de l'olivier

Au vu des caractéristiques chimiques des feuilles de l'olivier et de ses usages en phytothérapie, ces feuilles ne doivent pas être déconsidérées, elles représentent plutôt une richesse qu'il faut estimer à juste raison et valoriser (Fernandez-Escobar et al. 1999).

II-3-1- Utilisation antérieure

Les feuilles d'olivier ont été utilisées exclusivement pour l'alimentation des animaux, ce qui n'a pas empêché les populations d'autrefois, romains et grecs, de soigner les infections et de prévenir les épidémies par des décoctions préparées à base du précieux feuillage. Ainsi, il a été rapporté que, pendant la guerre d'Espagne, les blessés français des armées de napoléon succombaient massivement à la gangrène, pendant que les soldats espagnols guérissaient rapidement et sans complications. Les plaies étaient traitées avec des cataplasmes de feuille d'olivier broyées avec de l'huile. Aussi, la médecine traditionnelle d'autrefois propre notamment aux pays méditerranéens a utilisé les feuilles d'olivier pour soigner entre autres la fièvre et le malaria (Fig. 6) (Fernandez-Escobar et al. 1999).

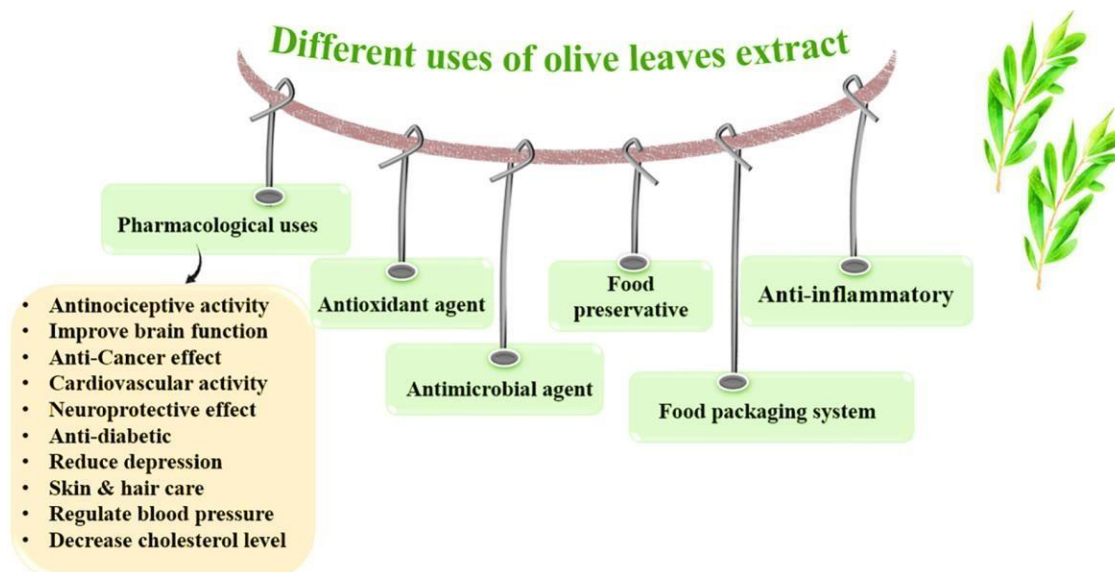


Figure 6 : Différentes applications et bénéfices des extraits de feuilles d'olivier (Selim et al. 2022).

II-3-2- Utilisation présente

Présentant une structure moléculaire complexe, dont des polyphénols, des esters et surtout l'oleuropéine, les feuilles de l'olivier se distinguent par un pouvoir stimulant du système immunitaire et une lutte efficace contre les infections, virus et parasites (Fig. 6) (Benavente-Garcia et al. 2000 ; Furneri et al. 2002 ; Gökmen et al. 2014 ; Selim et al. 2022).

Ces composés au pouvoir antioxydant ont été également préconisés contre le vieillissement. Dans ce cas, les extraits tirés des feuilles de l'olivier ont été utilisés dans l'industrie cosmétique et dans la formulation de nombreux produits d'hygiène (**Fig. 6**) (**Fernandez-Escobar et al. 1999**).

Les feuilles de l'olivier ont aussi trouvé des applications en diététique et dans l'industrie alimentaire, notamment pour ce qui est de l'amélioration de la qualité et de la conservation des aliments comme le lait, les fruits (fraises, pomme, concentré de tomate), les viandes (hachée, cubes de viande de bœuf, saucisses), les poissons (saumon, crevettes, anchois), les huiles (d'olive vierge ou raffinée, de tournesol, de soja) et l'olive de table (**Fig. 6**). Les différentes utilisations des extraits de feuilles d'olivier dans la transformation et la conservation des aliments ont été rapportés et référencés d'abord par **Aouidi et al. (2012)** puis plus récemment par **Selim et al. (2022)** dans son dernier article de revue.

Autres voies de valorisation des feuilles d'olivier ont investi le domaine de la dépollution des eaux contaminées aux métaux lourds, de la sidérurgie par inhibition de la corrosion acide de l'acier et de la synthèse biochimique par exemple de nanoparticules d'or (**Aouidi, 2012**).

II-3-3- Technologies appliquées aux feuilles de l'olivier

Dans les voies de valorisation des feuilles d'olivier, il est préconisé d'utiliser différentes technologies pour bénéficier au mieux des qualités et avantages des extraits. Les procédés physiques appliqués se résument en un séchage (au soleil, à l'air, à pression, à l'infrarouge) dont l'objectif attendu est la déshydratation pour une meilleure conservation. Le blanchiment et la pulvérisation ont été aussi appliqués aux feuilles. Un procédé d'adsorption sur fibroïne de soie a été également testé, visant à purifier depuis les feuilles de l'olivier des composés d'intérêt comme l'oleuropéine et la rutine (**Aouidi, 2012**).

Les procédés chimiques qui reposent sur une extraction qu'elle soit par liquide surchauffée, assistée par ultrasons, par fluide supercritique, par microonde, par solvants à polarité croissante, par traitements alcalins ou par hydrolyse acide visent tous le recueil des composés d'intérêt tels que, l'oleuropéine, le tocophérol, le mannitol, les flavonoïdes et les composés phénoliques à partir des feuilles d'olivier. Autre application dans ce contexte est le procédé d'encapsulation dans du β -cyclodextrin appliqué sur les extraits des feuilles d'olivier, visant la préservation de l'extrait phénolique résultant (**Aouidi, 2012**).

Les procédés biologiques concernent les traitements des feuilles d'olivier par des enzymes et/ou des microorganismes. La β -glucosidase a été utilisée sur les extraits afin de produire de l'hydroxytyrosol. Les traitements microbiens appliqués aux feuilles font intervenir la flore endogène (ensilage, compostage) ou exogène inoculée (levures champignons et bactéries lactiques) (**Aouidi, 2012**).

II-3-4- Facteurs influençant la stabilité des extraits de feuilles

Au cours de l'extraction, divers facteurs risquent d'affecter la stabilité des extraits obtenus par les divers procédés d'extraction (Fig. 7).

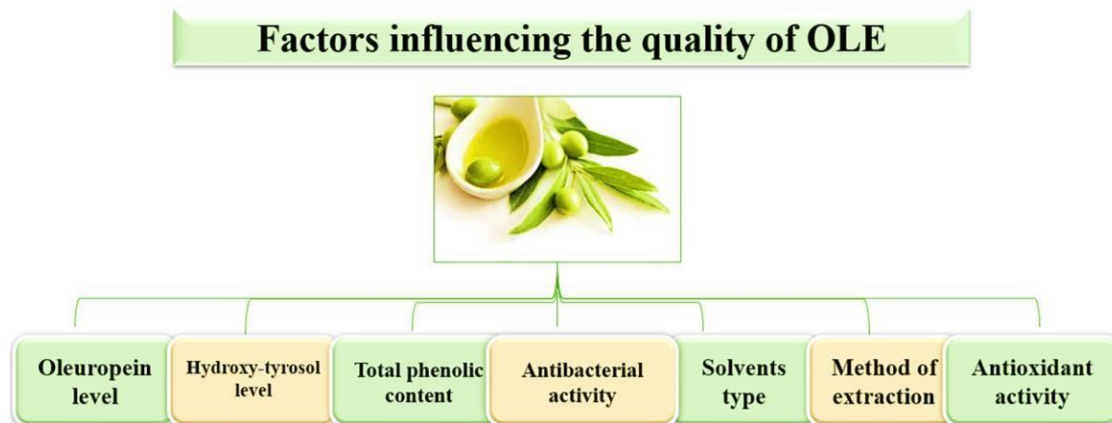


Figure 7 : Facteurs influençant la qualité des extraits de feuilles d'olivier (Selim et al. 2022).

Comme solvants pour une extraction efficace et sans risques, l'eau et l'éthanol sont les plus préconisés et les plus couramment utilisés (Moure et al. 2004).

La nature du solvant et sa concentration (éthanol / 20 - 100%), la température (de 20 à 60°C), la durée (4 - 48h) et le rapport solide/solvant (de 4 à 8) ont été considérés dans l'étude d'extraction de composés phénoliques réalisée par Bilek (2010). Il a été constaté que le temps d'extraction et le rapport solide/solvant affectent de manière significative le rendement des composés phénoliques obtenus au final. De même, Wu et al. (2020) ont étudié l'impact de la température sur l'activité antioxydante et la concentration en composés phénoliques. Ils ont optimisé la température et la concentration du solvant en préparant l'extrait de feuilles d'olivier à 20, 26, 40, 54 et 60°C, trouvant que 40°C avec l'extrait d'éthanol donnait 51 mg EAG g⁻¹, alors que 50°C avec l'extrait en méthanol donnait 56 mg EAG g⁻¹ en terme de rendement en polyphénols, alors que l'activité antioxydante était respectivement de 90 et 92%.

Pour ce qui est du facteur temps d'extraction, plusieurs études ont été réalisées pour préparer l'extrait à température ambiante ou légèrement élevée à 40°C pendant 1 à 2 jours sous agitation. Sinon, plus simplement avec de l'eau bouillante durant des temps plus courts de 10 à 30 mn (Malik & Bradford, 2008). Le rapport solide/solvant correspond généralement au poids de l'échantillon (en g) et au volume du solvant d'extraction (en mL). En recherche, des rapports de 5 à 100 sont communs et récurrents, mais les rapports entre 10 et 50 sont considérés comme les plus appropriés dans l'optique d'extraire efficacement les composés phénoliques (Stamatopoulos et al. 2013).

Le pH de la solution d'extraction est aussi crucial car il définit le niveau de solubilité des matières bioactives solubles et affecte le degré de solubilisation des composés hydrolysables. Un pH de 1,3 permet d'avoir la meilleure concentration en polyphénols. **Rodríguez-Juan et al. (2021)** obtiennent une meilleure extraction et une activité antioxydante importante en réalisant l'extraction à pH 2,0 avec 60% d'éthanol pendant 5 h. Ils remarquent en outre, qu'une augmentation du pH impacte négativement la concentration des composés bioactifs obtenus à l'issue de l'extraction.

Les extraits obtenus depuis les feuilles d'olivier doivent être stockés en conditions qui entraînent une perte minimale de l'activité des composés bioactifs et de leurs effets antioxydants. La lumière et la température sont les principaux facteurs qui touchent à l'effet antioxydant des polyphénols lors du stockage. On pourra y remédier en stockant en atmosphère inerte (faible teneur en oxygène et forte teneur en azote) en conditions d'obscurité (**Tura & Robards, 2002**).

A titre d'exemple, l'oleuropéine ne reste stable dans les extraits de méthanol et à température ambiante que durant un mois. Sa stabilité n'est que d'une semaine dans l'extrait aqueux et à température ambiante, elle est complètement dégradée après 17 jours. Il est de ce fait, fortement recommandé le stockage des extraits liquides des feuilles d'olivier à basse température et en absence de lumière, alors que les extraits de poudre peuvent être stockés en conditions ambiantes de laboratoire (**Selim et. 2022**).

***MATERIEL &
METHODES***

III- Matériel & Méthodes

III-1- Matériel

Dans ce travail, on s'est focalisé sur le dosage des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes totaux et du potentiel antioxydant des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. Les échantillons de feuilles ont été récoltés de 2 sites distincts, l'un de *Béni Maouche* et l'autre de *Seddouk*.

Le travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Bejaia.

III-1-1- Matériel végétal

III-1-1-1- Collecte des feuilles

Les feuilles d'*Olea europaea* L. ont été collectées au mois de mars de l'année 2023 au niveau de deux régions de Bejaia : de la région de *Béni Maouche*, une zone montagneuse rurale située à 100 Km au sud-ouest de la capitale provinciale de Bejaia ; et de la commune de *Seddouk*, distante de 60 Km du chef-lieu de la wilaya de Bejaia (**Fig. 8**).



Béni-Maouche

Latitude : 36.4781 - Longitude : 4.63844

36° 28' 41'' Nord - 4° 38' 18'' Est

Altitude : 1 000 m

Climat méditerranéen avec été chaud



Seddouk

Latitude : 36.5472 - Longitude : 4.68611

36° 32' 50'' Nord - 4° 41' 10'' Est

Altitude : 412 m

Climat méditerranéen avec été chaud

Figure 8 : Arbres et lieu de provenance des échantillons de feuilles d'*Olea europaea* L. collectés des régions de *Béni-Maouche* (zone montagneuse) et de *Seddouk* (zone proche d'une voie de circulation).

III-1-1-2- Traitements appliqués aux feuilles

Les feuilles d'*Olea europaea* L. collectées ont été lavées à l'eau pour éliminer les impuretés, égouttées puis étalées sur des feuilles de papier blanc afin de sécher. Ce séchage est réalisé à l'air libre et à température ambiante durant une dizaine de jours (**Fig. 9**).



Figure 9 : Collecte des feuilles d'*Olea europaea* L. et opération de séchage après lavage.

Les feuilles desséchées ont été réduites en poudre en utilisant un Blender. Les poudres obtenues sont tamisées (tamis d'une porosité $\leq 250 \mu\text{m}$) à l'aide d'un tamiseur (*Retch*, Allemagne), puis conservées au congélateur avant une éventuelle utilisation (**Fig. 10**).



Figure 10 : Poudres finement tamisée obtenue des feuilles d'*Olea europaea* L. provenant de deux régions différentes.

III-1-2- Préparation des extraits de feuilles

La procédure d'extraction (extraits de feuilles d'olivier) est une décoction réalisée sur une plaque agitatrice et chauffante (*VELP*, Italie). Elle a été restreinte en premier lieu au seul échantillon provenant de la région de *Béni-Maouche* en vue d'une optimisation des paramètres d'extraction avant de l'étendre à celui de *Seddouk*.

Trois quantités différentes de poudre (1 ; 2 et 3 g) ont été pesées (balance de précision *Radwag*, France), puis mélangées chacune à 100 mL d'eau distillée. La décoction a été réalisée pour chacune des préparations en testant 3 températures différentes (50 ; 70 et 90°C), et ce durant différents temps d'application (10 ; 20 et 30 mn) (**Fig. 11**).

Les extraits obtenus ont été centrifugés à 5000 tr/mn durant 10 mn (centrifugeuse *DT5-1C*, chine). Le surnageant récupéré est conservé dans des tubes en verre et mis au froid jusqu'à utilisation (**Fig. 11**).

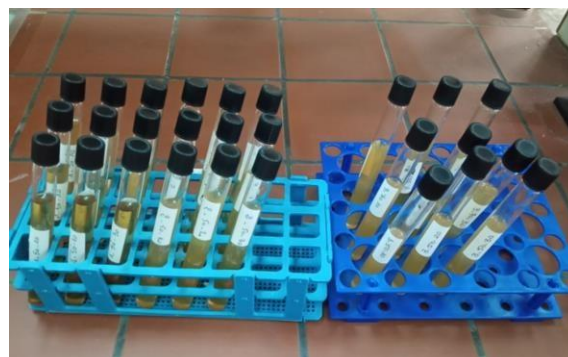
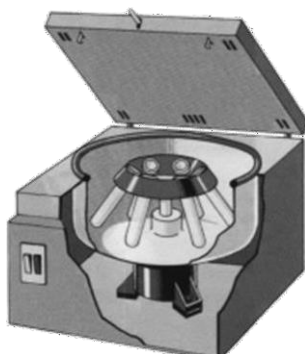
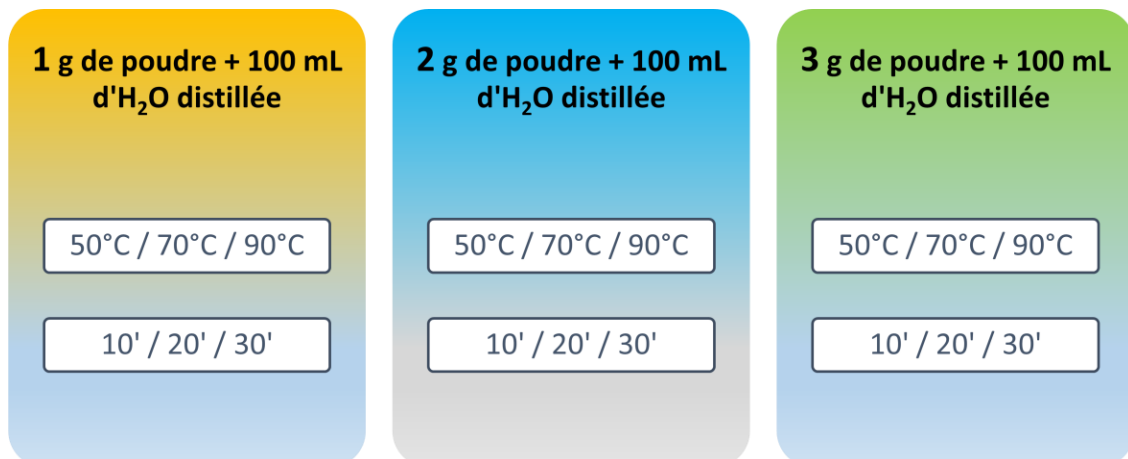


Figure 11 : Paramètres considérés (poids, température et temps d'extraction) lors de l'extraction depuis les poudres tamisées de feuilles d'olivier.

III-2- Méthodes

III-2-1- Dosage des composés phénoliques totaux

III-2-1-1- Principe

Les composés phénoliques dont les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins, sont des métabolites dits secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit par **Singleton & Rossi (1965)**.

Le réactif utilisé pour le dosage des composés phénolique totaux est formé d'acide phosphotungstique ($H_3[P(W_3O_{10})_4] \times H_2O$) auquel on rajoute de l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Cette préparation est réduite, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). Le changement de couleur obtenu, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Fig. 12**) (**Boizot & Charpentier, 2006**).

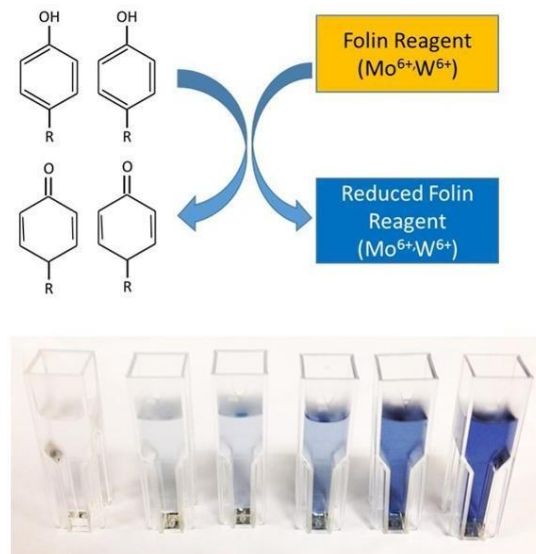


Figure 12 : Principe de dosage des polyphénols totaux dont le mécanisme de base est une réaction d'oxydation / réduction. *Source* : <https://libios.fr/solutions-analytiques/stress-oxydatif-capacite-anti-oxydante/>

III-2-1-2- Dosage proprement dit

La méthode adoptée pour le dosage des polyphénols totaux est celle de **Singleton & Rossi (1965)**, optimisée par **Zeghib et al. (2022)**.

Pour 200 µL de l'extrait de feuilles d'olivier (point de gamme d'une absorbance finale comprise entre 0,5 et 1), on rajoute 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (1N dilué à 0,1N). Après une agitation au vortex et au bout d'une incubation de 5 mn à l'obscurité et à température ambiante, sont rajoutés au mélange 0,8 mL de carbonate de sodium (Na₂CO₃ - 7,5%). L'ensemble est agité au vortex, suivi d'une seconde incubation de 5 mn réalisée cette fois-ci au bain-marie à 50°C (Raypa, Espagne). Après refroidissement, la mesure de l'absorbance s'effectue au spectrophotomètre (Biotech VIS-7220G) à une longueur d'onde de 760 nm. L'étalonnage du spectrophotomètre est réalisé par un blanc constitué de 200 µL d'eau distillée et 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu.

III-2-1-3- Gamme étalon et expression des résultats

On réalise une gamme étalon en milieu aqueux (6 points de concentrations qui vont de 0 à 25 µg.mL⁻¹ par échelle de 5 µg.mL⁻¹) avec un polyphénol témoin, l'acide gallique (C₇H₆O₅). De cette gamme, on calcule la concentration moyenne des polyphénols présents dans les extraits de feuilles d'olivier en µg EAG.mL⁻¹, qu'on convertit en mg EAG.g⁻¹ de matière sèche [(y = 9,8838 x - 0,01144) ; R² = 0,9989 ; où "y" fait référence à l'absorbance et "x" fait référence à la concentration]. Tous les résultats expriment une valeur moyenne de 5 répétitions différentes ± écart-type.

III-2-2- Dosage des flavonoïdes totaux

III-2-2-1- Principe

Les flavonoïdes représentent un sous-groupe le plus abondant des composés phénoliques. En effet, plus de la moitié des composés phénoliques identifiés sont des flavonoïdes (**Fig. 13a**).

La teneur totale en flavonoïdes des plantes est généralement déterminée par colorimétrie après extraction au solvant. L'une des méthodes les plus répandues est l'essai colorimétrique au chlorure d'aluminium, où l'Al(III) est utilisé comme agent complexant. Ce test a été proposé pour la 1^{ère} fois par **Christ & Muller (1960)** lors de la détermination des dérivés de flavonols dans des médicaments. La méthode étant basée sur la formation de chélates d'Al(III) – flavonoïdes. En raison de leurs nombreux groupements oxo et hydroxyle (**Fig. 13b**), les flavonoïdes ont une grande affinité pour lier les ions métalliques tels que l'Al(III), souvent dans un rapport 1 : 1, en fonction des conditions expérimentales, y compris la valeur du pH.

Avec le temps, la méthode originale a fait l'objet de modifications comme l'introduction du nitrite de sodium (NaNO₂) avant l'ajout d'AlCl₃. Le nitrite de sodium sert d'agent nitrant

sélectif pour les diols vicinaux aromatiques (Barnum, 1977) pour produire un dérivé flavonoïde – nitrosyle (Fig. 13c) qui se caractérise par l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption aux environs de 500 nm (Mekonnen and Desta, 2021). Comme autre modification, la complexation Al(III) – flavonoïde a été réalisée en présence d'un sel d'acétate (Shraim et al. 2021).

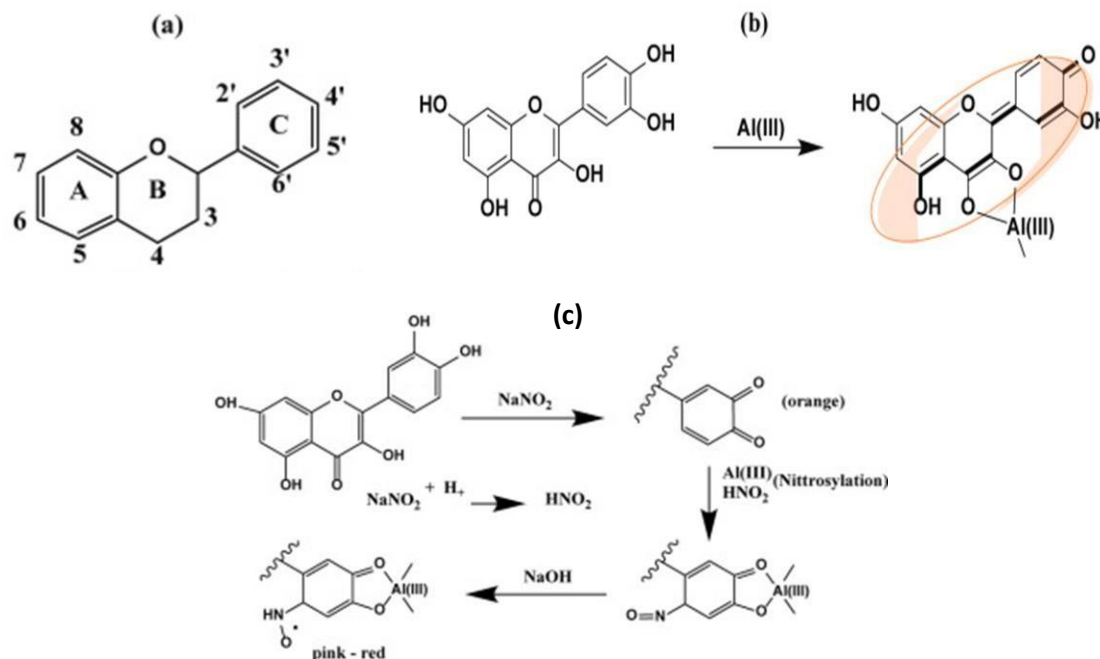


Figure 13 : Structure chimique basique des flavonoïdes (a) ; illustration de la formation d'un complexe Al(III) – Quercétine (b) ; et formation d'un complexe Al(III) – flavonoïde (quercétine pris comme exemple) en présence du NaNO₂ (c). Source : Mekonnen and Desta, 2021 ; Shraim et al. 2021).

III-2-2-2- Dosage proprement dit

Le protocole utilisé pour le dosage des flavonoïdes totaux est celui de Surana et al. (2016), légèrement modifié.

Dans un tube à hémolyse en verre, on mélange 250 µL d'extrait de feuilles d'olivier + 750 µL d'éthanol + 50 µL d'acétate de potassium (1 M dans de l'éthanol) + 50 µL de chlorure d'aluminium AlCl₃.6H₂O (10%, v/v dans H₂O) + 1,4 mL d'eau distillée (Fig. 14).

Ce mélange est vigoureusement agité puis mis à incuber durant 40 mn à l'obscurité et à température ambiante du laboratoire.

Après incubation, l'absorbance est lue au spectrophotomètre (Biotech VIS-7220G) à une longueur d'onde de 415 nm contre un blanc où le chlorure d'aluminium est remplacé par de l'eau distillée (Fig. 14).

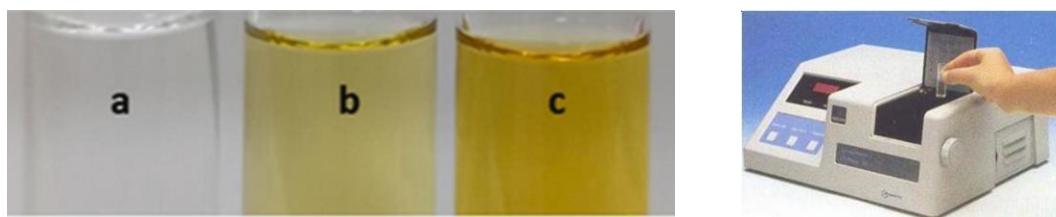


Figure 14 : Opération de quantification des flavonoïdes totaux : blanc (a) ; l'extrait de feuilles d'olivier (b) et l'extrait de feuilles d'olivier + AlCl_3 (c). Lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 415 \text{ nm}$.

III-2-2-3- Gamme étalon et expression des résultats

Afin de quantifier les flavonoïdes totaux, une courbe standard à base de différentes concentrations en quercétine ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) a été réalisée.

De cette courbe, on détermine la quantité moyenne en flavonoïdes totaux présente dans les extraits de feuilles d'olivier [$y = 4,0291 x - 0,0113$; $R^2 = 0,9991$; où "y" fait référence à l'absorbance et "x" fait référence à la concentration].

Cette quantité est exprimée en mg de quercétine équivalent pour 100 g de matière sèche et représente une valeur moyenne de 5 répétitions différentes \pm écart-type.

III-2-3- Potentiel antioxydant

De nombreux polyphénols sont des antioxydants. La mesure du potentiel antioxydant et le suivi des processus d'oxydation sont abordés globalement (1) en déterminant des produits résultants de l'oxydation ou (2) en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels.

Le premier mode nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. En effet, ces méthodes recherchent certains groupements fonctionnels (aldéhydes, cétones, dicarbonylés, etc.) dans les dérivés des constituants d'origine. Le second mode relie la quantité de radicaux piégés à celle d'antioxydant utilisé (Marc et al. 2004).

III-2-3-1- Capacité antioxydante équivalent Trolox

La capacité du produit à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber, aussi bien les phases d'initiation que de propagation (il s'agit des deux premières phases qui se déroulent lors d'un processus d'oxydation), implique la création des radicaux.

III-2-3-1-1- Principe

Dans la méthode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), l'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical $ABTS^{+\cdot}$, obtenu à partir de l'ABTS [sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox® (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique).

L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase) en présence de H_2O_2 ou d'un oxydant (dioxyde de manganèse ou persulfate de potassium).

Le radical $ABTS^{+\cdot}$, en contact avec un donneur de H^{\cdot} conduit à l' $ABTS^+$ et à la décoloration à 734 nm de la solution (**Fig. 15**). La capacité antioxydante en équivalent Trolox® (TEAC) correspond à la concentration (mmol/L ou mg/L) de Trolox® ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de substance à tester (**Marc et al. 2004**).

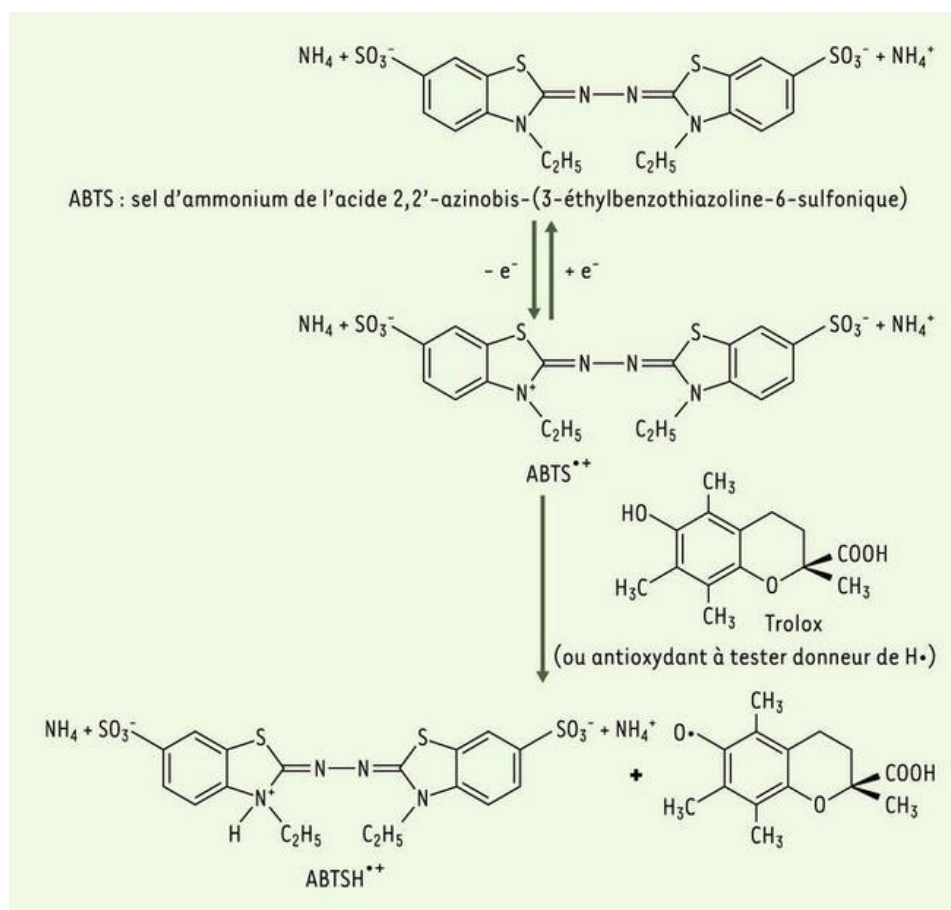


Figure 15 : Formation et piégeage du radical $ABTS^{+\cdot}$ par un antioxydant donneur de H^{\cdot} . Le radical $ABTS^{+\cdot}$ (absorbant à 734 nm) est formé par un arrachement d'un électron e^- à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H^{\cdot}), l'atome d'azote concerné piège un H^{\cdot} , conduisant à l' $ABTSH^{+\cdot}$, ce qui entraîne la décoloration de la solution (**Marc et al. 2004**).

III-2-3-1-2- Mode opératoire

Le protocole utilisé pour la mesure du TEAC est inspiré de la méthode **Miller et al. (1993)** modifié par **Re et al. (1999)**.

La veille du dosage, préparer une solution d'ABTS en éthanol à 7 mM, à laquelle on ajoute du persulfate de potassium à la concentration de 2,4 mM (10 mg dans 15,11 mL de la solution d'ABTS). On laisse développer la réaction afin de générer le radical $ABTS^{\bullet+}$ au minimum 6 h sous agitation, à température ambiante et à l'obscurité.

Le jour du dosage, la solution ABTS préparée est diluée dans de l'éthanol jusqu'à obtention d'une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. Cette solution est maintenue en bain-marie à 30°C jusqu'au dosage proprement dit.

Ce dosage s'effectue en mélangeant dans un tube à hémolyse en verre 100 μ L d'extrait de feuilles d'olivier avec 1 mL de la solution ABTS précédemment préparée (**Fig. 16**). Avant de lire l'absorbance au spectrophotomètre (*Biotech VIS-7220G*) à une longueur d'onde de 734 nm, on incube le mélange durant 7 mn de temps à l'obscurité et à température ambiante.

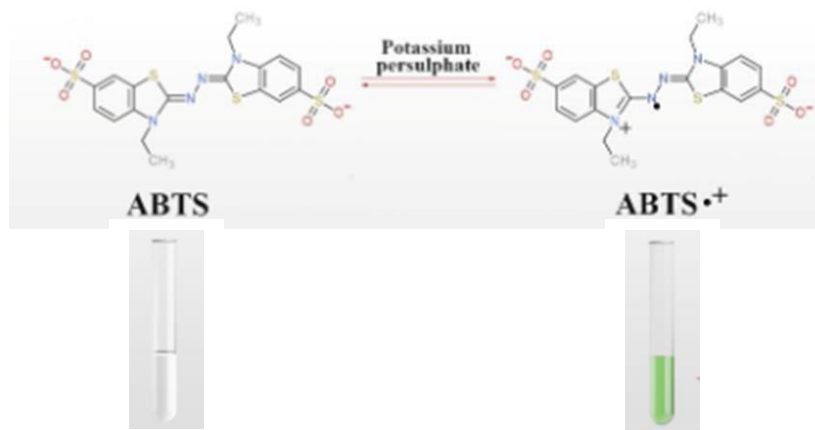


Figure 16 : Représentation schématique de la méthode de piégeage du radical ABTS (**Üstündaş et al. 2018**).

III-2-3-1-3- Gamme étalon et expression des résultats

La courbe standard pour la quantification de TEAC a été obtenue en utilisant différentes concentrations de Trolox®, préparées dans le même solvant que les extraits à quantifier.

De cette courbe, on détermine la quantité moyenne en TEAC [$y = -8,6533 x - 0,5023$; $R^2 = 0,9979$; où "y" fait référence à l'absorbance et "x" fait référence à la concentration].

Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent Trolox par 100 g de MS et représentent pour chacun des échantillons une valeur moyenne de 5 répétitions différentes \pm écart-type.

III-2-3-2- Capacité antioxydante totale par le test du phosphomolybdate

Le test du phosphomolybdate est une variante du test au DPPH (en référence au nom du réactif utilisé le 2,2-Diphenyl-1-1-PicrylHydrazyl). Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait - antioxydant) vers le complexe oxydant (phosphomolybdate). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

III-2-3-2-1- Principe

Le test du phosphomolybdate est basé sur la réduction du molybdène VI présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène V (MoO^{2+}) en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre [phosphate / Mo(V)] à un pH acide (**Fig. 17**) (**Prieto et al. 1999**).

On mesure l'augmentation de la coloration du complexe Mo(VI) en présence d'un antioxydant. A la différence des autres tests, le test du phosphomolybdate permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants susceptibles d'être présents dans l'extrait.

III-2-3-2-2- Mode opératoire

Conformément à la méthode décrite par **Prieto et al. (1999)**, le test consiste à mélanger dans un tube à hémolyse en verre 100 μL de l'extrait de feuilles de l'olivier avec 1 mL d'un réactif composé de l'acide sulfurique (0,6 M), de phosphate de sodium (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé, puis incubé à 95°C pendant 90 mn.

Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 695 nm au spectrophotomètre (*Biotech VIS-7220G*).

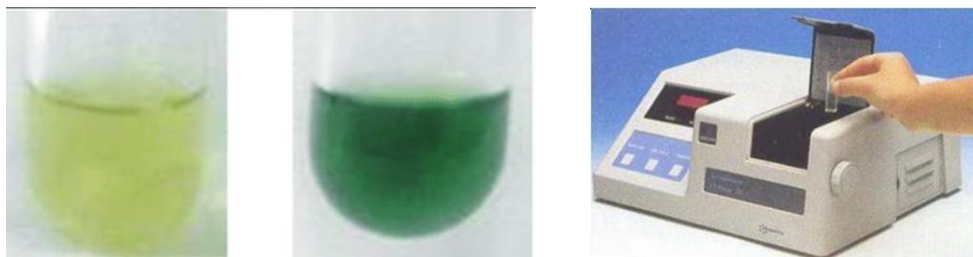


Figure 17 : Changement de couleur de l'extrait du jaune au vert après rajout du molybdate d'ammonium en milieu acide. Lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 695$ nm.

III-2-3-2-3- Gamme étalon et expression des résultats

La courbe standard pour la quantification a été obtenue en utilisant différentes concentrations d'acide ascorbique, préparées dans le même solvant que les extraits. De cette courbe, on détermine la quantité moyenne en AAE [$y = 4,2625 x - 0,0436$; $R^2 = 0,9922$; où "y" fait référence à l'absorbance et "x" fait référence à la concentration].

Les résultats ont été exprimés en mg d'AAE par 100 g de MS et représentent pour chacun des échantillons une valeur moyenne de 5 répétitions différentes \pm écart-type.

III-2-4- Analyse statistique

Pour la procédure d'extraction séquentielle, toutes les données ont été rapportées comme des moyennes de cinq répétitions \pm écart-type.

Le logiciel *Statistica 8* a été utilisé pour comparer les résultats par l'analyse de la variance (ANOVA/MANOVA) et les différences entre les moyennes ont été déterminées à l'aide du test LSD en considérant un niveau de signification à $p \leq 0,05$.

Pour l'optimisation par la méthode de la surface de réponse, la matrice expérimentale suivant le plan d'expérience de Box-Behnken a été appliquée. La construction de la matrice expérimentale prend en compte les 3 variables d'entrée indépendantes (facteurs) : la température (50 ; 70 et 90°C) ; le rapport échantillon/solvant (1 ; 2 et 3 g/100 mL) et la durée d'extraction (10 ; 20 et 30 mn). Cette construction a été établie à l'aide de JMP 10 (*Statistical Analysis System, Inc., SAS, USA*).

Les 4 variables de sortie (réponses) optimisées pour les paramètres antioxydants d'extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. sont : TPC (contenu en composés phénoliques totaux) ; TFC (contenu en flavonoïdes totaux) ; ABTS (potentiel antioxydant équivalent Trolox®) et PMA (potentiel antioxydant total par le test de phosphomolybdate).

L'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée pour vérifier l'importance des modèles, le degré d'association entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites a été vérifiée par le coefficient de détermination (R^2), tandis que le test de Student a été effectué pour vérifier la signification statistique de régression. Pour calculer plus précisément les conditions d'extraction et d'obtenir les réponses optimisées, le profileur de JMP a été utilisé.

***RESULTATS &
DISCUSSION***

IV- Résultats & Discussion

IV-1- Résultats

La partie expérimentale de ce présent travail s’est focalisée sur une méthodologie d’extraction à base d’une décoction dans de l’eau distillée. Elle a mis en jeu une combinaison de trois facteurs :

- ✚ La masse de l’échantillon notée R : R1 = 1 g ; R2 = 2 g et R3 = 3 g.
- ✚ La température de la décoction notée T : T50 = 50°C ; T70 = 70°C et T90 = 90°C.
- ✚ Le temps de la décoction noté t : t10 = 10 mn ; t20 = 20 mn et t30 = 30 mn.

Cette combinaison a été appliquée au seul échantillon provenant de la région de *Béni-Maouche* en vue d’une optimisation de l’extraction, avant de l’étendre à l’échantillon de *Seddouk* pour une finalité de comparaison entre une provenance hypothétiquement saine (*Béni-Maouche*) et une provenance hypothétiquement risquée ou polluée (*Seddouk*).

IV-1-1- Principaux enseignements tirés des analyses statistiques

L’optimisation de l’extraction depuis les feuilles d’*Olea europaea* L. séchées puis réduites en poudre s’est basée méthodiquement sur l’incidence de la décoction sur d’abord la maximisation de l’extraction des composés phénoliques totaux (TPC), puis sur le potentiel antioxydant équivalent Trolox® exprimé via l’ABTS.

IV-1-1-1- Contenu total en composés phénoliques

Les résultats obtenus du dosage des composés phénoliques totaux issus des extraits de feuilles d’*O. europaea* L. sont consignés dans le tableau ci-dessous (**Tab. 4**).

Tableau IV: Contenu total en composés phénoliques (TPC – mg équivalent d’acide gallique / 1 g de matière végétale sèche) obtenu des différentes modalités d’extraction (extraits) alignés par ordre croissant et analysés statistiquement via le logiciel *Statistica 8.1*.

Extraits	TPC	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14
R3T70t20	164,98	****													
R3T70t10	169,73	****	****												
R3T90t10	175,48		****	****											
R1T50t20	182,19			****	****										
R1T50t10	189,14				****	****									
R2T50t10	192,78					****									
R2T50t30	203,66						****								

Suite du **Tab. IV** :

Extraits	TPC	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14
R2T70t30	209,58						****	****							
R3T90t20	217,57							****							
R2T50t20	217,98							****							
R3T70t30	229,23								****						
R1T70t10	229,26								****						
R2T70t10	230,54								****						
R1T50t30	230,99								****						
R1T70t30	235,26								****						
R1T90t10	246,08									****					
R2T90t10	249,74									****					
R3T50t20	280,72										****				
R3T50t30	280,99										****				
R3T50t10	289,92										****	****			
R3T90t30	294,57											****			
R2T70t20	298,86											****			
R1T70t20	313,50												****		
R1T90t20	352,78													****	
R2T90t20	358,62													****	
R2T90t30	361,58													****	
R1T90t30	386,08														****

De ces résultats, de l'analyse effectuée sur le contenu en composés phénoliques totaux obtenus des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L., il ressort que le meilleur contenu moyen (386,08 mg équivalent d'acide gallique / g de matière végétale sèche) est obtenu pour l'extrait de feuille présentant le ratio de 1g, traité par une température de 90°C durant un temps de 30 mn (**Tab. 4**).

IV-1-1-2- Potentiel antioxydant équivalent Trolox® via l'ABTS

L'activité antioxydante totale de l'extrait de feuilles d'olivier a été mesurée par la méthode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) via l'ABTS. Elle a fait autant que les polyphénols totaux l'objet d'une analyse statistique. Elle a été rapportée en mg équivalent Trolox par g de matière sèche (**Tab. 5**).

Tableau V : Activité antioxydante totale de l'extrait de feuilles d'olivier (ABTS – mg équivalent Trolox / 1 g de matière végétale sèche) obtenu des différentes modalités d'extraction (extraits) alignés par ordre croissant et analysés statistiquement via le logiciel *Statistica 8.1*.

Extraits	ABTS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
R3T50t20	66,00	*																		
R3T50t10	68,16	*																		
R3T50t30	87,84		*																	
R2T70t20	97,60		*	*																
R2T90t20	107,70			*	*															
R1T50t30	112,35				*	*														
R3T70t10	118,25					*	*													
R3T70t20	120,87					*	*													
R2T70t30	124,10						*	*												
R3T70t30	126,93						*	*												
R2T90t10	127,30						*	*												
R2T50t30	134,20							*	*											
R2T90t30	138,30								*	*										
R2T50t20	147,60									*	*									
R2T50t10	149,60										*									
R1T50t20	155,60										*	*								
R2T70t10	156,80										*	*								
R1T50t10	161,10											*								
R3T90t30	177,10												*							
R3T90t10	188,80													*						
R3T90t20	202,20														*					
R1T90t30	219,20															*				
R1T90t20	244,48																*			
R1T70t30	293,92																	*		
R1T70t20	294,24																		*	
R1T70t10	308,64																			*
R1T90t10	338,40																			*

Selon les résultats obtenus, on remarque que l'optimum dans le test effectué à l'ABTS est moyennement de 338,40 mg équivalent Trolox / g de matière végétale sèche. Ce chiffre est valable pour l'extrait de feuille présentant le ratio de 1g, traité par une température de 90°C durant un temps de 10 mn (**Tab. 5**).

Globalement, les résultats obtenus pour le contenu en composés phénoliques totaux (386,08 mg équivalent d'acide gallique / g de matière végétale sèche) et pour le test effectué à l'ABTS (338,40 mg équivalent Trolox / g de matière végétale sèche) se rejoignent pour l'extrait de feuilles d'olivier présentant un ratio de 1 g/100 mL et une température de décoction de 90°C. La différence réside dans le temps appliqué, étant de 30 mn pour les composés phénoliques totaux, de 10 mn pour le test ABTS.

IV-1-2- Principaux enseignements tirés des modèles mathématiques

L'effet des facteurs ratio, température et temps sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques totaux associée au pouvoir antioxydant exprimé via l'ABTS ont été analysés conjointement selon différents aspects d'étude.

IV-1-2-1- Corrélations

Dans cette perspective, nous avons été amenés à effectuer une corrélation entre ces tests avec 3 coefficients de corrélation ($p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$) afin d'exprimer la notion de la liaison linéaire entre contenu en composés phénoliques totaux (TPC) et potentiel antioxydant via l'ABTS (**Tab. 6**).

Tableau VI : Corrélation TPC – ABTS ($p < 0,001$; $N = 135$; *** très hautement significatif).

	TPC	ABTS
TPC	/	0,07***
ABTS	0,07***	/

De ce tableau et avec le coefficient $p < 0,001$, il y a lieu de noter que la relation entre ces tests est très hautement significative et que la teneur en polyphénols totaux est étroitement liée à l'activité antioxydante mesurée par la méthode ABTS. D'autres facteurs sont néanmoins susceptibles d'influencer cette activité comme la composition spécifique des polyphénols.

IV-1-2-2- Régression polynomiale

La régression polynomiale est une approche statistique qui est employée pour modéliser une relation de forme non-linéaire entre la réponse (y) et la ou les variables explicatives. Pour prendre en charge cette forme non-linéaire entre y et x, ces modèles de régression intègrent des polynômes dans leurs équations.

Les modèles polynomiaux le plus utilisés sont ceux de degré 2 (quadratique), et plus rarement de degré 3 (cubique), c'est-à-dire de la forme :

$$y = \alpha + \beta_1x + \beta_2x + \varepsilon \quad \text{et} \quad y = \alpha + \beta_1x + \beta_2x^2 + \beta_3x^2\varepsilon$$

A noter que la régression linéaire est une régression polynomiale de degré 1. La régression polynomiale de degré 2, permet de modéliser des relations de formes diverses.

La mise en application du modèle mathématique qui régit l'extraction des composés phénoliques totaux (TPC) et la capacité antioxydante équivalent Trolox (ABTS) sont représentées par les équations suivantes :

TPC =	300,49591-13,08972*X1+38,063469*X2+24,528625*X3+X1*(X2*-54,66331)+X1*(X3*11,03225)+X2*(X3*23,875)+X1*(X1*-39,9273)+X3*(X3*-42,39424)
ABTS =	98,770917-41,19231*X1+28,346313*X2+18,796688* X3+X1*(X3*-31,86413)+X1*(X1*53,110604)+X3*(X3*22,670729)

L'analyse des résultats obtenus montre que les paramètres testés présentent différents effets sur les teneurs en polyphénols (**Tab. VII**) et l'activité antioxydante via l'ABTS (**Tab. VIII**).

Tableau VII : Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré descomposés phénoliques totaux (TPC) (* Valeur significative à $p \leq 0,05$).

Terme	Estimation	Erreur stand.	Rapport t	Prob. > t
Constante	300,49592	3,824282	78,58	< 0,0001*
Linéaire				
Ratio	-13,08972	2,341885	-5,59	< 0,0001*
Température	38,063469	2,341885	16,25	< 0,0001*
Temps	24,528625	2,341885	10,47	< 0,0001*
Interaction				
Ratio*Température	-54,66331	3,311926	-16,50	< 0,0001*
Ratio*Temps	11,03225	3,311926	3,33	< 0,0016*
Température*Temps	23,875	3,311926	7,21	< 0,0001*
Quadratique				
Ratio*Ratio	-39,9273	3,447162	-11,58	< 0,0001*
Température*Température	-5,047677	3,447162	-1,46	< 0,1494*
Temps*Temps	-42,39424	3,447162	-12,30	< 0,0001*

Effet linéaire : les facteurs qui influencent d'une manière hautement significative sur l'extraction des composés phénoliques par la décoction sont les rapports ratio, température et temps par la valeur de $P = 0,0001$ (Tab. VII).

Effet interaction : tous les effets d'interaction sont significatifs avec des probabilités $P = 0,0001$ pour ratio*température et température*temps et $P = 0,0016$ pour ratio*temps (Tab. VII).

Effet quadratique : les deux quadratiques ratio*ratio et temps*temps sont significatifs à des valeurs de $P = 0,0001$; le quadratique température *température n'est pas significatif (Tab. VII).

Tableau VIII : Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré de la méthode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) via l'ABTS.

Terme	Estimation	Erreur stand.	Rapport t	Prob. > t
Constante	98,770917	9,159692	10,78	< 0,0001*
Linéaire				
Ratio	-41,19231	5,609143	-7,34	< 0,0001*
Température	28,346313	5,609143	5,05	< 0,0001*
Temps	18,796688	5,609143	3,35	< 0,0015*
Interaction				
Ratio*Température	11,555375	7,932526	1,46	< 0,1514*
Ratio*Temps	-31,86413	7,932526	-4,02	< 0,0002*
Température*Temps	6,1875	7,932526	0,78	< 0,4391*
Quadratique				
Ratio*Ratio	53,110604	8,256435	6,43	< 0,0001*
Température*Température	14,349854	8,256435	1,74	< 0,0884*
Temps*Temps	22,670729	8,256435	2,75	< 0,0084*

* Valeur significative à $p \leq 0,05$

Effet linéaire : les facteurs qui ont un impact significatif sur la capacité antioxydante équivalente du Trolox d'extraction de la décoction sont le rapport ratio, la température et le temps (Tab. VIII).

Effet interaction : le seul paramètre interaction qui a une influence hautement significative sur l'activité antioxydante ABTS est ratio*temps avec $P = 0,0002$ (Tab. VIII).

Effet quadratique : les deux quadratiques ratio*ratio et temps*temps sont très significatifs à des valeurs de $P = 0,0001$ et $0,0084$ respectivement ; le quadratique température*température n'est pas significatif (Tab. VIII).

IV-1-2-3- Analyse de la variance – Coefficient de régression R^2

Par ailleurs, l'analyse des résultats de la variance des facteurs affectant la teneur en composés phénoliques totaux et la capacité ABTS sont résumés ainsi (Tab. IX).

Tableau IX : Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur le contenu total en composés phénoliques (TPC) et l'activité antioxydante ABTS.

Partie analysée	Variabes	R^2	R^2 ajusté	Prob. > F
Feuilles	TPC	0,952639	0,944113	< 0,0001*
	ABTS	0,758718	0,715287	< 0,0001*

* Valeur significative à $p \leq 0,05$

L'efficacité globale de l'ajustement est exprimée par le coefficient de régression R^2 . Ce R^2 est le coefficient de détermination. C'est un indicateur utilisé pour juger de la qualité d'une régression linéaire. Il mesure l'adéquation entre le modèle et les données observées ou encore à quel point l'équation de régression est adaptée pour décrire la distribution des points.

Ce coefficient de détermination étant compris entre 0 et 1, et croît avec l'adéquation de la régression au modèle :

- ✚ Si le R^2 est proche de zéro, alors la droite de régression colle de 0% avec l'ensemble des points donnés. Autrement, cela signifie que le modèle mathématique utilisé n'explique absolument pas la distribution des points ;
- ✚ Si le R^2 d'un modèle est de 0,50, alors la moitié de la variation observée dans le modèle calculé peut être expliquée par les points ;
- ✚ Si le R^2 se situe entre 0,85 et 1, alors la régression détermine un taux très élevé de la distribution des points.

En bref, plus le coefficient de détermination se rapproche de 0, plus le nuage de points se disperse autour de la droite de régression. Au contraire, plus le R^2 tend vers 1, plus le nuage

de points se resserre autour de la droite de régression. Quand les points sont exactement alignés sur la droite de régression, alors $R^2 = 1$.

Dans cette présente étude, la valeur de R^2 est de 0,952 pour le TPC et 0,758 pour l'ABTS, respectivement de 0,944 et 0,715 aux R^2 ajustés (**Tab. IX**). Dans l'ensemble, on estime que les facteurs affectant le contenu en composés phénoliques et la capacité antioxydante équivalente Trolox des extraits obtenus par décoction sont satisfaisantes ($P < 0,0001$).

IV-1-2-4- Plan de surface de réponse – Plan de Box-Behnken

Un plan de surface de réponse est un ensemble de techniques de plan d'expériences qui vont nous permettre de mieux comprendre et d'optimiser une réponse. **Box & Behnken (1960)** ont introduit un type différent de plans d'expériences pour les modèles du deuxième ordre qui permettent l'estimation de certaines interactions. Ces plans pour 3 facteurs impliquent trois blocs, dans chacun, un plan factoriel 2^2 qui est représenté par chaque paire de traitement pendant que le troisième facteur reste fixé à 0.

En clair, le plan de Box-Behnken de trois facteurs possède 15 essais (12 arêtes et 3 points au centre – **Fig. 18**). Il nécessite 3 niveaux pour chacun des facteurs considérés afin d'assurer la condition d'orthogonalité ; possède la propriété de séquentialité et les erreurs de prédiction sur les réponses calculées sont plus faibles que les erreurs expérimentales.

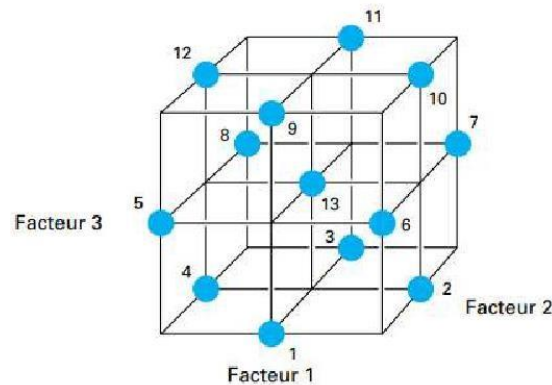


Figure 18 : Représentation schématisée du plan de Box-Behnken pour trois facteurs.

Afin de donner une meilleure compréhension de l'interaction entre les facteurs, le diagramme de surface de réponse 3D a été construit (**Fig. 19**). Les résultats illustrés en **Fig. 19a**, montrent que le contenu en composés phénoliques augmente à chaque fois que l'on augmente la température et en diminuant le ratio. Les résultats exprimés dans la **Fig. 19b** indiquent que lorsque le ratio augmente, le contenu en composés phénoliques diminue pendant qu'un temps d'application qui augmente favorise une élévation du contenu en composés phénoliques totaux.

Enfin, les résultats exprimés dans la **Fig. 19c** montrent qu'une augmentation de la température ainsi que du temps d'application assurent une élévation du contenu en composés phénoliques totaux.

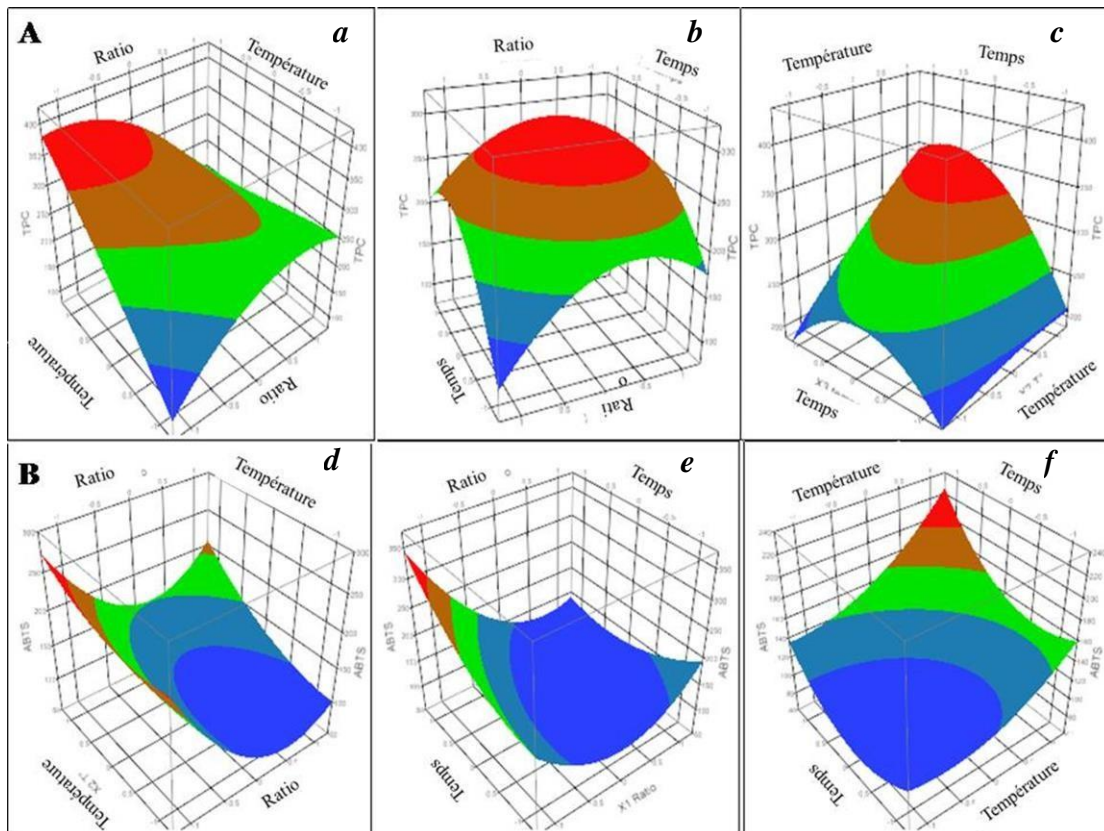


Figure 19 : Diagrammes de surface de réponse montrant les effets du ratio (en g), de la température (en °C) et du temps d'application (en mn) sur l'extraction des composés phénolique (en **A**) et l'ABTS (en **B**) à partir des feuilles d'*Olea europaea* L.

Pour ce qui est de la représentation en **B** concernant l'activité antioxydante totale de l'extrait de feuilles d'olivier qui a été mesurée par la méthode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) via l'ABTS, il a été remarqué une augmentation de la capacité ABTS avec une augmentation de la température, par contre une augmentation du ratio ne fait que diminuer cette capacité (**Fig. 19d**). D'autre part, la capacité ABTS augmente avec l'augmentation du temps (**Fig. 19e**) et de la température (**Fig. 19f**).

Les conditions optimales pour l'extraction des polyphénols totaux et ABTS par la méthode de décoction ont été déduites depuis les équations de régression de la méthodologie de surface de réponse (modèle mathématique du plan Box-Behnken), qui sont représentés dans la figure suivante (**Fig. 20**) et qui montre le profileur de prédiction pour les conditions expérimentées : ratio (X1), température (X2) et temps (X3).

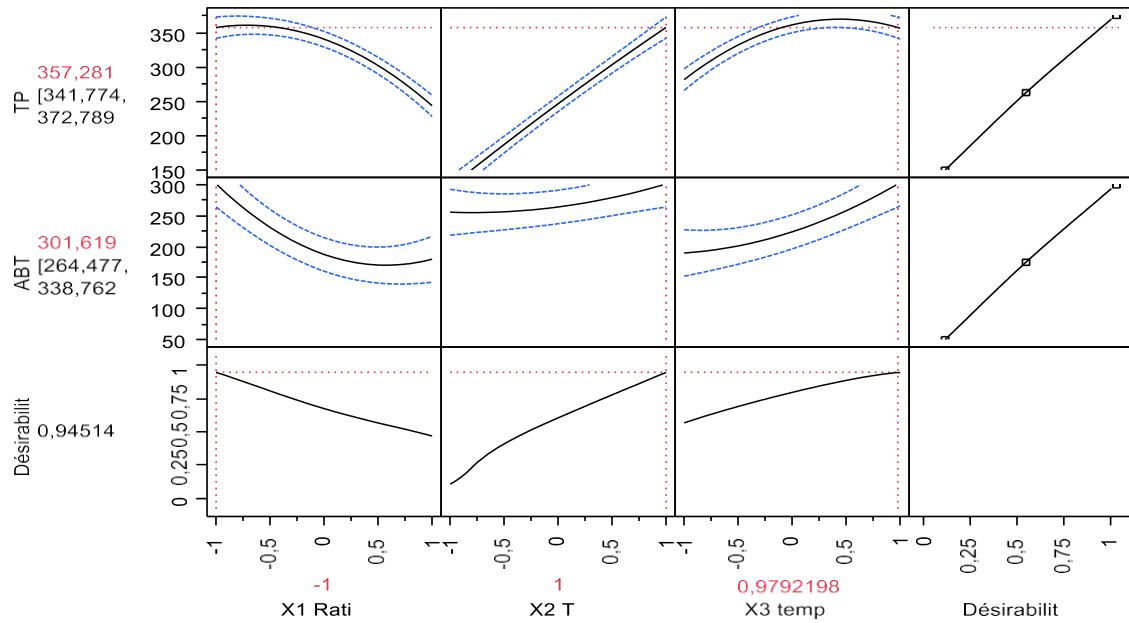


Figure 20 : Profileur de prédiction pour les conditions optimums obtenues pour l'extraction des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant depuis les feuilles d'*Olea europaea* L. par la méthode de décoction.

Après avoir déterminé l'optimum des conditions et prédit la ou les réponses dans de tels conditions, il a été déduit que le ratio de 1 g/100 mL, la température la plus élevée de 90°C et le temps de 30 mn sont préconisés pour une extraction la meilleure et la plus efficace des polyphénols dans leur totalité combinée au pouvoir antioxydant via l'ABTS.

IV-1-3- Opération de quantification

La combinaison ratio (1g/mL) / température (90°C) / temps (30 mn) ainsi optimisée pour les extraits de feuilles de l'olivier tirés des seuls échantillons provenant de la région de *Béni-Maouche*, a été appliquée pour le second échantillon provenant de la région de *Seddouk*. Hypothétiquement, la provenance du premier est supposée saine provenant d'une région qui échappe aux contraintes de la pollution, pendant que le second échantillon est récolté d'un endroit mitoyen au bord de la route, assez fréquenté par les véhicules et donc supposé potentiellement lié au risque de la pollution.

L'opération de quantification a touché deux aspects, l'un relatif aux dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux ; l'autre relatif au pouvoir antioxydant via la méthode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) et le test impliquant l'utilisation du phosphomolybdate.

IV-1-3-1- Contenu total en composés phénoliques

Le réactif de Folin-Ciocalteu est utilisé pour déterminer le contenu total en composés phénoliques. Il est constitué d'acide phosphotungstique ($H_3[P(W_3O_{10})_4] \times H_2O$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

Le contenu en polyphénols totaux est estimé par voie spectrophotométrique (absorbance λ lue à 760 nm) avec équation de régression linéaire utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique tracée ($y = 4,720x + 0,044$) avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,987$.

La gamme de concentration d'acide gallique utilisée pour le dosage des polyphénols et les absorbances respectives lues au spectrophotomètre sont rapportées dans le tableau ci-dessous (**Tab. 10**). La courbe étalon tracée est rapportée dans la **figure 21**.

Tableau X : Absorbances lues au spectrophotomètre par rapport aux concentrations d'acide gallique utilisées.

Concentration de l'acide gallique (mg/mL)				
0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Absorbance lue à 760 nm				
0,232	0,521	0,778	1,041	1,263

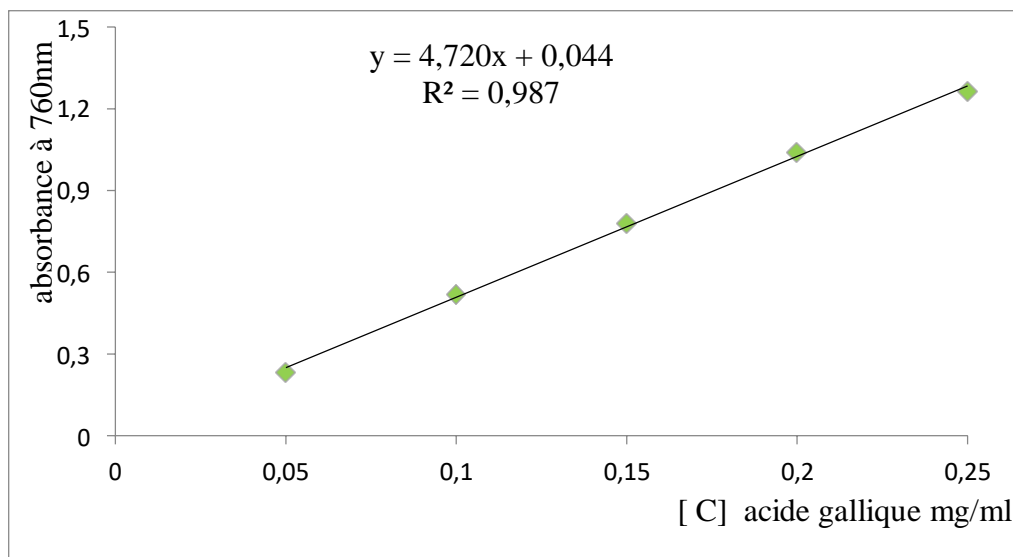


Figure 21 : Courbe étalon réalisée à l'aide de différentes concentrations en acide gallique (densité optique lue à $\lambda = 760$ nm) qui servira au dosage des polyphénols totaux.

Les dosages du total en composés phénoliques effectués sur les extraits de feuilles d'olivier rapportés de 2 provenances différentes a été présenté ci-dessous (**Fig. 22**).



Figure 22 : Effets de la provenance sur le contenu total en composés phénoliques (TPC) des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. L'échantillon provenant de la région de *Beni-Maouche* est hypothétiquement considéré comme sain, celui de *Seddouk* est supposé pollué. Les résultats ont été rapportés en mg d'équivalent en acide gallique / g de matière végétale sèche (mg EAG/g MS) et représentent une valeur moyenne de 5 essais différents \pm écart-type.

L'extrait de feuilles provenant des hauteurs de la région de *Béni-Maouche*, après réduction en poudre et traitement par décoction selon les paramètres précédemment optimisés, présente une quantité moyenne en composés phénolique totaux de 383,586 mg d'équivalent en acide gallique / g de matière sèche. Cette quantité est supérieure à celle dosée dans l'extrait de feuilles provenant de la région de *Seddouk* (336,886 mg d'AGE / g de MS).

En effet, l'estimation a priori de cette quantité dosée montre que l'échantillon de *Béni-Maouche* compte un total en composés phénoliques de 12,17% plus élevé que celui de *Seddouk*.

IV-1-3-2- Contenu total en flavonoïdes

L'essai colorimétrique au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) est le plus répandu pour quantifier les flavonoïdes totaux des plantes après extraction au préalable au solvant. Les nombreux groupements oxo et hydroxyles qui caractérisent ces flavonoïdes, leur procure une grande affinité pour lier les ions métallique d' $Al(III)$, formant des complexes ou des chélates d' $Al(III)$ -flavonoïdes.

L'utilisation du nitrite de sodium (NaNO_2) avant l'ajout du AlCl_3 assure la sélection des diols (composé organique portant 2 groupes $-\text{OH}$) vicinaux (lorsque les 2 groupes $-\text{OH}$ sont attachés à des atomes de C adjacents) aromatiques, en produisant un dérivé flavonoïde – nitrosyle, caractérisable par l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption aux environs de 500 nm (Mekonnen and Desta, 2021).

Le contenu en flavonoïdes totaux est estimé par voie spectrophotométrique (absorbance λ lue à 415 nm) selon ce qui a été décrit par Zeghibib et al. (2021), avec équation de régression linéaire utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine tracée ($y = 2,278x + 0,051$) pour un coefficient de corrélation $R^2 = 0,992$.

La gamme de concentration de quercétine utilisée pour le dosage des flavonoïdes et les absorbances respectives lues au spectrophotomètre sont rapportées dans le tableau ci-dessous (Tab. XI). La courbe étalon tracée est rapportée dans la figure 23.

Tableau XI : Absorbances lues au spectrophotomètre par rapport aux concentrations de quercétine utilisées.

Concentration de quercétine (mg/mL)				
0	0,025	0,05	0,10	0,125
Absorbance lue à 415 nm				
Blanc	0,104	0,166	0,291	0,326

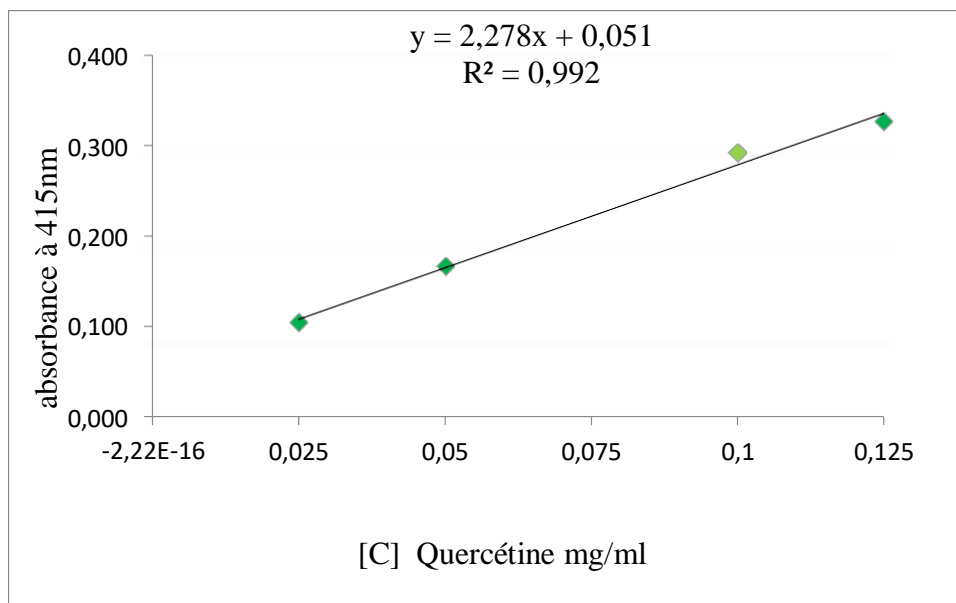


Figure 23 : Courbe étalon réalisée à l'aide de différentes concentrations en quercétine (densité optique lue à $\lambda = 415$ nm) qui servira au dosage des flavonoïdes totaux.

Les calculs effectués pour déterminer le contenu total en flavonoïdes des deux extraits de feuilles d'olivier rapportés de 2 provenances différentes a été présenté ci-dessous (**Fig. 24**).

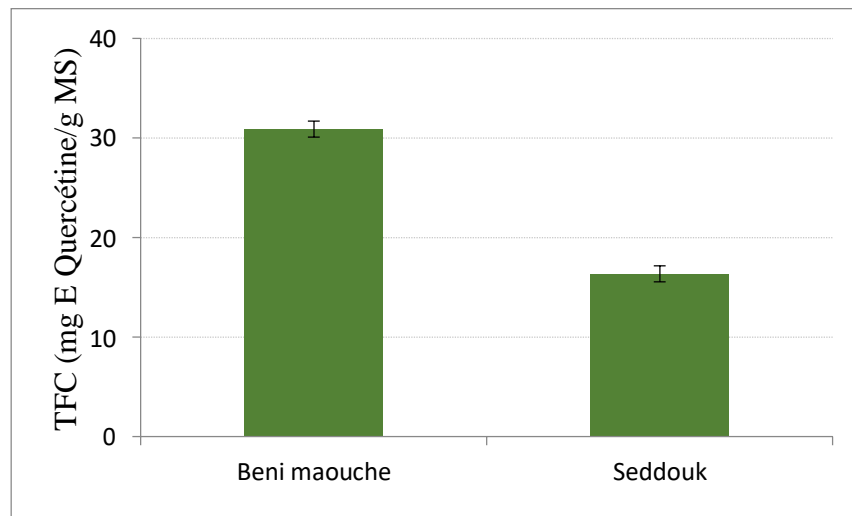


Figure 24 : Effets de la provenance sur le contenu total en flavonoïdes (TFC) des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. L'échantillon provenant de la région de *Béni-Maouche* est hypothétiquement considéré comme sain, celui de *Seddouk* est supposé pollué. Les résultats ont été rapportés en mg d'équivalent en quercétine / g de matière végétale sèche (mg E quercétine/g MS) et représentent une valeur moyenne de 5 essais différents \pm écart-type.

En quantifiant les flavonoïdes totaux obtenus depuis les extraits de feuilles d'olivier, il a été déterminé que l'échantillon récolté depuis les hauteurs de *Béni-Maouche*, après décoction et au vu de la méthode d'optimisation, exhibe une quantité moyenne en flavonoïdes totaux de 30,89 mg d'équivalent en quercétine / g de matière sèche. Cette quantité est près de deux fois supérieure à celle exhibée, dans le même contexte de décoction, par l'extrait de feuilles provenant de la région de *Seddouk* (16,38 mg d'équivalent quercétine / g de MS). En effet, l'estimation en pourcentage de la quantité dosée montre que l'échantillon de *Béni-Maouche* compte un total en flavonoïdes de 46,97% plus élevé que celui de *Seddouk*.

IV-1-3-3- Capacité antioxydante équivalent Trolox®

L'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical $ABTS^{\bullet+}$, lui-même obtenu à partir de l'ABTS, par comparaison à un antioxydant de référence : le Trolox®.

Le radical $ABTS^{\bullet+}$, absorbant à 734 nm, est formé par un arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS. En présence du Trolox® (ou d'antioxydant donneur de H[•]), l'atome d'azote concerné piège un H[•], conduisant à l' $ABTS^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution (Marc et al. 2004).

La méthode utilisée pour mesurer cette capacité antioxydante équivalent Trolox® est celle de Miller et al. (1993) modifiée par Re et al. (1998). Elle a été déterminée par voie spectrophotométrique (absorbance λ lue à 734 nm) en utilisant l'équation $y = -5,886 x + 0,425$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,997$.

La gamme de concentration de Trolox® utilisée pour une telle quantification ainsi que les absorbances respectives lues au spectrophotomètre sont rapportées dans le tableau ci-dessous (Tab. XII). La courbe étalon tracée est rapportée dans la figure 25.

Tableau XII : Absorbances lues au spectrophotomètre par rapport aux concentrations de Trolox® utilisées.

Concentration de Trolox® (mg/mL)						
0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
Absorbance lue à 734 nm						
0,429	0,370	0,303	0,247	0,182	0,127	0,082

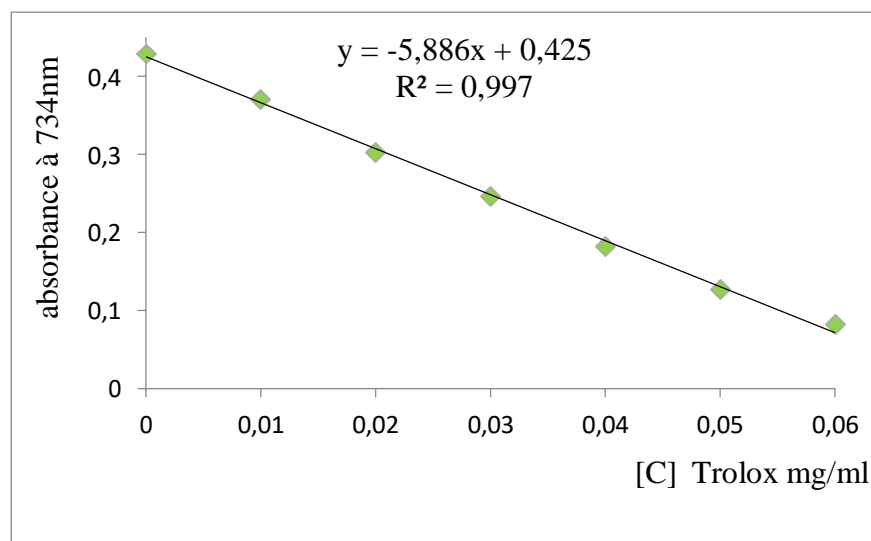


Figure 25 : Courbe étalon réalisée à l'aide de différentes concentrations en Trolox® (densité optique lue à $\lambda = 734$ nm), qui servira à quantifier la capacité antioxydante équivalent Trolox®.

Les transformations effectuées afin de déterminer la capacité antioxydante équivalent Trolox® spécifique aux deux extraits de feuilles d'olivier originaires de deux régions distinctes a donné lieu aux résultats consignés dans la figure 26. Les résultats ont été rapportés en mg équivalents de Trolox® / g de matière sèche.

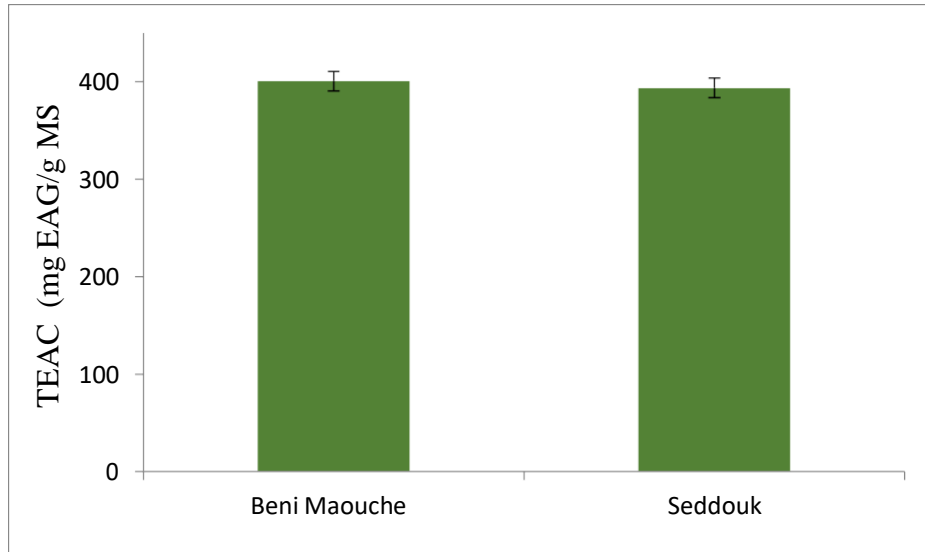


Figure 26 : Effets de la provenance sur la capacité antioxydante équivalent Trolox® des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. L'échantillon provenant de la région de *Beni-Maouche* est hypothétiquement considéré comme sain, celui de *Seddouk* est supposé pollué. Les résultats ont été rapportés en mg d'équivalent en Trolox® / g de matière végétale sèche et représentent une valeur moyenne de 5 essais différents \pm écart-type.

La capacité antioxydante équivalent Trolox® déterminée des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. après décoction selon les paramètres optimisés, n'a pas montré de différence entre les 2 types d'échantillons considérés dans cette étude. En effet, il n'y a pas une réelle différence dans la capacité antioxydante via l'ABTS entre les extraits provenant de la région de *Béni-Maouche* par rapport à ceux provenant de la région de *Seddouk*.

IV-1-3-4- Capacité antioxydante totale par le test au phosphomolybdate

Le test au phosphomolybdate repose sur la réduction du Mo(VI) présent sous une forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène V (MoO^{2+}) en présence d'un agent antioxydant. Cette réduction se concrétise par la formation d'un complexe verdâtre [phosphate / Mo(V)] à un pH acide. L'avantage de ce test est qu'il permet de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des composés phénoliques ainsi que celle des autres composés antioxydants présents dans l'extrait analysé (Prieto et al. 1999).

Le mode opératoire a été décrit par Prieto et al. (1999) qui repose sur une étude spectrophotométrique où l'absorbance λ est lue à 695 nm.

La détermination de la capacité antioxydante par le test au phosphomolybdate, ainsi que sa quantification est estimée grâce à la réalisation au préalable d'une courbe d'étalonnage, en utilisant une substance de référence, à savoir l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique a été préparé à différentes concentrations (**Tab. XIII**). La courbe étalon est tracée par lecture des absorbances à une longueur d'onde de 695 nm (**Fig. 27**).

Tableau XIII : Absorbances lues au spectrophotomètre par rapport aux concentrations de l'acide ascorbique utilisées.

Concentration d'acide ascorbique (mg/mL)				
0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
Absorbance lue à 695 nm				
0,163	0,273	0,494	0,672	0,846

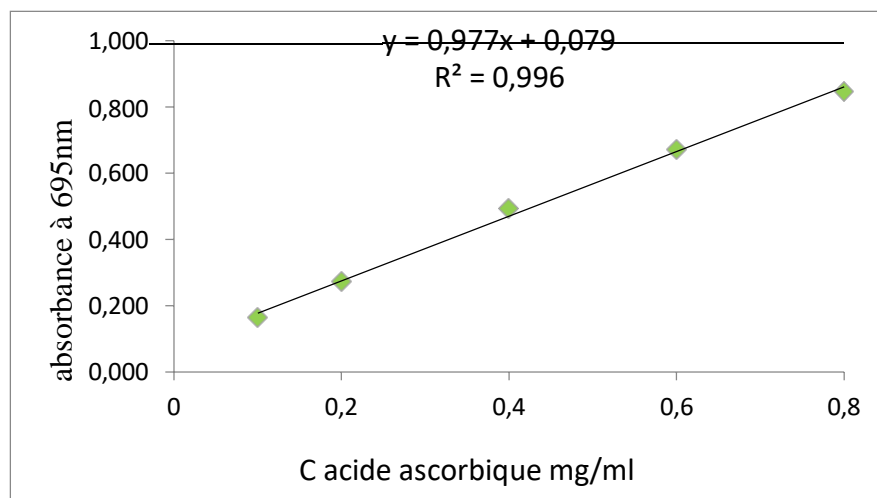


Figure 27 : Courbe étalon réalisée à l'aide de différentes concentrations en acide ascorbique (densité optique lue à $\lambda = 695$ nm), qui servira à quantifier la capacité antioxydante totale suite au test au phosphomolybdate.

La capacité antioxydante des deux extraits ont été calculé à l'aide de l'équation suivante : $y = 0,977 x + 0,079$, où le coefficient de corrélation est $R^2 = 0,996$ à partir de la ligne droite de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (**Fig. 27**).

Les résultats spécifiques à la capacité antioxydante totale du test au phosphomolybdate ont été déduits de cette gamme étalon et exprimés en mg équivalents d'acide ascorbique / g de matière sèche (**Fig. 28**).

L'analyse du graphique obtenu par rapport aux deux extraits testés a montré que l'échantillon hypothétiquement sain récolté de la région de *Béni-Maouche* se révèle plus fourni en capacité antioxydante liée au phosphomolybdate, par comparaison à l'échantillon ramené de la région de *Seddouk* (**Fig. 28**).

En effet, en terme quantitatif, on a trouvé moyennement une teneur équivalente en acide acorbique de 51,57 mg équivalent d'acide ascorbique / g de matière sèche dans l'échantillon de *Béni-Maouche*. Par contre, l'échantillon ramené de *Seddouk* n'en contenait que 36,69 mg équivalent d'acide ascorbique / g de matière sèche (**Fig. 28**).

L'estimation en pourcentage de la capacité antioxydante totale par rapport à ce test est supérieure de 28,85% dans les extraits de feuilles récoltés de la région de *Béni-Maouche* que dans celui provenant de la région de *Seddouk*.

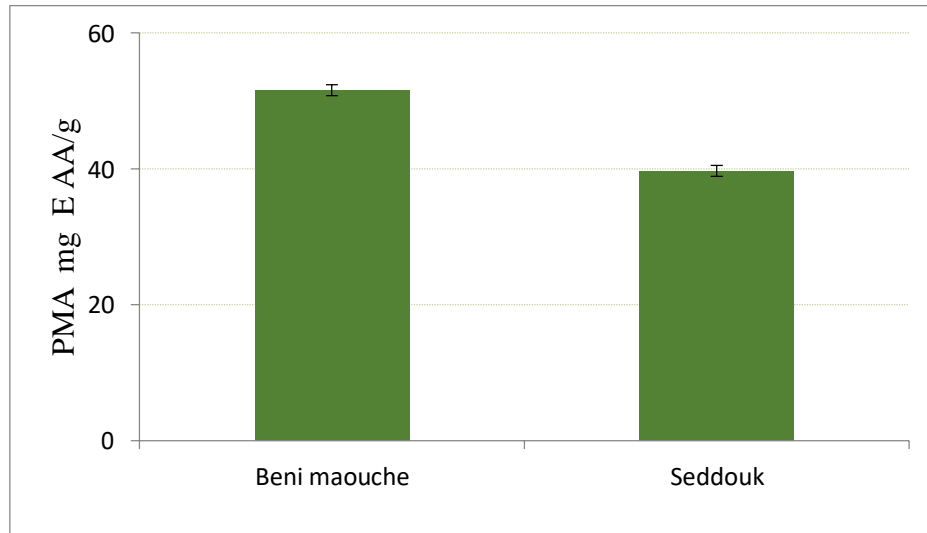


Figure 28 : Effets de la provenance sur la capacité antioxydante totale par le test au phosphomolybdate des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. L'échantillon provenant de la région de *Béni-Maouche* est hypothétiquement considéré comme sain, celui de *Seddouk* est supposé pollué. Les résultats ont été rapportés en mg d'équivalent en acide ascorbique / g de matière sèche et représentent une valeur moyenne de 5 essais différents \pm écart-type.

IV-2- Discussion

Les feuilles d'*Olea europaea* L. de deux provenances différentes (*Béni-Maouche* et *Seddouk*) ont été séchées à l'air libre avant d'être réduites en poudre, finement tamisée. Une opération d'extraction de composés actifs a été opérée sur ces poudres. L'extraction est réalisée selon un principe expérimental choisi, qui consiste en une opération de décoction dans un volume bien défini d'eau distillée (100 mL). Trois paramètres combinés (3 x 3 x 3) ont été considérés pour réaliser cette opération de décoction. Il s'agit :

- ✚ Ratio : 1 ; 2 et 3 g.
- ✚ Température de décoction : 50 ; 70 et 90°C.
- ✚ Temps de décoction : 10 ; 20 et 30 mn.

L'opération d'optimisation de l'extraction de principes actifs s'est appuyée (1) sur le contenu total en composés phénoliques et (2) sur une activité antioxydante équivalent Trolox®.

Pour rendre au mieux de la combinaison la plus idéale pour le choix de l'opération d'optimisation, des modèles mathématiques ont été utilisés en appui. Il s'agit :

- ✦ De tests de corrélations afin d'exprimer la notion de liaison linéaire entre contenu en composés phénoliques totaux et potentiel antioxydant équivalent Trolox®.
- ✦ Une régression polynomiale, qu'elle soit linéaire ou quadratique, a été employée pour modéliser une relation de forme non-linéaire entre la réponse et la ou les variables explicatives.
- ✦ Un coefficient de régression R^2 a été utilisé pour juger de la qualité d'une régression linéaire, c'est-à-dire mesurer l'adéquation entre le modèle et les données observées.
- ✦ Un plan de surface de réponse et/ou le plan de Box-Behnken a permis de mieux cerner et d'optimiser une réponse et dans le cas échéant d'estimer certaines interactions.

L'opération d'optimisation ainsi modélisée a donné lieu au résultat suivant :

Ratio optimum : 1 g / 100 mL

Température optimum : 90°C

Temps optimum : 30 mn

Avec un tel choix, l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante analysée ont été maximisées pour l'opération de décoction réalisée.

Il faut savoir que le profil phénolique des feuilles d'olivier est changeant en fonction de plusieurs facteurs d'abord dépendants de l'espèce elle-même, comme l'origine géographique, la proportion de branches exhibées par l'espèce, le degré de maturité, l'âge des feuilles, le contenu en humidité, les conditions climatiques prévalant, ainsi que la nature du sol et les éventuelles contaminations qui peuvent les toucher.

Ce profil phénolique varie également par rapport aux méthodes employées lors de l'extraction, comme le type de solvant, les préparations préliminaires des échantillons, la composition du solvant, la taille des particules, la température d'extraction, le temps d'extraction, le pH et la pression (**Goldsmith et al. 2014 ; Talhaoui et al. 2015 ; Şahin and Bilgin, 2018**).

Pour mieux appréhender cette partie extraction et de la comparer avec des données effectives, un retour est nécessaire sur les principaux composés phénoliques qui représentent au mieux la composition des feuilles d'olivier.

Ainsi, lorsqu'ils sont extraits, les composés phénoliques des feuilles d'olivier sont majoritairement représentés par l'oleuropéine, occupant 9% du poids total des feuilles en matière sèche (**Kiritsakis et al. 2010**). Les autres composés les plus cités sont la lutéoline-7-O-glucoside, l'apigénine-7-O-glucoside et la lutéoline-40-O-glucoside (**Pereira et al. 2007**).

On peut également trouver d'autres dérivés glycosidiques propres à la lutéoline, de l'hydroxytyrosol, du verbascoside et de l'apigénine (Sabry, 2014). Les acides phénoliques les plus représentés des feuilles d'olivier sont les acides caféique, *p*-coumarique, chlorogénique, vanillic et homovanillique (Özcan and Matthäus, 2017 ; Munekata et al. 2020) (Fig. 29).

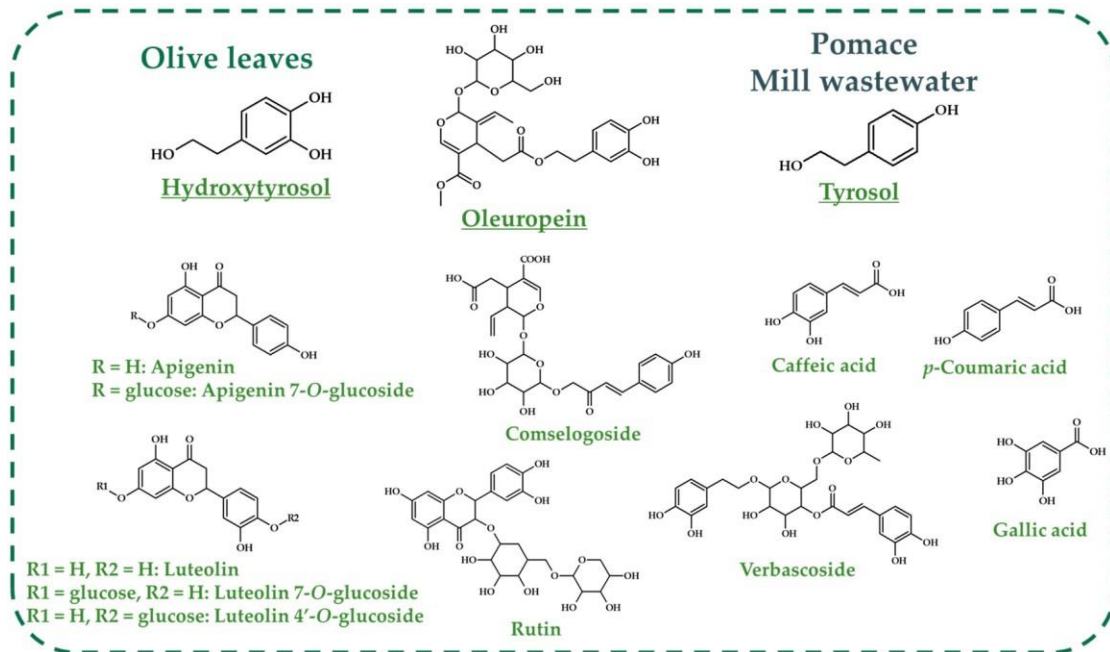


Figure 29 : Structure des principaux composés phénoliques composant les feuilles d'olivier (Munekata et al. 2020).

Si l'on ne regarde rien que la méthode d'extraction sur la part représentée par certains de ces composés phénoliques extraits des feuilles d'olivier, on trouve une variabilité importante entre méthodes, comme l'atteste les 3 exemples référencés par Munekata et al. (2020).

Extraction	Principaux composés identifiés
1,25 g / 25 mL méthanol / 0,22 µm de pore filters à syringe	Oleuropéine (40,33%), verbascoside (5,68%), lutéoline-7-O-glucoside (5,05%), apigénine-7-O-glucoside (3,13%), hydroxytyrosol (1,82%) et tyrosol (1,76%).
Extraction assistée par micro-ondes / 1 g / 8 mL solution hydroéthanolique / 8 mn / 200 W	Oleuropéine (17 à 25 mg/kg), verbascoside (1000 à 2000 mg/kg), apigénine-7-O-glucoside (137 à 260 mg/kg) et lutéoline-7-O-glucoside (127 à 191 mg/kg).
5 g / 150 mL d'eau bouillante / 30 mn	Oleuropéine (26,471 mg/kg), lutéoline-7-O-glucoside (4209 mg/kg), apigénine-7-O-glucoside (2333 mg/kg), lutéoline-4'-O-glucoside (1356 mg/kg), verbascoside (966 mg/kg), rutine (496 mg/kg) et acide caféique (220 mg/kg).

Cette variabilité s'observe également entre différentes variétés considérées dans des endroits différents, où le total en composés phénoliques ainsi que celui représenté par le composant majoritaire, à savoir l'oleuropéine, ont été référencés par **Özcan & Matthäus (2017)**.

Variétés	Total phénols (mgGAE/g)	Oleuropéine (mg/g)
<i>Gerboua (Tunisie)</i>	142,21	45,02
<i>Limouni (Tunisie)</i>	144,19	52,20
<i>Chétoui (Tunisie)</i>	102,32	57,24
<i>Chemlali (Tunisie)</i>	99,71	47,42
<i>Sevillane (Espagne)</i>	73,05	30,76
<i>Lucques (France)</i>	106,80	52,12
<i>Rosicola (Italie)</i>	91,90	48,48
<i>Meski (Italie)</i>	110,03	52,63

De ces résultats, la moyenne du total en composés phénoliques extraits depuis les feuilles d'olivier ainsi rapportés varient de 73,05 à 144,19 mg équivalent d'acide gallique / g ($p < 0,05$).

Ceux que nous avons dosés dans nos échantillons sont également différents entre les 2 provenances, mais bien supérieurs à ceux rapportés dans les résultats énumérés ci-dessus. En effet, l'extrait de feuilles provenant des hauteurs de la région de *Béni-Maouche*, a donné une quantité moyenne en composés phénolique totaux de 383,586 mg d'équivalent en acide gallique / g de matière sèche ; l'extrait de feuilles provenant de la région de *Seddouk* en a donné 336,886 mg d'AGE / g de MS.

Ces résultats sont plutôt proches de ceux rapportés par **Addab et al. (2020)**, qui ont obtenu 420,36 mg EGA / g de MS en utilisant la méthode d'extraction par macération dans un solvant formé d'éthanol à 70%. C'est aussi le cas dans le travail effectué par **Gasioui et al. (2014)**, qui quantifient un ordre de 430,95 mg EAG / g MS de composés phénoliques totaux.

Des teneurs très faibles ont été rapportées dans des travaux effectués par **Siamandoura & Tzia (2023)** d'une part ; et **Boudhioua et al. (2008)** d'autre part. Les premiers auteurs déterminent une quantité de 38,32 mg EAG / g MS pour une méthode d'extraction à ase d'ultrasons, pendant que les seconds auteurs trouvent une quantité de seulement 2,32 mg EAG / g MF, autrement à base d'une extraction sur des feuilles fraîches.

Ainsi, les teneurs en composés phénoliques des extraits varient non seulement entre variétés, mais aussi sont dépendantes des modalités d'extraction d'ordre techniques, surtout lorsque plusieurs paramètres sont combinés.

Les flavonoïdes constituent l'un des groupes les plus courants et les plus largement répandus des polyphénols de feuilles d'olivier. Les composés de ce groupe sont constitués de 2 cycles aromatiques liés par 3 carbones qui forment généralement un hétérocycle oxygéné. Ils peuvent être présents sous forme d'aglycone (quercétine, apigénine) ou sous forme glycosylée (**Briante et al. 2002 ; Laguerre et al. 2009**).

En déterminant les quantités en flavonoïdes totaux obtenus depuis les extraits de feuilles d'olivier, on trouve que l'échantillon récolté depuis les hauteurs de la région de *Béni-Maouche* en compte 30,89 mg d'équivalent en quercétine / g de matière sèche. On en trouve deux fois moins dans l'extrait de feuilles des échantillons provenant de la région de *Seddouk* (16,38 mg d'équivalent quercétine / g de MS).

Si on reprend l'étude précédemment citée et complétée par les quantités en flavonoïdes totaux que présenteraient différentes variétés, on trouve des teneurs variant entre 56,75 et 125,64 mg CE / g avec $p < 0,05$) (**Özcan & Matthäus, 2017**).

Variétés	Total phénols (mgGAE/g)	Total flavonoïdes (mgCE/g)
<i>Gerboua (Tunisie)</i>	142,21	125,64
<i>Limouni (Tunisie)</i>	144,19	120,88
<i>Chétoui (Tunisie)</i>	102,32	94,03
<i>Chemlali (Tunisie)</i>	99,71	82,74
<i>Sevillane (Espagne)</i>	73,05	56,75
<i>Lucques (France)</i>	106,80	97,74
<i>Rosicola (Italie)</i>	91,90	76,01
<i>Meski (Italie)</i>	110,03	91,32

Cette variabilité qui est déterminée par la différence entre variétés utilisées est transposable également à la technique, puisque rien que les solvants utilisés déterminent également les quantités trouvées, tel que référencé par **Özcan & Matthäus (2017)**.

Solvant	Total flavonoïdes (mgCE/g)	Total flavonoïdes (mgCE/g)
<i>80% méthanol</i>	11,78	21,47
<i>70% éthanol</i>	8,69	15,83
<i>80% acétone</i>	7,32	13,33
<i>Eau déminéralisée</i>	3,42	6,23

Nos résultats trouvés sont assez proches de ceux rapportés par **Gasioui et al. (2014)** qui trouvent une quantité de 30,87 mg EQ / g MS. Une quantité équivalente à celle trouvée dans l'échantillon ramené de *Béni-Maouche*. Par contre, ce qui a été trouvé par **El Adnany et al. (2023)** comme teneur en flavonoïdes totaux est équivalente à celle retrouvée dans les échantillons cueillis de la région de *Seddouk* (17,08 vs 16,38 mg EQ / g de MS).

La caractérisation de l'activité antioxydante des extraits est une tâche assez difficile qui implique plus d'une méthode, performante de surcroît et tenant compte de plusieurs paramètres. Cette difficulté découle de multiples mécanismes notamment réactionnels associés à l'effet antioxydant (**Karadag et al. 2009**). Quoiqu'il en soit, les différentes parties de l'olivier, y compris les feuilles comptent des composés antioxydants. Leur capacité de piégeage des radicaux libres, évaluée notamment par des tests DPPH et ABTS, est avérée avec un effet retardant sur les réactions oxydatives (**Şahin et al. 2017**).

Autre aspect important qu'il faut considérer dans ce cas de figure est l'influence exercée par les méthodes de préparation des échantillons avant même l'étape d'extraction, puis extensibles aux conditions d'extraction. A titre indicatif, dans le travail réalisé par **Şahin et al. (2017)** sur l'influence des conditions de séchage par micro-ondes sur l'activité antioxydante des extraits de feuilles d'olivier. Selon ces auteurs, l'effet est significatif en utilisant différents niveaux de puissance lors du séchage, de la masse solide ainsi que du temps consacré au séchage.

D'autres facteurs y jouent un rôle déterminant pour amplifier le pouvoir antioxydant, dont le temps consacré à l'extraction, la nature du solvant autant que la proportion solide/solvant qui diffère d'ailleurs d'une variété à une autre (**De Bruno et al. 2017 ; Goldsmith et al. 2014**).

A cet effet, les résultats de l'activité radicalaire de l'extrait de feuilles d'olivier obtenu pour nos deux échantillons sont quasi identiques lorsque la technique utilisée est celle à base de Trolox (400,64 mg équivalent Trolox / g MS). Elle est inférieure aux résultats trouvés par **Zhang et al. (2022)**, qui rapporte un résultat de l'ordre de 446,16 mg équivalent Trolox / g MS. Cette différence a été expliquée entre autres par la nature du solvant d'extraction utilisé qui est de l'éthanol à 70%.

C'est contraire aux résultats trouvés par **Sánchez-Gutiérrez et al. (2021)**, qui trouvent une quantité très faible, de l'ordre de 58,6 mg équivalent Trolox / g MS. Cette faiblesse a été liée à plusieurs facteurs comme la position géographique, les conditions de préparation des extraits et la période de la récolte.

Pour ce qui est de la seconde méthode utilisée pour quantifier l'activité antioxydante liée au phosphomolybdate ; elle a montré que l'échantillon récolté de la région de *Béni-Maouche* était mieux armé en terme de capacité antioxydante que celui ramené de la région de *Seddouk* (51,57 vs 36,69 mg équivalent d'acide ascorbique / g de MS).

Si ces résultats sont proches de ce qui a été trouvé par **Khlif et al. (2015)**, qui rapportent une capacité de l'ordre de 73,94 mg EAA / g de MS ; cette capacité est néanmoins très faible par rapport au travail de **Lahcene (2020)** qui note une capacité de 267,26 mg EAA / g de MS, dosée depuis les extraits de feuilles qu'il a au préalable soumis à macération.

Les extraits de feuilles utilisées selon les optimums déduits ont donné de bons indices en terme de principes actifs, notamment lorsqu'on a procédé au comparatif entre provenances. L'échantillonnage effectué dans une région de montagne hypothétiquement saine a donné lieu à de meilleurs proportions en terme de composés phénoliques totaux, flavonoïdes totaux et potentiel antioxydant lié au phosphomolybdate, par rapport à l'échantillonnage effectué sur un olivier hypothétiquement pollué, tout proche d'une voie de circulation fréquentée au quotidien par de nombreux véhicules.

Le seul point qui n'a pas discrédité entre les 2 échantillons est lié au potentiel antioxydant mesuré via le Trolox® et qui a donné lieu à des résultats sensiblement égaux. Le même principe actif remplissant cette activité doit concerner ces 2 échantillons.

CONCLUSION

V- Conclusion

Chaque campagne oléicole génère d'énormes quantités de feuilles d'olivier, considérées par les temps présents comme des sous-produits potentiellement riches en composés phénoliques. Ces composés varient qualitativement et quantitativement en fonction de plusieurs facteurs dont des conditions environnementales prévalant dans une région donnée.

Les principes actifs tirés des feuilles d'olivier sont bénéfiques pour la santé. Il est indispensable d'encourager l'industrie en vue d'une valorisation de ces feuilles en tant que source d'antioxydants afin de produire des médicaments, des cosmétiques, des nutraceutiques et pour développer des aliments fonctionnels.

Cette perspective a été envisagée dans le cadre de la préparation de ce mémoire. Il fallait l'initier en premier lieu à travers la détermination des meilleurs paramètres qui pourraient maximiser l'obtention de ces principes actifs. C'est ce que nous avons fait en priorité en choisissant la méthode la plus simple de décoction des échantillons de feuilles provenant de 2 endroits différents.

Cette décoction a été paramétrée par rapport au ratio, température et temps d'extraction que nous avons déterminée au préalable. Une fois optimisée, l'opération a été appliquée à deux de nos échantillons. Sur ce plan, des dosages de composés phénoliques totaux et des flavonoïdes totaux ont été effectués. Les résultats ont été probants, assurant l'obtention de quantités importantes en principes actifs, laissant de ce fait entrevoir une réelle perspective de travail.

Cette première partie d'étude a été étendue aux activités antioxydantes via les techniques liées à l'ABTS et au phosphomolybdate. Les résultats sont également encourageants, rendant compte d'un potentiel antioxydant avéré et certain.

Ces résultats dans leur globalité témoignent déjà d'une différence de comportement entre les deux provenances. Ce qui a été mesuré dans la provenance montagnaise de *Béni-Maouche* surpasse ce qui a été trouvé dans l'échantillon provenant de la région de *Seddouk*.

La raison en est qu'indépendamment de la technique utilisée, l'influence d'un milieu est déterminante sur la quantité et/ou la qualité en principes actifs susceptibles d'être obtenus.

Il restera à penser aux voies de valorisation qui pourraient exploiter au mieux les potentialités de ces feuilles en tant que produit peu coûteux, disponible en masse lors des périodes de taille et de transformation dans les oliveraies.

L'environnement et l'industrie en général ne pourraient qu'en bénéficier. C'est ce qui se fait à travers tous les travaux menés récemment et que nous avons consultés, qui tendent à outrepasser les grignons d'olives pour se consacrer exclusivement aux produits potentiellement valorisables issus de l'exploitation des principes actifs des feuilles d'olivier.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Addab N., Fetni S., Hamlaoui F., Zerguine A., Mahloul K. .2020. Evaluation comparative de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles d'Olea europaea L. de l'EstAlgérien. *J Fac Med Or.*4(2):579- 586. DOI:10.5281/zenodo.4282436
- Ali N., Chapuis E., Tavoillot J., Mateille T. 2014. Plant-parasitic nematodes associated with olive tree (*Olea europaea* L.) with a focus on the Mediterranean basin: A review. *Comptes Rendus Biologies* 337(7-8):423-442. DOI: 10.1016/j.crv.2014.05.006
- Alirezalu K., Pateiro M., Yaghoubi M., Alirezalu A., Peighambardoust S.H., Lorenzo J.M. **2020**. Phytochemical constituents, advanced extraction technologies and techno-functional properties of selected Mediterranean plants for use in meat products. A comprehensive review. *Trends Food Sci. Technol.* 100, 292–306.
- Arab K., Bouchenak O., Yahiaoui K. **2013**. Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. *Afrique science.* 09(3) 159 – 166. ISSN: 1813-548X
- Allalout A., Zarrouk M. **2013**. culture hyper intensive de l'olivier dans le monde et applications en Tunisie. *Master en biologie.* 157-158.
- Altiok E., Baycin D., Bayraktar O., Ulku S., **2008**. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.*, 62(2), 342-348. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.01.022>
- Aouidi F. **2012**. Etude et valorisation des feuilles d'olivier *Olea europaea* dans l'industrie agro-alimentaire. Thèse de doctorat en Génie Biologique: Université du Carthage (Tunisie).
- Barnum D.W. **1977**. Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, dopa, dopamine and other aromatic vic-diols. *Anal. Chim. Acta* 89:157-166. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)83081-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)83081-6)
- Ben-Amor I., Musarra-Pizzo M., Smeriglio A., D'Arrigo M., Pennisi, R., Attia H., Gargouri B., Trombetta D., Mandalari G., Sciortino M.T. **2021**. Phytochemical Characterization of *Olea europaea* Leaf Extracts and Assessment of Their Anti-Microbial and Anti-HSV-1 Activity. *Viruses*, 13, 1085. <https://doi.org/10.3390/v13061085>
- Ben Salah, H., Hdihi, S., Makni, S., et al. (2012) Extramedullary Plasmocytomas. *Canrad*, 16, 282-287. DOI: 10.4236/ojbiph.2015.52004

- Benavente-Garcia J., Castillo J., Lorente A., Ortuno A., Del Rio J.A. **2000**. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem* 68:457–462. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00221-6)
- Blady .**1996**. Le climat de l’Olivier (*Olea europaea* L.). *Olea europaea*. 16, pp.113-121. [DOI.org/10.3406/ecmed.1990.1656](https://doi.org/10.3406/ecmed.1990.1656)
- Bilek SE.**2010**. The effects of time, temperature, solvent: solid ratio and solvent composition on extraction of total phenolics compound from dried olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Gida*. 35:411–6.
- Botsoglou E., Govaris A., Ambrosiadis I., Fletouris D. **2012**. Lipid and protein oxidation of α -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea europea* L.) or α -tocopheryl acetate. *Meat Science*. 92 (4): 525-532. [DOI : 10.1016/j.meatsci.2012.05.022](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.05.022)
- Boudhrioua N., Bahloul N., Slimen I.B., Kechaou N. **2009**. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Ind Crops Prod*. 29:412–9. [DOI: 10.1016/j.indcrop.2008.08.001](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.08.001).
- Boizot N., Charpentier J.P. **2006**. Méthode rapide d’évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d’un arbre forestier. *ResearchGate*. 79-82.
- Box G.E.P., Benhken D.W.**1960**. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables, *Technometrics*. Vol. 2, pp. 455-475.
- Breton C., Médail F., Pinatel c ., Bervillé A.**2006**. De l’olivier à l’oléastre : origine et Domestication de l’*Olea europaea* L. dans le Bassin méditerranéen. *Cahiers Agricultures*, 15 (4), pp.329-336. [HAL Id: hal-02667229](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02667229)
- Briante R., Patumi M., Terenziani S., Bismuto E., Febbraio F., & Nucci R. **2002**. *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,4934–4940.
- Christ B., Muller K.H.**1960** Determination of the amount of flavonol derivative in drugs. *Arch. pharm* .293, 1033-1042. <https://doi.org/10.1002%2Fardp.19602931202>
- Cuneo P., Leishman R .M. **2006**. African Olive (*Olea europaea* subsp. *Cuspidate*) as an environmental weed in eastern Australia: a review. *Cunninghamia* .9 (4): 545–547. [Corpus ID: 133115243](https://doi.org/10.1016/j.cun.2006.04.001)
- Djeridane A., Boubekour N., Yousfi M., Boutassouna D.**2006**. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing Phenolic compounds. *Food Chemistry* .97(4):654-660. [DOI:10.1016/j.foodchem.2005.04.028](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028)

- Doula M.K., Moreno-Ortego J.L., Tinivella F., Inglezakis V.J., Sarris A., Komnitsas K. **2017**. Olive mill waste: Recent advances for the sustainable development of olive oil industry. In *Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands. pp. 29–56. [ISBN 9780128053140](#).
- El Adnany E.M., Elhadiri N., Mourjane A., Ouhammou M., Hidar, N., Jaouad A., Bitar K., Mahrouz M. **2023**. Impact and Optimization of the Conditions of Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Olive Leaves (Moroccan picholine) Using Response Surface Methodology. *Separations*. 10. 326. <https://doi.org/10.3390/separations10060326>
- El S.N., Karakaya S. **2019**. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health. *Nutr. Rev.*, 67, 632–638. [DOI:10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(95\)00657-7](https://doi.org/10.1016/0921-4488(95)00657-7).
- Fernández-Escobar R., Moreno R., García-Creus M. **1999**. Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. *Scientia Horticulturae*. 82 (1-2), 25-45. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00045-X).
- Franco R.D.J., Sineiro J., Rubilar M., Sánchez M. **2008**. Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 7(8):3210-3216. [ISSN:1579-4377](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00045-X).
- Furneri P.M., Marino A., Saija A., Uccella N., Bisignano G. **2022**. In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International journal of antimicrobial agents*. 20(4), 293-296 . [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00181-4).
- Gasioui F., Hadj Amar Z., Oussaid S. **2013**. Extraction, optimisation et pouvoire antioxydant des polyphénols des feuilles d'oleastre, *phytothérapie*. 1(2) .30-36 .
- Gavahian M., Mousavi Khaneghah A., Lorenzo J.M., Munekata P.E.S., Garcia-Mantrana I., Collado M.C., Meléndez-Martínez A.J., Barba F.J. **2019**. Health benefits of olive oil and its components: Impacts on gut microbiota antioxidant activities, and prevention of noncommunicable diseases. *Trends Food Sci. Technol.* 88, 220–227.
- Gökmen M., Kara R., Akkaya L., Torlak E., Önen A. **2014**. evaluation of antimicrobial activity in olive (*Olea europaea*) leaf extracts. *Current Research in Microbiology*. 5 (2), 37-40. [DOI: https://doi.org/10.3844/ajmsp.2014.37.40](https://doi.org/10.3844/ajmsp.2014.37.40)
- Goldsmith C.D., Vuong Q.V., Stathopoulos C.E., Roach P.D., Scarlett C.J. **2014**. Optimization of the aqueous extraction of phenolic compounds from olive leaves. *Antioxidant* 3:700–712. [DOI:10.3390/antiox3040700](https://doi.org/10.3390/antiox3040700) .
- Gorzynik-Debicka M., Przychodzen P., Cappello F., Kuban-Jankowska A., Marino

- Gammazza A., Knap N., Wozniak M., Gorska-Ponikowska M. **2018**. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 28;19(3):686. DOI: [10.3390/ijms19030686](https://doi.org/10.3390/ijms19030686).
- Granato D., Barba F.J., Bursa'c Kova'cevi'c D., Lorenzo J.M., Cruz A.G., Putnik P. **2020**. Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 11, 93–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- Guerrero M .N., Lopez M.J., Caudullo J.D., Rigo, D., **2016**. *Olea europaea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*. Publ. Off. EU, Luxembourg.
- Guo Z.,Jia X., Zheng Z., Lu X., Zheng Y., Zheng B.,Xiao J.**2018**. Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): A review. *Phytochem. Rev.* 17, 1091–1110.
- Hayes J.E., Allen P.A., N. Brunton A., O'Grady M.N., Kerry J.P.**2011**. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.). *lutein, sesamol and ellagic acid Food chemistry* .126 ,948-955.
- Jean Pagnol. **1996**. L'olivier.5èmeEd AUBANEL. Préface de P. Bonnet Président de la Fédération Internationale d'Oléiculture.
- Julve, Ph. **2021**. ff. - Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version : 27 avril 2021. <https://www.telabotanica.org/projets/phytosociologie>
- Khelif I., Jellali K., Michel T., Halabalaki M., Skaltsounis A.L., Allouche N. **2015**. Characteristics, phytochemical analysis and biological activities of extracts from Tunisian Chetoui *Olea europaea* Variety. *Journal of Chemistry*. 2015: 1-11 <https://doi.org/10.1155/2015/418731>
- Lahcene S. **2020**. Caractérisation biochimique et activités biologiques des extraits de l'olivier de Laperrine *Olea europaea* subsp *laperrinei* (Batt. et Trab.) Cifferi thèse de doctorat en cotutelle: Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou. 143p .
- Laguerre M., Lopez-giraldo L., Lecomte J., Pina, M. et Villeneuve P.**2007**.Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oxford College of London*,14 (5): 278-292.

- Lakache Z., Tigrine C., Aliboudhar H., Kameli .**2019**. Composition chimique, activités anti-inflammatoire, antalgique et cytotoxique in vivo de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* , *Phytothérapie*. 019-0195.[DOI:10.3166/phyto-2019-0195](https://doi.org/10.3166/phyto-2019-0195)
- Lee O.H., Lee B.Y.**2010**. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*. 101(10), 3751-3754. [DOI:10.1016/j.biortech.2009.12.052](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.052)
- Loussert R., Brousse G. **1978**. L'Olivier techniques agricoles et production méditerranéennes. Ed. G.P. *Maisonneuve et Lorose*. Paris. 12, P447. [ISBN 2706806532](https://www.isbn-international.org/product/9782706806532)
- Mailloa M. N., Mahendradatta M., Laga, A., et Djide N. **2013**. Tannin extract of guava leaves (*Psidium guajava* L.) variation with concentration organic solvents. *international journal of scientific & technology research*, 2(9): 106-10. [ISSN 2277-8616](https://www.issn-international.org/issn/2277-8616)
- Malik N., Bradford J. **2008**. Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Food Agriculture & Environment*. [ID: 53326786](https://doi.org/10.3326786).
- Marc F., Davin A., Degléne-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. Fritsch P . **2004**. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine Sciences*, 20 (4), 458-463.
- Martin-Garcia, I., Yanez Ruiz, D., Moumen, A., Molina Alcalde E.**2006**. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaf fermentation in continuous fermentors. *Small Ruminant Research*, 61, 53-61.
- Mekonnen A. , Desta W.**2021**. Comparative study of the antioxidant and antibacterial activities of *Rumex abyssinicus* with commercially available *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* in Bahir Dar city, Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*.2. [DOI:10.1186/s40538-020-00198-0](https://doi.org/10.1186/s40538-020-00198-0)
- Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A., **1993**. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84: 407-412.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Domínguez J.M., Sineiro J., Domínguez H. **2001**. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 72:145–71. [DOI:10.1016/S03088146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S03088146(00)00223-5)
- Munekata P.E.S., Domínguez R., Budaraju S., Roselló-Soto E., Barba F.J., Mallikarjunan K., Roohinejad S ., Lorenzo J.L. **2020**. Effect of Innovative Food Processing Technologies on the Physicochemical and Nutritional Properties and Quality of Non-Dairy Plant-Based Beverages. *Milk Alternatives and Non-Dairy Fermented Products*. 9(3), 288. <https://doi.org/10.3390/foods9030288>.
- Özcan M.A., Matthäus B. **2017**. A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology* 243(1):89-99. [DOI: 10.1007/s00217-016-2726-9](https://doi.org/10.1007/s00217-016-2726-9)
- Pagnol, J., **1996**. L'Olivier. *Aubanel Ed*, France.

- Pereira E. M., Santos F. A. P., Bittar C. M. M., Ramalho T. R., Costa D. F. A., Martinez J. C. **2007**. Substitution of corn grain by wheat middlings or corn gluten feed in the finishing bulls diet. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 29 (1): 49-55
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M. **1999**. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal. Biochem.*, 269, 337341 <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
- Rafiee Z., Jafari S., Alami M., Khomeiri M. **2012**. Antioxidant effect of microwave assisted extracts of olive leaves on sunflower oil. *J Agric Sci Technol*. 14:1497–509.
- Rameau JC., Mansion D. Dumé G., Gauberville C., bardat J., Bruno É., keller R. **2008**. Flore forestière française – guide écologique illustré. Tome 3. *Institut pour le développement forestier, Paris (France)* : 2426 pp.
- Ray N.B., Lam N.T., Luc R., Bonvino N.P., Karagiannis T.C. **2015**. Cellular and molecular effects of bioactive phenolic compounds in olives and olive oil. In *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands. pp. 53–91. [ISBN 9781630670429](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. **1999**. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Reboredo.R.P., FigueiredoG.M., González.B.C., Simal.G.J., DesamparadosS.M., Cancho.G.B., Fregapane G.**2017**. State of the Art on Functional Virgin Olive Oils Enriched with Bioactive Compounds and Their Properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 668. [DOI: 10.3390/ijms18030668](https://doi.org/10.3390/ijms18030668).
- Ribéreau-Gayon P.**1968**. Les Composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris.
- Rodríguez-Juan E., Rodríguez-Romero C., Fernández-Bolaños J., Florido M.C., Garcia-Borrego A. **2021**. Phenolic compounds from virgin olive oil obtained by natural deep eutectic solvent (NADES): effect of the extraction and recovery conditions. *J Food Sci Technol*. 58:552–61. [DOI: 10.1007/s13197-020-04567-3](https://doi.org/10.1007/s13197-020-04567-3)
- Sabry O. M. M .**2014**. Review: Beneficial Health Effects of Olive Leaves Extracts. *Journal of Natural Sciences Research*. Vol 4(19), p 1-9.
- Şahin S., Bilgin.**2017**. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1271-1279. [DOI: 10.1002/jsfa.8619](https://doi.org/10.1002/jsfa.8619)
- Sánchez-Gutiérrez M., Bascón-Villegas I., Rodríguez A., Pérez-Rodríguez F., Fernández-Prior Á., Rosal A., Carrasco E. **2021**. Valorisation of *Olea europaea* L. Olive Leaves

- through the Evaluation of Their Extracts: Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Foods*, 10, 966. <https://doi.org/10.3390/foods10050966>
- Sedef N.E., Karakaya S. **2009**. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*. 67 (11), 632–638. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x>
- Selim S., Albqmi M., Al-Sanea M.M., Alnusaire T.S., Almuhayawi M.S., Abdelgawad H., Al Jaouni S.K., Elkelish A., Hussein S., Warrad M., El-Saadony T.E. **2022**. Valorizing the usage of olive leaves, bioactive compounds, biological activities, and food applications: A comprehensive review. *Frontiers et nutrition*. 9:1008349. [.DOI: 10.3389/fnut.2022.1008349](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1008349)
- Shraim A.M., Talaat A. Ahmed b, Md Mizanur R. C., Yousef M., Hijji A. **2021**. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. 150(2):111932. [DOI.org/10.1016/j.lwt.2021.111932](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932)
- Siamandoura P., Tzia C. **2023**. Comparative Study of Novel Methods for Olive Leaf Phenolic Compound Extraction Using NADES as Solvents. *Molecules*, 28, 353. <https://doi.org/10.3390/molecules28010353>
- Singleton V., Rossi J. **1965**. Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158. [DOI: 10.4236/fns.2015.69083](https://doi.org/10.4236/fns.2015.69083).
- Souilem S., El-Abbassi A., Kiai H., Hafidi A., Sayadi S., Galanakis C.M. 2017. Olive oil production sector: Environmental effects and sustainability challenges. In *Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 1–28. [ISBN 9780128053140](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.ch001).
- Stamatopoulos K., Chatzilazarou A., Katsoyannos E. **2013**. Optimization of multistage extraction of olive leaves for recovery of phenolic compounds at moderated temperatures and short extraction times. *Foods*. 3:66–81. [DOI: 10.3390/foods3010066](https://doi.org/10.3390/foods3010066).
- Stanković M.S. **2011**. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac Journal of Science*, 33: 63-72. [UDC 581.19:582.929.4:577.164.3](https://doi.org/10.58119/582.929.4:577.164.3)
- Surana A., Kumbhare M., Wagh R. **2016**. Estimation of Total Phenolic and Total Flavonoid Content and Assessment of in Vitro Antioxidant Activity of Extracts of *Hamelia Patens* Jacq. Stems. *Res. J. Phytochem.*, 10, 67–74. <https://doi.org/10.3923/rjphyto.2016.67.74>.
- Talhaoui N., Taamalli A., Gomez-Caravaca A.M., Gutierrez F., Segura-Carretero A. **2015**. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77: 92-108.

[Doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011)

- Tura D., Robards K. **2022**. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*. 975, 71–93. www.elsevier.com/locate/chroma
- Üstündaş M., Yener H.B., Helvacı S.S. **2018**. Parameters affecting lycopene extraction from tomato powder and its antioxidant activity. *Appl. Sci. and Eng.* 19 (2). DOI:10.18038/aubtda.363140
- Villa P. **2003**. La culture de l'olivier. Ed. De Vecchi S.A. Paris, P. 143. ISBN :2-7328-13362
- Wallali L.D., Skiredja A., Elalir H., **2003**. Fiches techniques: L'amandier, l'olivier, le figuier et le grenadier. *Bulletin de Transfert de Technologie en Agriculture*. 105 : 2-3. https://www.agrimaroc.net/bulletins/btta_105.pdf
- Wu C., Li T., Qi J., Jiang T., Xu H., Lei H. **2020**. Effects of lactic acid fermentation based biotransformation on phenolics profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. *LWT Food Sci Technol.* 122:109064. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109064
- Xu, B.J. and Chang, S.K.C. (2007) A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *Journal of Food Science*, 72, S159-S166. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>
- Zhang C., Xin X., Zhang J., Zhu S., Niu, E., Zhou Z., Liu D. **2022**. Comparative Evaluation of the Phytochemical Profiles and Antioxidant Potentials of Olive Leaves from 32 Cultivars Grown in China. *Molecules*, 27, 1292. <https://doi.org/10.3390/molecules27041292>
- Zeghib W., Boudjouan F., Bachir-bey M. **2022**. Optimization of Phenolic Compounds Recovery and Antioxidant Activity Evaluation from *Opuntia Ficus Indica* Using Response Surface Methodology. *J. Food Meas. Charact.* 16, 1354–1366. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01241-w>.
- Žugčić T., Abdelkebir R., Alcantara C., Collado M.C., García-Pérez J.V. , Meléndez-Martínez A.J., Jambrak A.R., Lorenzo J.M. , Barba F.J. **2019**. From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*. 83, 63-77. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.005>

RÉSUMÉ

L'objet de cette étude est l'investigation des voies de valorisation des feuilles d'*Olea europaea* L. Deux types de dosages ont été réalisés au départ afin d'optimiser les paramètres d'extraction par le biais de la décoction. Le ratio de 1 g/100 mL d'eau distillée, une température de 90°C et un temps de 30 mn se sont révélés les meilleurs pour maximiser l'obtention d'une teneur élevée en composés phénoliques et une activité antioxydante équivalent Trolox[®] importante.

Avec cette optimisation, ces paramètres ont été appliqués aux feuilles de deux provenances différentes : l'une provenant des hauteurs de *Béni-Maouche*, l'autre de la région de *Seddouk* aux environs d'un axe routier fréquenté par la circulation de véhicules.

Les extraits de feuilles ont été testés par rapport au total de leurs composés phénoliques, des flavonoïdes, ainsi que par leurs activités antioxydantes ABTS et PMA. Il a été trouvé au travers des résultats obtenus qu'en plus d'une activité antioxydante importante, les feuilles d'olivier cueillies et transformées exhibent une quantité élevée en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux.

De plus, l'échantillon provenant des montagnes de *Béni-Maouche* est plus fourni que celui provenant de la région de *Seddouk*, vis-à-vis de tous les éléments considérés dans l'étude, sauf pour l'activité antioxydante équivalent Trolox[®], qui est sensiblement identique entre les deux provenances.

Mots-clés : *Olea europaea* L. ; extraits de feuilles ; décoction ; polyphénols ; flavonoïdes ; pouvoir antioxydant.

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate ways of extracting value from the leaves of *Olea europaea* L. Initially, two types of assay were carried out to optimize extraction parameters by decoction. The ratio of 1 g/100 mL distilled water, a temperature of 90°C and a time of 30 min were found to be the best for maximizing high phenolic compound content and Trolox[®] equivalent antioxidant activity.

With this optimization, these parameters were applied to leaves from two different origins: one from the heights of *Beni-Maouche*, the other from the *Seddouk* region near a road used by heavy vehicle traffic.

Leaf extracts were tested for their total phenolic compounds, flavonoids, as well as their antioxidant activities ABTS and PMA. The results showed that, in addition to high antioxidant activity, the harvested and processed olive leaves exhibited high levels of total phenolics and flavonoids.

What's more, the sample from the *Beni-Maouche* mountains was more abundant than that from *Seddouk* region, with regard to all the elements considered in the study, except for Trolox[®]-equivalent antioxidant activity, which was virtually identical between the two regions.

Keywords: *Olea europaea* L., leaf extracts, decoction, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity.

