

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Sciences Alimentaires  
Filière : Sciences Alimentaires  
Spécialité : Sciences des Corps Gras



Réf:.....

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

**MASTER**

***Thème***

**Optimisation de l'extraction des composés phénoliques à  
partir du grignon d'olive  
(Activités anti-inflammatoire et anti-diabétique)**

Présenté par :

**BAZIZI FRIEL & TOUATI LYNA**

Soutenu le : **02/07/2024**

Devant le jury composé de :

Mme. OUCHEMOUKH N

Professeur

Présidente

Mme. GUEMGHAR H

Professeur

Promotrice

Mme. YAHIA-CHERIF L

MCB

Examinatrice

**Année universitaire : 2023 / 2024**

## **Remerciements**

*Nous tenons tout d'abord à remercier Allah, le Tout-Puissant et Miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.*

*Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre encadrant Mme **Guemghar Hayate** pour son soutien constant, ses conseils avisés et son expertise précieuse tout au long de ce projet. Son engagement et ses encouragements ont été d'une importance capitale pour la réussite de ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury: Mme **Ouchemoukh Nadia** et Mme **Yahia Cherif Lamia** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre thème en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions et orientations*

*Enfin, nous remercions toutes les personnes et institutions qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce mémoire. Que chacun trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance.*

**Feriel & Lyna**

## **Dédicace**

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents qui m'ont toujours soutenu, les paroles ne suffisent pas à exprimer toute ma reconnaissance et mon estime envers eux.*

*Mes très chères sœurs Taous et Wissam et à mon seul et unique frère Akli qui m'ont toujours encouragé*

*A mes très chères ami(e)s : Dahvia, Sirine, Tita, Hidjou et Massi*

*Tarik, Reda et son équipe, Samira et Ferial*

*Je tiens à vous dire que je vous apprécie énormément et que je vous remercie pour tout.*

*A ma copine depuis toujours, ma binôme Lyna et toute sa famille.*

*A toute personne qui m'aime et ma soutenu de près ou de loin.*

*Que dieu me les garde.*

*A ma promotrice GUEMGHAR Hayate pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide précieux et sa disponibilité.*

*Dieu merci*

*Ferial*

## ***Dédicace***

*Mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu et pour qui les mots ne sont pas assez forts pour exprimer toute la gratitude et l'estime que j'ai à leurs égards.*

*Mes très chères sœurs Cherifa, Yasmina et Hanane. Ma petite nièce Lilya et mon neveu Moussa-Saïd, mes beaux-frères Ryad et Aïmed.*

*Que dieu me les garde.*

*A ma copine depuis toujours, ma binôme Ferial et toute sa famille.*

*Les personnes qui m'ont soutenu pour réaliser ce travail surtout Sirine, Tita Hidjou, Nordine et Amer*

A ma promotrice GUEMGHAR Hayate pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide précieux et sa disponibilité.

Dieu merci

*Lyna*

# Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction : ..... 1

## Partie bibliographie

### I Généralités

1.1	Origine et histoire :.....	2
1.1.1	Description de l'olive :.....	2
1.1.2	Composition et valeur nutritive : .....	3
1.1.3	Production et transformation : .....	3
1.2	Les grignons d'olives :.....	4
1.2.1	1.2.1. Définition :.....	4
1.2.2.	Composition des grignons : .....	4
1.2.3.	Production du grignon d'olive : .....	5
1.2.2	Valorisation et application du grignon d'olive : .....	5
1.3	Composés phénoliques des grignons d'olives :.....	6
1.3.1	Définition et classification : .....	6
1.3.2	Variété : .....	9
1.3.3	Propriété :.....	10
1.3.4	Rôle :.....	10
1.3.5	Bénéfices pour la santé humaine : .....	10

### II Chapitre 2 extraction assistée par micro-onde

2.1	Histoire : .....	12
2.2	Micro-ondes : .....	12
2.3	Principe : .....	13
2.4	Facteurs influençant la performance de MAE.....	14
2.5	Facteurs influençant l'extraction assistée par micro-ondes : .....	14

2.5.1	Puissance des micro-ondes : .....	14
2.5.2	Temps d'extraction : .....	14
2.5.3	Température : .....	15
2.5.4	Nature et choix du solvant : .....	15
2.6	Avantages et inconvénients de l'extraction par micro-ondes : .....	15
2.7	Instrumentation : .....	16
2.8	Avènement de l'extraction assistée par micro-ondes : .....	16
<b>III Chapitre 3 : Plan d'expérience</b>		
3.1	Définition : .....	17
3.2	Principe : .....	17
3.3	Intérêts et objectifs de l'utilisation de plan d'expériences : .....	18
3.4	Avantage : .....	18
<b><u>Partie pratique</u></b>		
<b>IV Chapitre 4 Matériels et méthodes</b>		
4.1	Échantillonnage : .....	19
4.2	Etude préliminaire : .....	19
4.3	Extraction et dosage des composés phénoliques : .....	20
4.3.1	Extraction : .....	20
4.3.2	Dosage des composés phénoliques totaux .....	21
4.4	Préparation des extraits secs : .....	21
4.5	Activité antioxydante : .....	21
4.5.1	Effet « scavenger » sur le radical DPPH : .....	21
4.5.2	Effet « scavenger » sur le radical d'ABTS : .....	22
4.5.3	Activité antioxydante totale : .....	22
4.6	Chélation des ions de fer ferreux : .....	23
4.7	Activité antidiabétique (invitro) : .....	23
4.8	Activité anti-inflammatoire : .....	24
<b>V Chapitre 5 Résultats et Discussion</b>		
5.1	Etudes préliminaire : .....	25
5.1.1	Effet de la concentration du solvant sur l'extraction : .....	25
5.1.2	Effet de la puissance sur l'extraction : .....	25
5.1.3	Effet du temps sur l'extraction : .....	26

5.1.4	Effet du ratio sur l'extraction : .....	26
5.2	Optimisation de la procédure d'extraction assistée par micro-ondes :.....	26
5.3	Ajustement du modèle :.....	27
5.4	Signification des variables : .....	29
5.5	Analyse de la surface de réponse :.....	30
5.6	Conditions d'extractions optimales :.....	32
5.7	Validation du modèle : .....	33
5.8	Activité anti-oxydante : .....	34
5.8.1	Effet « scavenger » sur le radical DPPH :.....	34
5.8.2	Effet « scavenger » sur le radical d'ABTS :.....	35
5.8.3	Activité antioxydante totale :.....	36
5.8.4	Chélation des ions de fer ferreux : .....	37
5.9	Activité antidiabétique : .....	39
5.10	Activité anti-inflammatoire : .....	40
<b>Conclusion :</b> .....		<b>42</b>

## **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**

## Table des figures

<b>Figure 1:</b> Photographie montrant les olives à maturité.....	2
<b>Figure 2 :</b> Le grignon d'olive. ....	4
<b>Figure 3:</b> Structure de quelques acides phénoliques des grignons d'olives ( <b>Braca.A, 2010</b> ).....	7
<b>Figure 4:</b> Structure de quelques alcools phénoliques des grignons d'olive.....	8
<b>Figure 5:</b> Structures des flavonoïdes des grignons d'olives ( <b>Edenharder, 2003</b> ).....	8
<b>Figure 6 :</b> Structure des dérivés sécuridoïdes des grignons d'olives ( <b>Soler-Rivas C., 2000</b> ).....	8
<b>Figure 7 :</b> structure des lignanes des grignons d'olives ( <b>Guil-Guerrero</b> ).....	9
<b>Figure 8 :</b> le spectre électromagnétique ( <b>Motasemi, 2012</b> ). ....	13
<b>Figure 9:</b> équipement de micro-ondes ( <b>Cendres, 2010</b> ). ....	16
<b>Figure 10 :</b> Poudre de grignon d'olive.....	19
<b>Figure 11:</b> Illustration d'équipement micro-ondes. ....	20
<b>Figure 12:</b> Protocole de l'extraction par micro-ondes. ....	20
<b>Figure 13 :</b> Photographie de l'extrait après séchage.....	21
<b>Figure 14 :</b> Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites. ....	29
<b>Figure 15:</b> Courbe 3D de l'effet d'interaction de paramètres de concentration d'éthanol et de la puissance sur le rendement en CPT.....	31
<b>Figure 16 :</b> Courbe 3D de l'effet d'interaction de paramètres de concentration d'éthanol et de temps d'extraction sur le rendement en CPT. ....	31
<b>Figure 17 :</b> Courbe 3D de l'effet d'interaction de paramètres de la puissance et de temps d'extraction sur le rendement en CPT. ....	32
<b>Figure 18 :</b> Profils des valeurs prédites et de la fonction de désirabilité. ....	33
<b>Figure 19:</b> Pourcentage de pouvoir scavenger du radical DPPH de l'extrait de grignon d'olive à différentes concentrations comparé avec le trolox. ....	35
<b>Figure 20 :</b> Pourcentage de pouvoir scavenger du radical d'ABTS de l'extrait de grignon d'olive à différentes concentrations comparé avec le trolox. ....	36
<b>Figure 21 :</b> Pourcentage de l'activité antioxydant totale (molybdate) de l'extrait de grignon d'olive à différentes concentrations comparé avec le trolox. ....	37
<b>Figure 22 :</b> Pourcentage de pouvoir chélateur du fer ferreux de l'extrait de grignon d'olive comparé avec l'EDTA. ....	38
<b>Figure 23:</b> Pourcentages d'inhibition de l'alpha amylase par l'extrait de grignon d'olive comparé à l'acarbose. ....	40
<b>Figure 24 :</b> Pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique de l'extrait de grignon d'olive comparé avec l'indométacine. ....	41



## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Composition des olives (pour 100g) (ANSES., 2020).....	3
<b>Tableau II:</b> Composition des grignons d'olive ( <b>Council, 2017</b> ) .....	4
<b>Tableau III:</b> Constantes physiques et facteurs de dissipation pour certains solvants couramment utilisés dans l'MAE ( <b>Eskilsson, 2000</b> ). .....	14
<b>Tableau IV:</b> Effet de la concentration de l'éthanol sur l'extraction des composés phénoliques. ....	25
<b>Tableau V :</b> Effet de la puissance sur l'extraction des composés phénoliques. ....	25
<b>Tableau VI :</b> Effet de temps sur l'extraction des composés phénoliques .....	26
<b>Tableau VII :</b> Effet du ratio sur l'extraction des composés phénoliques.....	26
<b>Tableau VIII :</b> Résultats des essais du plan d'expérience (Plan expérimental de l'optimisation de l'extraction assistée par micro-ondes des CPT à partir de grignon d'olive).....	27
<b>Tableau IX:</b> ANOVA pour l'effet de la concentration d'éthanol, de la puissance et du temps d'extraction sur le rendement en CPT. ....	28
<b>Tableau X:</b> Paramètres descriptifs de l'ajustement du modèle.....	29
<b>Tableau XI:</b> Conditions optimales pour l'extraction des CPT (mg EAG/g) de l'extrait de grignon d'olive.....	33

## Liste des abréviations

**Abs** : absorbance.

**Ac** : absorbance du contrôle.

**AE** : absorbance d'extrait.

**AFIDOL** : Association Française Interprofessionnelle de l'olive.

**ANSES** : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

**ABTS** : Acide 2,2 azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique.

**Adeq Precision** : précision adéquate.

**AdjR<sup>2</sup>** : Coefficient de détermination ajusté.

**ANOVA** : Analysis of variance (Analyse de la variance).

**COI** : Conseil Oléicole International.

**CPT** : Composés phénoliques totaux.

**CV** : Coefficient de variation.

**cm** : centimètre.

**°C** : degrés Celsius.

**DPPH** : 2,2-déphényl-1-ptycryl-hydrazyle.

**DSA** : Direction des services agricoles.

**EAG** : Équivalent d'acide gallique.

**EDTA** : Un acide éthylène-diamine-tétra-acétique.

**F** : Loi de Fisher.

**g** : gramme.

**GHz** : gigahertz.

**Hz** : hertz.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène.

**h** : Heure.

**IC50** : Concentration inhibitrice médiane.

**MSR** : Méthodologie de surface de réponse.

**MAE** : Extraction assisté par micro-onde.

**M** : Molaire .

**mM** : millimolaire.

**mg** : milligramme.

**m** : mètre .

**min** : minute .

**MHz** : megahertz.

**nm** : Nanomètre.

**P** : probabilité critique.

**Pred. R<sub>2</sub>** : Coefficient de détermination de prédiction.

**R<sub>2</sub>** : Coefficient de détermination.

**SAU** : la superficie agricole utile.

**S** : seconde.

**Trolox** : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2*H*-1-benzopyran-2-carboxylique.

**µg** : microgramme.

**µl** : microlitre.

# **Introduction**

### **Introduction**

L'oléiculture, au-delà de son importance économique indéniable, génère une quantité considérable de sous-produits, notamment les grignons d'olives, souvent sous-exploités. Ces résidus, pourtant riches en composés bioactifs, offrent un potentiel prometteur dans divers domaines, notamment en tant que source de composés phénoliques aux vertus santé et fonctionnelles avérées. L'extraction de ces précieux composés à partir des grignons d'olives est ainsi devenue un enjeu majeur de recherche, soulevant des défis et des opportunités significatifs.

Depuis quelques années, les polyphénols attirent de plus en plus l'attention des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. On les regroupe dans ce qu'on nomme les phytomicronutriments. Il s'agit des antioxydants les plus nombreux présents dans les aliments végétaux. Les radicaux libres sont neutralisés par eux, ce qui permet de prévenir différentes maladies dégénératives comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, la cataracte, les maladies du système nerveux central ou les déficiences immunitaires.

Grâce à sa rapidité, son efficacité et sa sélectivité, l'extraction assistée par micro-ondes des composés bioactifs (huiles essentielles, arômes, huiles végétales, graisses, antioxydants ou colorants, polyphénols...) est un domaine de recherche très intéressant dans divers secteurs de l'industrie (alimentaire, cosmétique, parfumerie, pharmaceutique, nutraceutique). En utilisant des micro-ondes, il est possible de réaliser des extractions complètes reproductibles en quelques secondes ou minutes, avec une reproductibilité élevée. Cela permet de réduire les solvants et la consommation d'énergie, de simplifier la manipulation et le traitement, d'améliorer la pureté des produits, d'éliminer le posttraitement et de préserver les composés thermosensibles.

**L'objectif de cette étude est d'optimiser l'extraction des composés phénoliques du grignon d'olive par micro-ondes en utilisant la méthodologie de surface de réponse et d'évaluer l'activité antioxydante, antidiabétique et anti-inflammatoire des extraits obtenus.**

# **Partie bibliographique**

## 1 Généralités :

### 1.1 Origine et histoire :

L'olivier, arbre fruitier emblématique du bassin méditerranéen, est cultivé depuis des millénaires pour ses fruits et son huile précieuse. Son histoire se confond avec celle des civilisations méditerranéennes, laissant une empreinte profonde sur leur mythologie, religion, économie et mode de vie (Meriem, 2019).

Dès l'Antiquité, l'olivier était vénéré pour ses nombreuses vertus. Ses fruits nourrissaient les populations tandis que son huile servait à la fois pour l'alimentation, l'éclairage, les soins corporels et les rituels religieux.

Au fil des siècles, l'olivier s'est imposé comme un élément central de la culture méditerranéenne. Sa présence rythme les paysages, façonne les traditions culinaires et influence l'artisanat local. Son huile, symbole de richesse et de prospérité, continue d'être appréciée pour ses qualités gustatives et ses bienfaits pour la santé.

Aujourd'hui encore, l'olivier demeure un arbre précieux pour les populations méditerranéennes. Sa culture contribue à la préservation des paysages et des savoir-faire ancestraux, tout en offrant un produit d'exception : l'huile d'olive, véritable trésor de la gastronomie méditerranéenne (David, 2007).

#### 1.1.1 Description de l'olive :

L'olive est un fruit à noyau, de forme ovoïde et de couleur variable allant du vert au noir en fonction de sa maturité (Figure 1). Sa chair est charnue et huileuse.



**Figure 1:** Photographie montrant les olives à maturité.

### 1.1.2 Composition et valeur nutritive :

L'olive est un fruit riche en nutriments comprenant des lipides (15%), des glucides (4%), des minéraux, des vitamines, essentiellement la vitamine E, ainsi que des Antioxydants (polyphénols, tyrosol, hydroxytyrosol), Squalène, Chlorophylle et des caroténoïdes (Tableau I) (USDA, 2020).

**Tableau I:** Composition des olives (pour 100g) (ANSES., 2020).

Constituants	Quantités
Eau	75 g
Lipides	15 g
AGMI	10 g
AGPI	2 g
Glucides	4 g
Fibres alimentaires	2 g
Protéines	1 g
Sodium	450 mg
Potassium	160 mg
Vitamine E	10 mg
Fer	1 mg

### 1.1.3 Production et transformation :

L'olive produite à l'échelle mondiale est d'environ 30 millions de tonnes par an. L'Espagne, l'Italie et la Grèce sont les pays les plus producteurs. Les olives sont généralement récoltées d'octobre à décembre (**international, 2000**)

L'olive est transformée en :

- Huile d'olive : Consommée comme condiment ou utilisée dans la cuisine, l'huile d'olive est l'un des produits phares de la gastronomie méditerranéenne.
- Olives de table : Consommées crues, marinées ou transformées en tapenade, les olives constituent un savoureux apéritif ou un ingrédient pour de nombreuses recettes.
- Sous-produits : Les grignons d'olive (résidus de la production d'huile) et les feuilles d'olivier peuvent être valorisés pour la production de biocarburants, d'extraits naturels ou de compléments alimentaires (**FAO, organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, 2015**).



## 1.2 Les grignons d'olives :

### 1.2.1 1.2.1. Définition :

Le grignon d'olive est un sous-produit issu de la transformation des olives en huile d'olive. Il se compose des noyaux, de la peau et de la chair des olives broyées après l'extraction de l'huile. Le grignon d'olive représente environ 30% à 50% du poids initial des olives pressées.

La quantité de grignon d'olive produite est importante. Cela signifie que pour des millions de tonnes d'huile d'olive produites chaque année, des millions de tonnes de grignon d'olive sont également générés (HAMIDA, 2008).



**Figure 2 :** Le grignon d'olive.

### 1.2.2. Composition des grignons :

Sa composition est variable, le tableau II montre une estimation générale de sa composition pour 100 grammes de grignons d'olive.

**Tableau II:** Composition des grignons d'olive (*Council, 2017*)

Constituants	Quantités/ 100g
Eau	30 à 40 g
Matières grasses	10 à 20 g
Cellulose brute	30 à 40 g
Protéines brute	5 à 10 g
Sucre	2 à 5 g
Minéraux	3 à 5 g (potassium, phosphore, calcium, magnésium)
Composés phénoliques	1 à 2 g
Vitamines	Vitamine E (5.23mg) et vitamine K (13.9µg)

### 1.2.3. Production du grignon d'olive :

La production de grignon d'olive est intrinsèquement liée à celle de l'huile d'olive, représentant environ 30% à 50% du poids initial des olives. À l'échelle mondiale, on estime la production annuelle de grignons à environ 32 millions de tonnes (Cela représente environ **10 à 12%** de la production totale d'olives), dont 2,9 millions de tonnes proviennent d'Algérie (156.104 quintaux/an), (**CIO, 2019**).

Dont les principaux pays producteurs de grignon d'olive sont :

- L'Espagne (environ 11 millions de tonnes)
- L'Italie (environ 6 millions de tonnes)
- La Grèce (environ 3 millions de tonnes)
- Le Tunisie (environ 2 millions de tonnes)

Environ 50% des grignons d'olive sont utilisés pour la production d'huile de grignon d'olive, le reste est utilisé pour :

- L'alimentation animale (environ 30%)
- La production de biocarburant (environ 10%)
- Le compostage et l'épandage (environ 10%) (**Council, 2021**).

En tant que sous-produit de l'industrie oléicole, les grignons d'olive, tout comme les margines, constituent un enjeu environnemental majeur. Leur gestion inadéquate peut causer des pollutions néfastes pour la santé humaine et l'environnement, d'où l'importance de valoriser ce sous-produit doté de composés intéressants (**FAO, 2019**).

### 1.2.2 Valorisation et application du grignon d'olive :

Les résidus de l'extraction de l'huile sont les grignons d'olive, la plupart de cette production en Algérie est laissée sur place ou brûlée. Ainsi, l'exploitation des sous-produits oléicoles offre une opportunité de revenu supplémentaire qui pourrait aider à améliorer la rentabilité des exploitations oléicoles, c'est-à-dire : (**K., 2011**).

- Alimentation des animaux
- Production de panneaux à particules dans le secteur du bois ; la coque peut également être utilisée pour polir certaines surfaces métalliques.
- Les cendres qui peuvent être utilisées comme engrais grâce à leur concentration élevée en oxyde de potassium et en phosphore (**C. Koutroumanidis, 2005**).

Le grignon d'olive connaît un regain d'intérêt :

➤ **Source d'énergie renouvelable :**

- **Combustible** : séché, le grignon d'olive peut chauffer des habitations ou des bâtiments industriels.
- **Biogaz** : par méthanisation, il peut être transformé en biogaz, une source d'énergie renouvelable.

➤ **Applications dans l'alimentation animale :**

- **Fourrage** : séché et broyé, il devient nourriture pour le bétail.
- **Compléments alimentaires** : ses composés bioactifs peuvent enrichir l'alimentation animale.

➤ **Applications industrielles :**

- **Production de biochar** : le grignon d'olive peut être transformé en biochar, un amendement améliorant la fertilité des sols et stockant du carbone.
- **Extraction de composés bioactifs** : ses antioxydants et autres molécules intéressantes peuvent être utilisés dans les industries pharmaceutique et cosmétique.

➤ **Production d'huile :**

- **Extraction par solvants** : On peut extraire une huile d'olive de moindre qualité à partir du grignon d'olive.
- **Production de biodiesel** : L'huile de grignon d'olive peut être transformée en biodiesel, un substitut au diesel fossile.

La valorisation du grignon d'olive n'est pas sans défis. Sa composition varie selon les variétés d'olives et les processus d'extraction. Le coût du transport et du stockage peut également être un obstacle. La recherche et l'innovation sont donc cruciales pour optimiser les techniques de valorisation et en faire une solution durable et rentable.

## **1.3 Composés phénoliques des grignons d'olives :**

### **1.3.1 Définition et classification :**

Les grignons d'olives contiennent des composés phénoliques naturels, qui se trouvent dans la pulpe et la peau des olives, qui restent après l'extraction de l'huile. Ils font partie d'un vaste groupe de composés organiques qui se distinguent par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques phénoliques.

Ils se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs groupes hydroxyle (-OH) liés à un cycle aromatique (benzène).

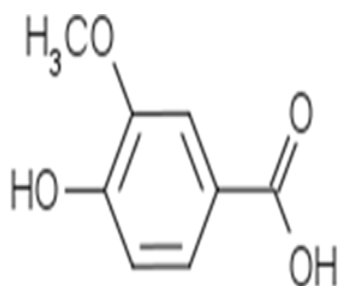
C'est la plus simple molécule de la famille des phénols.

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits, graines et bois). Et ils se retrouvent en quantités assez importantes dans tous les végétaux. Mais leur concentration et leur diversité varient considérablement.

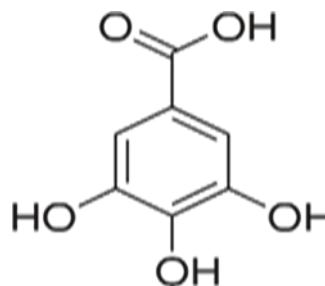
Ils sont classés en différents groupes selon leur structure chimique :

- **Acides phénolique :**

Il n'y a pas d'acides phénoliques simples, à l'exception de l'hydroquinone, présent dans certaines plantes. Les acides vanilliques, galliques et protocatéchiques sont des acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque. L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide caféique et l'acide protocatéchique sont des acides phénoliques présents dans les grignons d'olive (**Braca.A, 2010**).



Acide vanillique

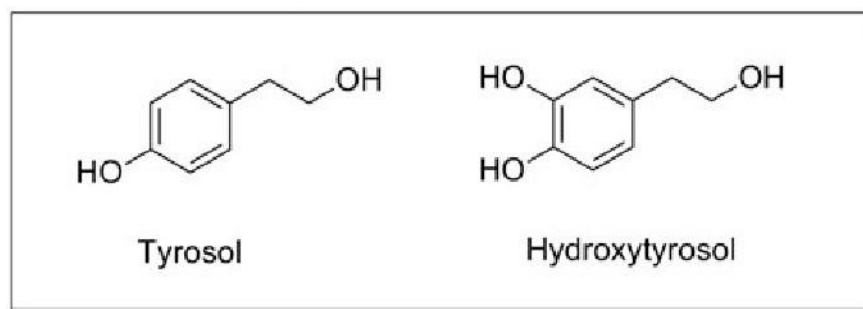


Acide gallique

**Figure 3:** Structure de quelques acides phénoliques des grignons d'olives (**Braca.A, 2010**).

- **Alcools phénoliques :**

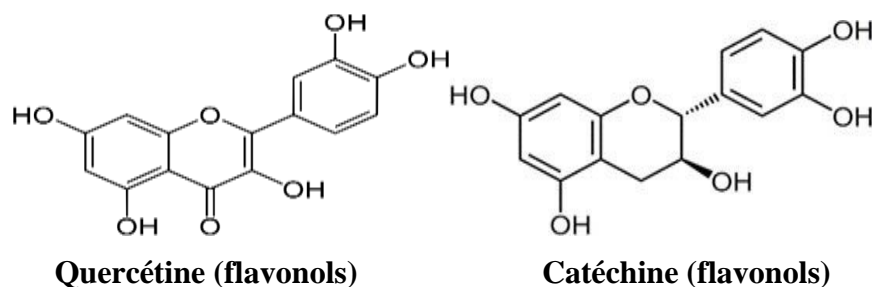
Le tyrosol (4-hydroxyphényléthanol) et l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphényléthanol) sont les alcools phénoliques les plus présents dans les grignons d'olives (**Tommasi.N, 2010**).



**Figure 4:** Structure de quelques alcools phénoliques des grignons d'olive.

- **Flavonoïdes :**

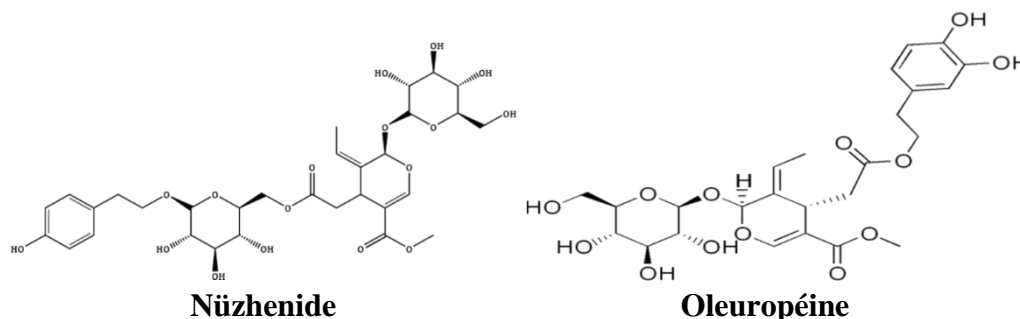
Parmi les composés phénoliques présents dans les grignons d'olive, on trouve des flavonoïdes, qui se subdivisent en plusieurs sous-classes : flavones, flavonols, anthocyanes et flavanones. Parmi ces flavonoïdes, la catéchine, la quercétine et le lutéoline-7-glucoside sont les plus abondants. La rutine, la quercétine, l'apigénine (**Edenharder, 2003**).



**Figure 5:** Structures des flavonoïdes des grignons d'olives (**Edenharder, 2003**).

- **Dérivés sécuridoïdes :**

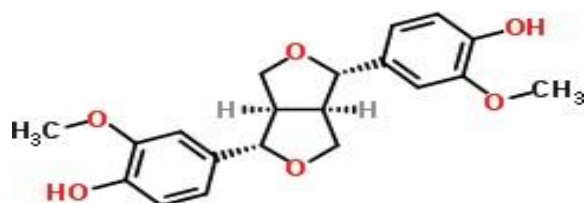
Il s'agit de glycosylés provenant du métabolisme secondaire des terpènes. Dans les grignons d'olive, les composés principaux sont l'oleuropéine et le nüzhenide (**Soler-Rivas C., 2000**)



**Figure 6 :** Structure des dérivés sécuridoïdes des grignons d'olives (**Soler-Rivas C., 2000**).

- **Lignanes :**

Les lignanes sont des substances phénoliques qui se trouvent dans toutes sortes de plantes, notamment les olives et leurs produits dérivés. Les lignanes, on retrouve des composés tels que le pinorésinol et l'acétoxypinorésinol dans les grignons d'olive (**Guil-Guerrero**) (**Bendini A., 2007**).



R : H - Pinosésinol  
R : OCOCH<sub>3</sub>- 1 – Acétoxypinosésinol

**Figure 7** : structure des lignanes des grignons d'olives (**Guil-Guerrero**)

### 1.3.2 Variété :

Les grignons d'olives sont riches en une grande variété de composés phénoliques, dont la concentration et la composition peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs :

- **Variété d'olive** : Les différentes variétés d'olives présentent des teneurs et des profils en composés phénoliques distincts.
- **Conditions de culture** : Les conditions climatiques, le sol et les pratiques agricoles peuvent influencer la concentration en composés phénoliques des olives.

**Méthode d'extraction de l'huile** : Les procédés d'extraction traditionnels et modernes peuvent avoir un impact sur la quantité et la nature des composés phénoliques préservés dans les grignons (**V. Garcia-Parra, 2015**)

On distingue deux grandes catégories de composés phénoliques :

- **Les phénols simples** : Ils ne comportent qu'un seul cycle aromatique et un ou deux groupes hydroxyle. Le phénol lui-même est le plus simple représentant de cette catégorie.
- **Les polyphénols** : Ils possèdent plusieurs cycles aromatiques et plusieurs groupes hydroxyle. Cette catégorie est très diverse et comprend des molécules comme les flavonoïdes, les tanins et les lignines (**Manach C, 2004**).

### 1.3.3 Propriété :

Les propriétés chimiques et physiques des composés phénoliques dépendent de leur structure et de leur composition. Ils peuvent être solubles dans l'eau ou dans les solvants organiques, et présentent une large gamme de propriétés :

- **Antioxydant** : Ils protègent les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres.
- **Anti-inflammatoire** : Ils réduisent l'inflammation dans l'organisme.
- **Antibactérienne** : Ils peuvent lutter contre les infections bactériennes.
- **Anticancéreuse** : Certains polyphénols ont montré un potentiel dans la prévention et le traitement du cancer.
- **Cardioprotectrice** : Ils peuvent réduire le risque de maladies cardiovasculaires.

### 1.3.4 Rôle :

Les composés phénoliques jouent de multiples rôles physiologiques dans divers aspects de la vie végétale et de l'utilisation des plantes par l'homme sont aujourd'hui largement reconnu :

- Dans certains domaines de la physiologie végétale (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains micro-organismes symbiotiques ou parasites, etc.)
- Dans les interactions entre les plantes et leur environnement biologique et physique (interactions avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), que ce soit directement dans la nature ou lors de la conservation post-récolte de certaines plantes.
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualité nutritionnelle...) qui guident les décisions humaines en matière de consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en sont issus par transformation.
- Lorsque certaines caractéristiques des végétaux sont modifiées au cours d'un traitement technologique (comme la préparation de jus de fruits, de boissons fermentées, etc.), où se produit fréquemment un brunissement enzymatique qui altère la qualité des produits finis.
- Pour protéger l'homme contre certaines maladies, grâce à leur interaction avec de nombreuses enzymes et à leurs propriétés antioxydantes (**Jacques Machiex, 2005**).

### 1.3.5 Bénéfices pour la santé humaine :

De nombreuses études scientifiques ont montré que la consommation régulière de composés phénoliques peut avoir des effets bénéfiques sur la santé, notamment :

- Réduction du risque de maladies cardiovasculaires.
- Réduction du risque de certains cancers.
- Amélioration de la fonction cognitive.
- Protection contre le vieillissement prématuré **(Pandey KB, 2009)**.



# **Chapitre 2 :**

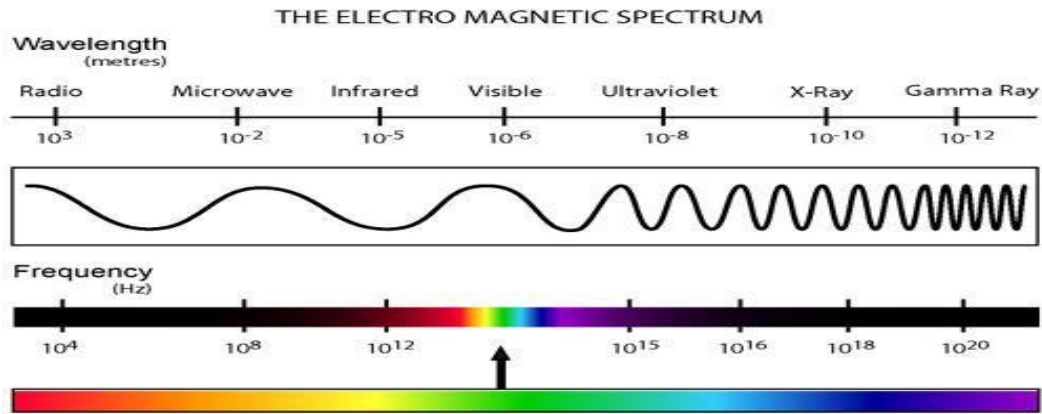
## Extraction assistée par Micro-onde

## **2.1 Histoire :**

Au cours des dernières années, l'intérêt pour l'utilisation de l'énergie micro-ondes pour traiter les échantillons a augmenté (**Camel2000**). L'utilisation du rayonnement micro-ondes pour le chauffage a été découverte en 1946, et les premiers micro-ondes domestiques ont été lancés en 1950 (**Mallakpour et Rafiee, 2011**). En 1975, Abu-Samra et al. Réalisation de la première analyse expérimentale de traces de métaux provenant de matériaux biologiques à l'aide d'un four domestique à micro-ondes. (**Björklund S. e., 2000**). En 1978, le premier micro-ondes commerciale destiné à être utilisé dans les laboratoires a été reconnu. (**Mallakpour, 2011**). De nombreuses publications ont été publiées sur l'extraction assistée par micro-ondes de métabolites secondaires des plantes depuis que l'irradiation par micro-ondes a été utilisée pour la première fois pour récupérer des composants importants à partir de matières végétales en 1986 (**Zhang H.-F. Y.-H., 2011**). De nos jours, cette méthode est utilisée dans une variété de secteurs, notamment la synthèse organique, les processus inorganiques, la création de catalyseurs et la chimie analytique (**Nóbrega, 2002**).

## **2.2 Micro-ondes :**

Micro-ondes est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde de 0,001 m à 1 m (c'est-à-dire avec une fréquence de  $3 \times 10^{11}$  Hz à  $3 \times 10^8$  Hz), qui peut être transmis sous forme d'onde (**Zhang H.-F. Y.-H., 2011**). Les longueurs d'onde comprises entre 0,01 et 0,25 m sont généralement utilisées pour les transmissions radar, et les longueurs d'onde restantes sont utilisées pour les télécommunications. Tous les fours à micro-ondes domestiques et les réacteurs à micro-ondes pour la synthèse chimique fonctionnent à une fréquence de 2,45 GHz, soit une longueur d'onde de 12,25 cm. Ceci est fait pour éviter que les fréquences des téléphones cellulaires et des télécommunications ne soient perturbées. La figure 2 montre la partie micro-ondes du spectre électromagnétique. Comme l'indique cette figure, cette région se situe entre l'infrarouge et les radiofréquences (**Motasemi, 2012**).



**Figure 8** : le spectre électromagnétique (Motasemi, 2012).

### 2.3 Principe :

Chaque système micro-ondes se compose normalement de trois parties de base : la source micro-ondes, le guide d'ondes et l'apporteur (Routray, 2012).

Avant que le mélange ne soit introduit dans l'équipement, l'échantillon en poudre est combiné avec une quantité exacte de solvant d'extraction (Routray, 2012). Les paramètres du processus tels que le choix du solvant, la température, la puissance des micro-ondes et le temps d'extraction sont des influences cruciales dans le MAE. Généralement, les rendements d'extraction dans le MAE augmentent à mesure que la puissance des micro-ondes augmente en raison d'un chauffage localisé, ce qui contribue à la rupture de la matrice. Cependant, il existe une limite au-delà de laquelle la puissance des micro-ondes peut entraîner une diminution du rendement d'extraction (Osorio-Tobón, 2020). L'impact direct des micro-ondes sur les molécules par conduction ionique et rotation dipolaire est à la base de la théorie du chauffage par micro-ondes. Ces deux mécanismes fonctionnent en même temps. Les ions se déplacent électrophorétiquement lorsqu'un champ électromagnétique est appliqué, ce qui est connu sous le nom de conduction ionique. La solution s'échauffe en raison du frottement causé par la résistance de la solution au mouvement des ions. La rotation d'un dipôle implique de le réaligner avec le champ appliqué. Les dipôles s'alignent et randomisent 4,9310 fois par seconde à 2450 MHz, la fréquence utilisée dans les appareils commerciaux, et ce mouvement moléculaire forcé provoque de la chaleur (Eskilsson, 2000). MAE peut extraire efficacement les composés phénoliques de solvants tels que l'eau, l'éthanol, le méthanol, l'acétone et leurs combinaisons. La méthode la plus souvent utilisée pour en récupérer les composés phénoliques est un mélange d'eau et d'éthanol (Osorio-Tobón, 2020).

**Tableau III:** Constantes physiques et facteurs de dissipation pour certains solvants couramment utilisés dans l'MAE (Eskilsson, 2000).

Solvant	Constante diélectrique $\epsilon'$	Moment dipolaire	Facteur de dissipation $\tan\delta$ ( $\times 10^{-4}$ )	Point d'ébullition ( $^{\circ}\text{C}$ )	Température de la cuve fermée
<b>Eau</b>	78,3	2,3	1570	100	156
<b>Ethanol</b>	24,3	1,96	2500	78	164

Le tableau 03 présente certains paramètres physiques, y compris les constantes diélectriques et les facteurs de dissipation, pour les solvants utilisés dans les extractions.

## 2.4 Facteurs influençant la performance de MAE

L'efficacité de la MAE repose fortement sur la sélection des conditions opératoires et des paramètres affectant les mécanismes d'extraction et le rendement. Les facteurs qui peuvent influencer les performances de MAE sont la nature du solvant, le rapport solvant/alimentation, le temps d'extraction, la puissance micro-ondes, la température, les caractéristiques de l'échantillon, l'effet de l'agitation .... Etc. Il est crucial de comprendre comment ces éléments affectent et interagissent avec les processus MAE (Chan, 2011).

## 2.5 Facteurs influençant l'extraction assistée par micro-ondes :

### 2.5.1 Puissance des micro-ondes :

L'intensité de la puissance appliquée par cet appareil est directement liée à une quantité d'énergie fournie à l'échantillon qui est transformée en énergie calorifique dans le matériel diélectrique en augmentant sa surface (Ma, 2009). En général, on a constaté que lorsque la puissance du micro-onde est augmentée, le rendement de l'extraction augmente également (Nemes, 2009).

### 2.5.2 Temps d'extraction :

Lorsque le délai d'extraction varie, le rendement de l'extraction varie également (Wang L., 2006). Il est essentiel de toujours optimiser la puissance de micro-onde pour prolonger la durée de l'extraction. Il est important de noter que le temps optimal d'extraction dépend de la

nature du solvant. L'utilisation de temps prolongés dans le but de maximiser le rendement peut entraîner la détérioration des produits (**Bagade, 2019**).

### **2.5.3 Température :**

La température a un impact direct sur la vitesse à laquelle le solide se déplace vers le solvant, ce qui a un impact sur l'efficacité de l'extraction. Le solvant, la matrice et la puissance de micro-onde sont principalement responsables de la température (**Camel2000**). En augmentant la température, la solubilité et la diffusivité de la solution augmentent et sa viscosité diminue. Les produits finis présentent des risques de dégradation thermique qui limitent la température opératoire (**J., 1996**).

### **2.5.4 Nature et choix du solvant :**

Selon (**Zhu, 2006**), les solvants couramment employés pour l'extraction par solvants sous micro-ondes sont l'hexane, le toluène, le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et l'éthanol. En cas de transparence du solvant aux micro-ondes, c'est-à-dire d'une faible permittivité, c'est le matériau végétal qui absorbera directement le rayonnement micro-ondes (**Kaufmann, 2002**).

D'autre part, lorsque le solvant absorbe les micro-ondes, le chauffage sera plutôt de nature conductrice : les micro-ondes permettront au solvant de se chauffer et ce dernier chauffera le matériel végétal par conduction (**Lucchesi, 2007**). Par conséquent, la sélection du solvant va influencer le type de chauffage, ce qui influencera le processus d'extraction et la composition finale du produit.

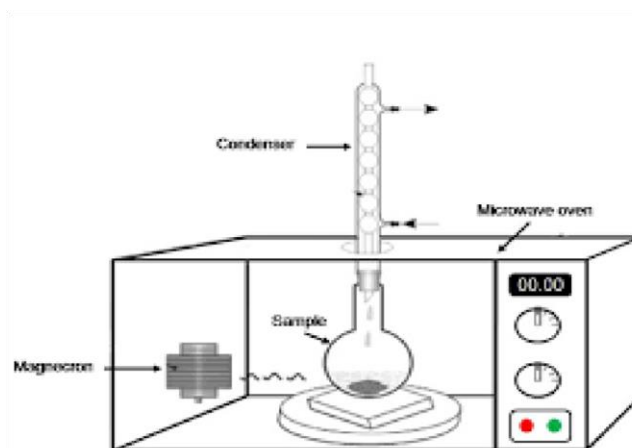
## **2.6 Avantages et inconvénients de l'extraction par micro-ondes :**

L'extraction assistée par micro-ondes présente de nombreux bénéfices par rapport aux méthodes plus classiques ; Il s'agit d'une méthode rapide (extraction rapide), économique (moins de solvant), sans danger thermique et avec un rendement d'extraction élevé (**Zhang H.-F. Y.-H., 2011**), Cependant, cela n'empêche pas qu'elle présente quelques désavantages ; Les dépenses d'investissement augmentent. Une éventuelle détérioration des matériaux thermosensibles (**Mandal V., 2007**).

## **2.7 Instrumentation :**

Le développement rapide des procédés MAE a incité divers fournisseurs à fournir des systèmes micro-ondes améliorés et des instruments connexes pour le processus d'extraction. La plupart des extracteurs micro-onde disponibles sont des systèmes construits en laboratoire basés sur un four à micro-ondes domestique (**Chan, 2011**).

Les fours à micro-ondes se composent de trois composants principaux ; la source, les lignes de transmission et l'applicateur. La source d'ondes microscopiques génère le rayonnement électromagnétique, et les lignes de transmission délivrent le rayonnement électromagnétique, et les lignes de transmission transmettent l'énergie électromagnétique de la source à l'applicateur dans lequel se trouve l'échantillon à traiter. De plus, de nombreux éléments peuvent être ajoutés et adaptés en fonction des besoins de l'expérience (**Cendres, 2010**).



**Figure 9:** équipement de micro-ondes (**Cendres, 2010**).

## **2.8 Avènement de l'extraction assistée par micro-ondes :**

Comme mentionné précédemment, l'extraction assistée par micro-ondes est reconnue comme une méthode flexible et efficace pour extraire les métabolites secondaires des plantes.

# **Chapitre 3 :**

# **Plan d'expérience**

### 3. Plan d'expérience

Le plan d'expériences vise à souligner et mesurer l'impact des paramètres pris en considération. Il est nécessaire de réaliser une série d'essais physiques ou de calculs numériques. Il arrive fréquemment dans les situations d'études techniques, d'amélioration de processus, d'études de moyens de production et d'essais en laboratoire (**Berger, Introduction to Experimental Design, 2017**).

Il existe plusieurs approches d'expériences, chacune ayant ses propres avantages et inconvénients. Certains sont conçus pour restreindre le nombre d'essais, tandis que d'autres sont complets ou adaptés à des conditions spécifiques. Il existe un vocabulaire spécifique à la méthodologie des plans d'expériences (**Yang, 2023**).

#### 3.1 Définition :

Le programme d'expérimentation est basé sur des techniques mathématiques et statistiques appliquées à l'expérience. Il s'agit d'une série d'essais planifiés à l'avance afin de déterminer précisément, en un nombre limité d'essais, l'impact de plusieurs paramètres sur une ou plusieurs réponses (**Ferreira, 2019**).

#### 3.2 Principe :

La méthode des plans d'expériences offre une solution à nos besoins. En pratique, elle implique de modifier simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs à chaque essai. Cette approche permet de réduire significativement le nombre d'expériences nécessaires tout en permettant l'étude de plusieurs facteurs et la détection des interactions entre eux, ainsi que l'identification des paramètres optimaux par rapport à une réponse donnée (**Faucher, 2006**).

Dans un plan d'expériences, la première étape est de recueillir un maximum d'informations sur le phénomène étudié (**Thyer, 2013**).

L'étude des plans d'expériences implique l'emploi de variables centrées réduites pour identifier les divers niveaux des facteurs, centrés sur 0, et réduits à l'intervalle  $[-1, +1]$ .

L'emploi de variables centrées réduites permet une comparaison plus efficace, car les disparités de domaine entre les facteurs sont supprimées. Le domaine expérimental joue un rôle essentiel dans la théorie des plans d'expériences.



### **3.3 Intérêts et objectifs de l'utilisation de plan d'expériences :**

Il existe une diversité de plans d'expériences qui peuvent être ajustés pour répondre à toutes les situations rencontrées par un expérimentateur. Leur utilisation vise à atteindre les objectifs suivants :

- Identifier les facteurs essentiels dans la conception d'un nouveau produit ou d'un processus innovant.
- Optimiser les paramètres d'un processus de fabrication ou d'un instrument de mesure.
- Prédire le comportement d'un processus par le biais de la modélisation.

D'après (**Cunningham, 2011**), la méthode des plans d'expériences repose sur deux concepts fondamentaux : celui de l'espace expérimental et celui de la modélisation mathématique des grandeurs que l'on étudie.

Le but de l'utilisation des plans est de comparer différentes options, de faire des criblages, de développer des modèles, de prédire, d'optimiser et d'optimiser les réponses multiples (**Berger, Introduction to Experimental Design , 2017**).

### **3.4 Avantage :**

Les plans d'expériences ont trois avantages majeurs :

- La précision des effets estimés (une étape essentielle à prendre en compte en premier lieu).
- L'équilibre du plan (l'orthogonalité du plan).
- Interaction entre les éléments (Sarotti, 2007).
- Élaboration du plan en utilisant des stratégies efficaces afin de réduire le nombre d'essais et d'ajouter le maximum de facteurs.
- Détection des optimaux.
- Plus de précision concernant les résultats.

On préfère toujours faire un plan d'expériences plutôt que d'étudier chaque facteur à la suite de l'autre.

# **Chapitre 4 :**

## Matériel et méthodes

#### **4.1 Échantillonnage :**

Le matériel végétal est constitué de grignons d'olives de la variété Azzeradj, procurés à partir d'une huilerie à Barbacha (Béjaia) en Décembre 2024. Les grignons d'olives ont été séchés à l'étuve à 50 C° pendant 3 jours, après séchage et broyage à l'aide d'un broyeur électrique la poudre obtenue a été tamisée en utilisant un tamis de granulométrie 500µm. La poudre récupérée est ensuite conservée dans une boîte en verre.



**Figure 10 :** Poudre de grignon d'olive.

#### **4.1 Produits chimiques :**

Les composés suivants ont été achetés à Sigma-Aldrich (Allemagne) : Réactif Folin-Ciocalteu, 1,1-diphényl-picrylhydrazyl (DPPH), carbonate de sodium, acide gallique, acide sulfurique, phosphate de sodium, molybdate d'ammonium,  $\alpha$ -amylase pancréatique de porc, trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), chlorure ferreux et ferrozine. Tous les solvants utilisés étaient de qualité analytique et achetés à Prolabo (France).

#### **4.2 Etude préliminaire :**

Une étude préliminaire a été réalisée afin de sélectionner les facteurs influençant l'extraction des composés phénoliques totaux (TPC) à partir du grignon d'olive et d'établir les niveaux de variables.

Quatre paramètres influençant l'extraction par micro-onde ont été étudiés un à un dans l'étape préliminaire en modifiant chaque paramètre seul. À chaque modification, la valeur qui offre le meilleur rendement en composés phénoliques était choisie afin de procéder au paramètre qui vient après de la manière suivante :

**a) La concentration d'éthanol : 20%, 40%, 60% et 80%.**

b) **La puissance** : 100W, 200W, 300W, 400W, 500W, 600W, 700W, 800W et 900W.

c) **Le temps**: 30s, 60s, 90s, 120s, 150s, 180s, 210s, 240s, 270s, 300s, 330s et 360s.

d) **Le ratio** : 20mL/g, 30mL/g, 40mL/g, 50mL/g et 60mL/g.

Les valeurs fixées pour la concentration d'éthanol, la puissance, le temps et le ratio étaient respectivement : **40%, 500W, 300s, 40mL/g.**

La méthodologie de surface de réponse (MSR) a été utilisée pour déterminer l'influence des paramètres et leurs interactions ainsi que les conditions optimales d'extraction.

### **4.3 Extraction et dosage des composés phénoliques :**

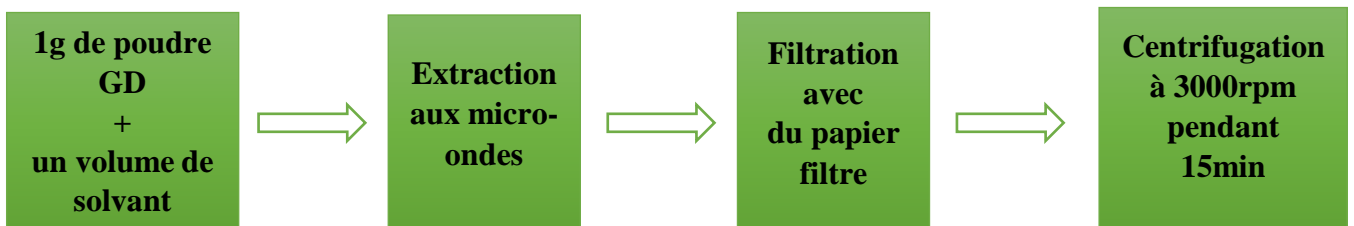
#### **4.3.1 Extraction :**

L'appareil d'extraction utilisé est un micro-ondes modifié au niveau de laboratoire de Biochimie Biophysique Biomathématiques et Scientométrie (3BS)



**Figure 11:** Illustration d'équipement micro-ondes.

L'étape d'extraction réalisée est résumée dans le schéma ci-dessous :



**Figure 12:** Protocole de l'extraction par micro-ondes.

Une fois l'étude préliminaire terminée, les niveaux de facteurs ont été établis et un plan composite centré réduit a été élaboré en prenant en compte trois facteurs : la concentration d'éthanol, la puissance d'extraction et le temps.

### 4.3.2 Dosage des composés phénoliques totaux

Le contenu en CPT a été déterminé par la méthode de Folin Ciocalteu rapporté par (Velioglu, 1998) Un volume de 100  $\mu$ l d'extrait a été additionné à un volume de 1 mL du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois). Un temps de 5 minutes à température ambiante a été nécessaire pour ajouter 1 mL de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 6%. Une fois que l'agitation et l'incubation ont été effectuées pendant 30 min à température ambiante, les absorbances ont été mesurées à 750 nm.

L'acide gallique a été utilisé comme standard pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage.

### 4.4 Préparation des extraits secs :

Les extraits obtenus dans les conditions idéales ont été placés dans des boîtes pétries, puis séchés dans une étuve à une température de 50°C pendant 24 heures.

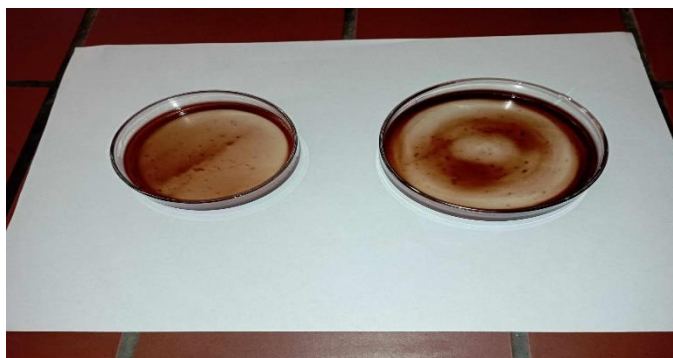


Figure 13 : Photographie de l'extrait après séchage.

### 4.5 Activité antioxydante :

#### 4.5.1 Effet « scavenger » sur le radical DPPH :

La méthode utilisée pour évaluer l'effet « scavenger » du radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) a été évalué par (Haddadi-Guemghar, 2014).

Un volume de 1 mL d'extrait à différentes concentrations (200 - 1000  $\mu$ g/mL) est mélangé avec un volume de 0,5 mL du DPPH. Le mélange est incubé pendant 30 min dans l'obscurité à température ambiante.

L'absorbance des solutions est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 515 nm.

L'extrait a été remplacé par le Trolox (équivalent hydrosoluble de l'atocophérol) comme standard.

L'équation suivante a été utilisée pour calculer l'activité scavenger du radical DPPH pour chaque échantillon :

$$\text{Activité scavenger (\%)} = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100$$

Où  $A_C$  et  $A_E$  sont l'absorbance à 515 nm du contrôle et de l'échantillon, respectivement.

#### **4.5.2 Effet « scavenger » sur le radical d'ABTS :**

La méthode de radicale ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres (Djeridane A. Y., 2006). Il est basé sur la neutralisation d'un radical - cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 -éthylbenzothiazoline -6- sulfonique acide) (ABTS).

En mélangeant une solution mère d'ABTS avec un volume de persulfate de potassium  $K_2S_2O_8$ , on obtient le radical cation ABTS. Cette solution est conservée à l'abri de la lumière et à une température ambiante pendant 16 heures avant d'être utilisée.

Un volume de 2000 $\mu$ L de la solution ABTS préparée a été ajouté à 150 $\mu$ L d'extrait à différentes concentrations (200 à 1000 $\mu$ g/mL) et la lecture a été réaliser à 734 nm après 2h d'incubation. Le contrôle : 2000 $\mu$ L d'ABTS + 150 $\mu$ L de l'eau distillée (Djeridane A. Y., 2006).

$$\text{Pourcentage inhibition (\%)} = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100$$

Où  $A_C$  et  $A_E$  sont l'absorbance à 734 nm du contrôle et de l'échantillon, respectivement.

#### **4.5.3 Activité antioxydante totale :**

L'activité antioxydante totale a été mesuré par la méthode de phosphomolybdate décrite par (Sethiya, 2014). Différentes concentrations d'extrait (200 à 1000 $\mu$ g/mL) ont été ajoutées à 2 mL de la solution réactive (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium, 4 mM d'ammonium molybdate). Le mélange est incubé dans un bain marie à 90°C pendant 90 min.

L'absorbance est mesurée à 695nm.

#### 4.6 Chélation des ions de fer ferreux :

La méthode utilisant la ferozine décrite par (Liu, 2008) a permis de mesurer le pouvoir chélateur du fer ferreux grâce aux extraits de grignon d'olive. En ajoutant respectivement 1,5 mL d'eau distillée et 0,1 mL de FeCl<sub>2</sub> à 0,5 ml de la solution d'extrait à des concentrations différentes (200 – 1000µg/mL), le mélange est incubé pendant 5 minutes. Ensuite, on ajoute 0,2 mL de la solution de ferozine une lecture à 562nm a été effectué après 10 minutes.

**Le référent utilisé est l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique), qui est un puissant chélateur capable de capter les ions métalliques qui ont un impact sur la stabilité et/ou l'apparence des produits.**

La formule suivante est utilisée pour déterminer la capacité de chélation du fer.

$$\text{Pourcentage de chélation de fer (\%)} = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100$$

A<sub>C</sub> : absorbance du contrôle.

A<sub>E</sub> : absorbance d'extrait.

#### 4.7 Activité antidiabétique (invitro) :

L'activité antidiabétique des extraits de grignon d'olive a été évaluée par le test d'inhibition α-amylase dans des tubes à essai, 500 µL d'extrait de grignons d'olive à différentes concentrations (200-1000 µg/mL) ont été ajoutés à 500 µL de solution d'α-amylase (0,5 mg/mL dans un tampon de phosphate de sodium 0,02 M pH 6,9) Cette solution a été pré-incubée à 25°C pendant 10 minutes. Un volume de 500 µL de solution d'amidon à 1% dans un tampon phosphate de sodium 0,02 M (pH 6,9) a été ajouté et incubé à 25°C pendant 10 minutes. Après avoir ajouté 1000 µl de réactif d'acide dinitrosalicylique (DNS), les tubes ont été incubés dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes, puis refroidis à température ambiante. Le mélange réactionnel a été dilué avec 2 ml d'eau distillée et l'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis. Le contrôle a été préparé selon la même procédure, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée, tandis que l'activité de l'étalon a été testée en remplaçant l'extrait par de l'acarbose à différentes concentrations (20-100 µg/mL). L'activité inhibitrice de l'α-amylase a été calculée en pourcentage d'inhibition à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100$$

**A<sub>C</sub>** : absorbance du contrôle.

**A<sub>E</sub>** : absorbance d'extrait / Acarbose

#### 4.8 Activité anti-inflammatoire :

Le test a été utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire en utilisant la dénaturation des protéines qui sont responsables d'inflammation. La dénaturation protéique a été inhibée en utilisant la méthode de **(Kar, et al., 2012)**.

Un volume de 1ml d'extrait à différentes concentrations (200-1000µg/mL) a été ajouté à 4,5mL de BSA.

Les échantillons ont été incubés dans un bain Marie à 37°C pendant 20 min ensuite à 57°C pendant 3 min, après refroidissement un volume de 2,5 mL de la solution tampon phosphate à pH 6,4 a été ajoutée.

L'absorbance a été mesurée à 660 nm et l'endométhacine

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique a été calculé comme suit :

$$\text{Le pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100$$

**A<sub>C</sub>** : absorbance du contrôle négatif.

**A<sub>E</sub>** : absorbance d'extrait / indométacine.



# **Chapitre 5 :**

## Résultats et discussion

## 5.1 Etudes préliminaire :

Les études préliminaires offrent la possibilité de déterminer le domaine expérimental pour chaque variable indépendante, ce qui facilitera la conception du plan d'expérience.

### 5.1.1 Effet de la concentration du solvant sur l'extraction :

Pour étudier l'impact de la concentration du solvant sur l'extraction des CPT, différentes concentrations de solvants (Ethanol 20%, 40%, 60% et 80%) ont été employées, avec les autres conditions d'extraction telles que le temps d'extraction de 300s et la puissance de 500W. Le tableau IV résume les résultats obtenus pour les diverses concentrations d'éthanol. Selon les résultats obtenus, c'est l'éthanol 40% qui a obtenu le meilleur taux de CPT de manière significative. Dans le plan d'expérience, l'intervalle entre 20% et 80% d'éthanol a été choisi comme domaine expérimental.

**Tableau IV:** Effet de la concentration de l'éthanol sur l'extraction des composés phénoliques.

Ethanol	Eau	20%	40%	60%	80%
CPT (mg/100g)	1492,96 ± 122,19c	1730,83 ± 85,87b	1997,93 ± 65,61a	1994,06 ± 31,72a	1569,36 ± 45,33bc

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écartype. Des lettres différentes indiquent une différence significative selon l'ANOVA et le test de Tukey ( $p < .05$ ).

### 5.1.2 Effet de la puissance sur l'extraction :

Le tableau V résume l'effet de la puissance sur le rendement de l'extraction. Les résultats obtenus indiquent que la puissance d'extraction a eu une influence significative sur l'extraction des CPT ( $p < 0.05$ ). L'extraction des CPT s'accroît à mesure que la puissance augmente jusqu'à 600W puis elle commence par diminuer. L'intervalle 300W jusqu'à 900W a été choisi pour la construction du plan.

**Tableau V :** Effet de la puissance sur l'extraction des composés phénoliques.

La puissance (W)	100	200	300	400	500	600	700	800	900
CPT (mg/100g)	2026,53 ± 16,71e	2149,63 ± 48,49 de	2432,50 ± 34,56cd	2576,46 ± 82,38c	3165,63 ± 58,85b	3628,80 ± 149,94a	3583,43 ± 166,99a	2499,66 ± 157,64c	2396,66 ± 212,84cd

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écartype. Des lettres différentes indiquent une différence significative selon l'ANOVA et le test de Tukey ( $p < .05$ ).

### 5.1.3 Effet du temps sur l'extraction :

Le tableau VI montre que le temps d'extraction (30s, 60s, 90s, 120s, 150s, 180s, 210s, 240s, 270s, 300s, 330s et 360s.) influence significativement ( $p < 0,05$ ) sur le rendement en TPC. Ce dernier augmente avec l'augmentation du temps puis commence à diminuer à partir de 240s donnant une valeur maximale à 210s. L'intervalle 120s (2mn) à 360s (6mn) a été choisi pour le plan.

**Tableau VI :** Effet de temps sur l'extraction des composés phénoliques

Temp s (S)	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	360
<b>CPT</b> (mg/100 g)	2140,2 6 ± 69,54d	2330,2 6 ± 104,62 cd	2532,7 3 ± 29,77b cd	2513,53 ± 422,18b cd	2742,2 ± 28,86a bc	2651,4 3 ± 24,74a bc	3051, 9 ± 57,78 a	2784, 1 ± 67,57a b	2895,8 3 ± 182,08 ab	2550,2 ± 89,32b cd	2771,9 ± 149,30a bc

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écartype. Des lettres différentes dans la même colonne indiquent une différence significative selon l'ANOVA et le test de Tukey ( $p < .05$ ).

### 5.1.4 Effet du ratio sur l'extraction :

L'impact du ratio sur l'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olives est montré dans le tableau VII. Le rendement de l'extraction augmente légèrement après un ratio de 30g/mL puis il se stabilise après 40g/mL et de ce fait le ratio a été fixé à 40g/mL pour le reste de l'étude.

**Tableau VII :** Effet du ratio sur l'extraction des composés phénoliques.

Ratio (mL/g)	20	30	40	50	60
<b>CPT</b> (mg/100g)	1000,76 ± 37,70c	1061,33 ± 45,68b	1175,33 ± 21,35a	1190,16 ± 11,61a	1187,86 ± 92,07a

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écartype. Des lettres différentes dans la même colonne indiquent une différence significative selon l'ANOVA et le test de Tukey ( $p < .05$ ).

## 5.2 Optimisation de la procédure d'extraction assistée par micro-ondes :

On a évalué l'efficacité de l'extraction du procédé à micro-ondes en étudiant les niveaux de CPT (composés phénoliques totaux) dans l'extrait de grignon d'olive. On a créé un

modèle polynomial de deuxième ordre en utilisant des conditions opérationnelles telles que la concentration du solvant A, la puissance d'extraction B et le temps d'extraction C.

Pour l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques, 20 essais ont été réalisés selon le plan composite centré.

**Tableau VIII** : Résultats des essais du plan d'expérience (Plan expérimental de l'optimisation de l'extraction assistée par micro-ondes des CPT à partir de grignon d'olive).

Nombre D'essais	Concentration D'éthanol (%)	Puissance (W)	Temps D'extraction (mn)	TPC	TPC prédit
01	50	600	2	2021,31	2027,34
02	50	600	4	2078,92	1986,46
03	80	300	2	560,31	474,89
04	20	300	6	2042,26	2039,58
05	50	600	4	2059,99	1986,46
06	50	600	6	2283,14	2185,48
07	80	900	6	979,24	953,51
08	50	600	4	1942,77	1986,46
09	20	900	2	1691,41	1696,58
10	50	600	4	1932,29	1986,46
11	50	600	4	1978,23	1986,46
12	80	600	4	685,99	753,80
13	50	600	4	1843,27	1986,46
14	80	300	6	754,57	672,31
15	20	900	6	1807,12	1815,45
16	20	600	4	1895,13	1835,68
17	80	900	2	974,50	900,10
18	50	900	4	2026,55	1913,18
19	50	300	4	1790,91	1812,64
20	20	300	2	1728,07	1776,70

### 5.3 Ajustement du modèle :

Les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle polynomial quadratique ajusté pour la performance CPT sont présentés dans le tableau n°06. Le test F suggère que le modèle a une valeur F très élevée et une valeur p très faible ( $p < 0,0001$ ), indiquant que le modèle était très significatif. Le manque d'ajustement mesure l'échec du modèle à représenter les données dans le domaine expérimental à des points qui ne sont pas inclus dans la régression. La valeur p de l'absence d'ajustement était supérieure à 0,05 ce qui indique qu'elle n'était pas statistiquement significative par rapport à l'erreur pure et que l'équation du modèle

était adaptée à la prédiction des performances du CPT pour toute combinaison de valeurs de variables.

**Tableau IX:** ANOVA pour l'effet de la concentration d'éthanol, de la puissance et du temps d'extraction sur le rendement en CPT.

Source	Somme des carrés	Df	Carrés des moyennes	Valeur F	Valeur p Prob > F	
<b>Modèle</b>	5,362E+006	9	5,958E+005	82,93	< 0.0001	significatif
<b>Concentration d'éthanol (A)</b>	2,714E+006	1	2,714E+006	377,76	< 0.0001	
<b>Puissance de Micro-onde (B)</b>	36327,14	1	36327,14	5,06	0,0483	
<b>Temps d'extraction (C)</b>	79338,21	1	79338,21	11,04	0,0077	
<b>AB</b>	1,037E+005	1	1,037E+005	14,43	0,0035	
<b>AC</b>	6664,93	1	6664,93	0,93	0,3582	
<b>BC</b>	18818,97	1	18818,97	2,62	0,1366	
<b>A<sup>2</sup></b>	1,404E+006	1	1,404E+006	195,40	< 0.0001	
<b>B<sup>2</sup></b>	25489,41	1	25489,41	3,55	0,0890	
<b>C<sup>2</sup></b>	59606,80	1	59606,80	8,30	0,0164	
<b>Résiduel</b>	71838,78	10	7183,88			
<b>Manque d'ajustement</b>	33625,15	5	6725,03	0,88	0,5541	Non significatif
<b>Erreur pure</b>	38213,62	5	7642,72			
<b>Cor total</b>	5,434E+006	19				

Plusieurs analyses statistiques descriptives, dont le coefficient de détermination ( $R^2$ ), le coefficient de détermination ajusté ( $AdjR^2$ ), le coefficient de détermination prédit ( $Pred. R^2$ ), la précision appropriée (Adeq Precision) et le coefficient de variation (CV), ont été utilisées pour évaluer la qualité de l'ajustement du modèle (Tableau n°7).

La valeur  $R^2$  était de 0,9868, ce qui suggère que la variation de l'échantillon était statistiquement significative à 98,68% et que le modèle ne pouvait représenter qu'environ 1,32% (approximativement) de la variance globale. En d'autres termes, un coefficient de détermination proche de 1 indique un degré élevé de corrélation entre les données observées et prédites (Figure n°14).

L' $Adj R^2$  et le  $Pred R^2$  de CPT étaient également satisfaisants pour confirmer l'importance du modèle. La relation entre le  $Pred R^2$  et l' $AdjR^2$  était raisonnablement proche, avec une différence de 0,0297 entre les deux paramètres, inférieure à 0,10. Le coefficient de variation

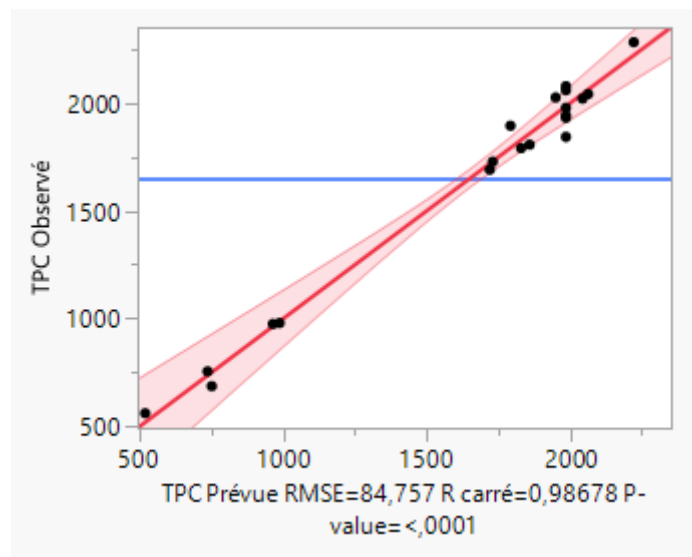
(CV) représente le niveau de dispersion des données. En règle générale, une valeur de CV faible entraîne une meilleure reproductibilité, tandis qu'une valeur de CV élevée indique une grande variance de la valeur moyenne et l'incapacité à élaborer un modèle de réponse adéquat.

Le coefficient de variation (CV) est utilisé pour évaluer la répartition des données. En règle générale, un CV de petite valeur permet une meilleure reproductibilité, tandis qu'un CV élevé indique une variation élevée de la valeur moyenne et ne permet pas de développer un modèle de réponse adéquat de manière satisfaisante (Manikandan, 2012).

En général, le CV ne devrait pas être supérieur à 10% et dans le cas de cette étude le CV était dans une fourchette acceptable (5,13%) (Liyanapathirana & Shahidi, 2005).

**Tableau X:** Paramètres descriptifs de l'ajustement du modèle.

<b>Std.Dev</b>	84,76	<b>R-carrés</b>	0,9868
<b>Moyenne</b>	1653,80	<b>R-carré ajusté</b>	0,9749
<b>CV %</b>	5,13	<b>R-carré prédictif</b>	0,9452
<b>Adeq précision</b>	28,424		



**Figure 14 :** Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites.

#### **5.4 Signification des variables :**

La valeur p a été utilisée pour évaluer la signification de chaque coefficient et la force des interactions entre chaque variable indépendante. Une valeur de p inférieure à 0,05 signifie que les termes du modèle sont importants. Dans cette situation, les éléments clés qui

ont un impact sur l'extraction des CPT étaient la concentration du solvant, le temps d'extraction, l'interaction temps-puissance, le temps d'extraction et, en dernier lieu, la puissance d'extraction.

Tous les termes non significatifs ( $p > 0,05$ ) ayant été supprimés, le modèle quadratique ajusté pour le CPT dans les variables codées est représenté dans l'équation suivante :

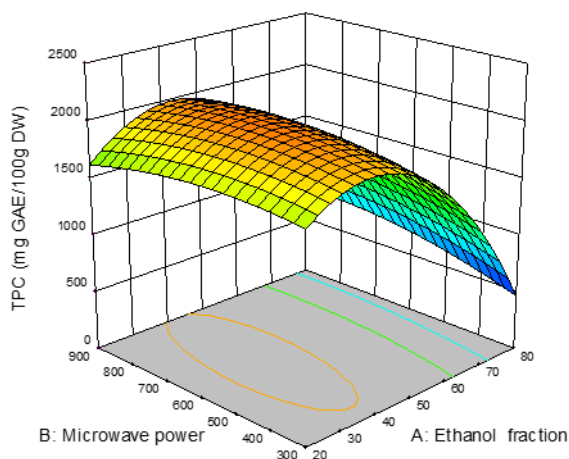
$$\text{CPT} = +1985,55 - 520,94*A + 60,27*B + 89,07*C + 113,83*AB - 714,45*A^2 + 147,23*C^2 \text{ (Éq. 1).}$$

### 5.5 Analyse de la surface de réponse :

La représentation graphique en trois dimensions de la surface de réponse 3D a été employée afin de mesurer l'impact individuel et cumulatif de l'interaction entre les variables. La surface de réponse examine la configuration géométrique de la surface, ainsi que les valeurs maximales et minimales de celle-ci. Elle propose une approche qui permet de représenter visuellement la corrélation entre les réponses et les niveaux expérimentaux de chaque variable, ainsi que le type d'interactions entre deux variables du test (Zhong, 2010).

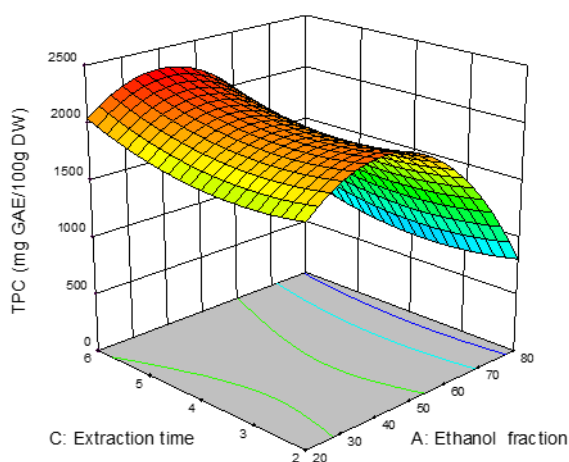
La figure n°15 est un graphique de surface de réponse montrant l'interaction entre la concentration d'éthanol et la puissance d'extraction sur le rendement en CPT en maintenant le temps d'extraction constant. En augmentant la concentration d'éthanol et la puissance d'extraction dans le domaine expérimental choisi.

Le rendement d'extraction augmente jusqu'à environ 2000 mg GAE/100g avec la concentration en éthanol de 50%. Par contre, le rendement CPT augmente de 1600 mg GAE/100g avec l'augmentation de la puissance de 300 W à 600 W, Au-delà de cette puissance le rendement en CPT diminue et arrive à 1600 mg GAE/100g d'extrait de grignon d'olive avec l'augmentation de la puissance à 900W.



**Figure 15:** Courbe 3D de l'effet d'interaction de paramètres de concentration d'éthanol et de la puissance sur le rendement en CPT.

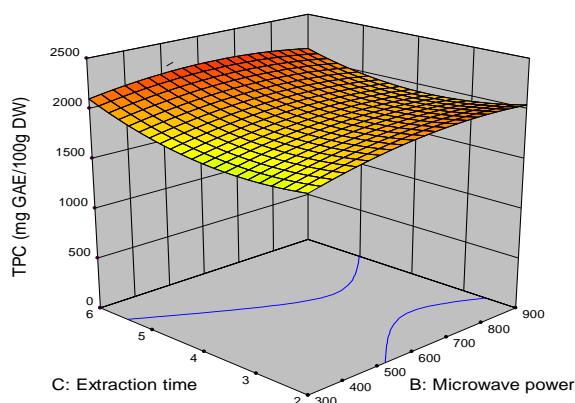
La figure n°16 est un graphique de surface de réponse indiquant qu'en augmentant la concentration en éthanol et en prolongeant le temps, le rendement d'extraction (CPT) augmente progressivement pour atteindre son maximum 2300 mg GAE/100g de l'extrait de grignon d'olive



**Figure 16 :** Courbe 3D de l'effet d'interaction de paramètres de concentration d'éthanol et de temps d'extraction sur le rendement en CPT.



La figure n°17 montre l'effet de la puissance et le temps d'extraction sur la quantité en CPT. Le rendement en CPT augmente avec le prolongement du temps d'extraction jusqu'à atteindre une valeur de 2200 mg GAE/100g de l'extrait de grignon d'olive à 300s (5 min).



**Figure 17 :** Courbe 3D de l'effet d'interaction de paramètres de la puissance et de temps d'extraction sur le rendement en CPT.

### 5.6 Conditions d'extractions optimales :

À l'aide d'un modèle quadratique pour expliquer l'expérience, nous avons amélioré trois variables expérimentales afin d'optimiser l'extraction des composés phénoliques des grignons d'olives.

Grâce à l'utilisation de la fonction de désirabilité (Figure n°18), les conditions optimales pour extraire les composés phénoliques avec une désirabilité de 0,9705 ont été établies comme suit : Le solvant d'extraction consiste en 40% d'éthanol, avec une puissance d'extraction de 500W et un temps d'extraction de 300s (5min).

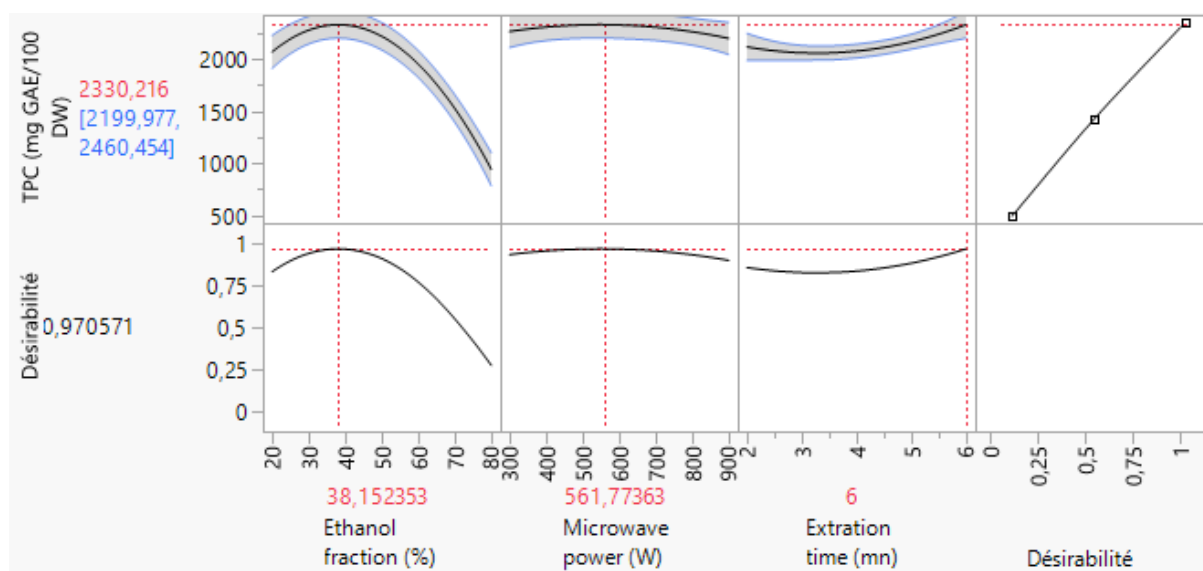


Figure 18 : Profils des valeurs prédites et de la fonction de désirabilité.

### 5.7 Validation du modèle :

Les conditions optimisées obtenues par la méthodologie de surface de réponse sont utilisées pour valider le modèle prédit pour l'extraction des composés phénoliques des grignons d'olives. Les valeurs expérimentales sont raisonnablement proches des valeurs prédites, ce qui confirme la validité et l'adéquation du modèle prévu, comme le montre le tableau XI. La différence entre la valeur prédite et la valeur expérimentale n'est pas significative.

Tableau XI: Conditions optimales pour l'extraction des CPT (mg EAG/g) de l'extrait de grignon d'olive.

	Concentration D'éthanol (%)	Puissance (W)	Temps D'extraction (S)	Valeur prédite (mgEAG/100g)	Valeur expérimentale (mgEAG/100g)
CPT (mgEAG/100g)	40	500	300	2330,21±130,24	2353,34± 98,77

### 5.8 Activité anti-oxydante :

Afin de mieux évaluer les propriétés antioxydantes de l'extrait du grignon d'olive, cinq tests supplémentaires ont été effectués, mettant en évidence différents mécanismes antioxydants (DPPH, ABTS, activité antioxydante totale et chélation du fer ferreux) :

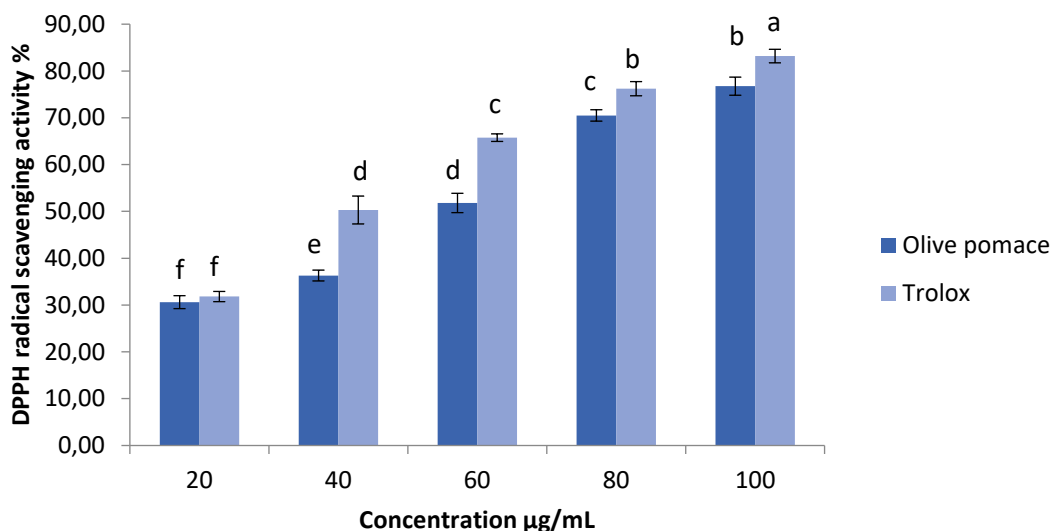
#### 5.8.1 Effet « scavenger » sur le radical DPPH :

Les effets « scavenger » désignent la capacité d'une substance à capturer ou à neutraliser les radicaux libres, tels que le radical DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl), qui est un composé utilisé pour évaluer l'activité antioxydant d'une substance. Il se manifeste sous la forme d'un radical libre stable violet. Il se métamorphose en une forme non radicalaire et stable lorsqu'il réagit avec des antioxydants. Lorsqu'un échantillon est mélangé avec une solution de radical DPPH, elle réagit avec ce radical libre, ce qui entraîne une baisse de l'intensité de la couleur violette. Cette réaction témoigne de la présence de propriétés antioxydants dans l'échantillon. Selon la figure 19, on observe une augmentation de l'effet « scavenger » sur le radical DPPH lorsque les concentrations de l'extrait de grignon d'olive et du Trolox augmentent. Cela suggère que l'extrait présente une forte activité antioxydant.

La figure ci-dessous montre que le grignon d'olive a une activité relative de piégeage des radicaux libres supérieure à celle du trolox à toutes les concentrations testées.

L'activité relative de piégeage des radicaux libres du grignon d'olive augmente avec la concentration.

La valeur IC<sub>50</sub> est la concentration d'un composé nécessaire pour inhiber de 50 % l'activité d'un radical libre. Les valeurs IC<sub>50</sub> pour le grignon d'olive et le trolox étaient respectivement de 42,19 µg/mL et de 103,50 µg/mL. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de l'histogramme, qui montrent que le grignon d'olive a une activité anti-radicalaire relative plus élevée que le trolox.



**Figure 19:** Pourcentage de pouvoir scavenger du radical DPPH de l'extrait de grignon d'olive à différentes concentrations comparé avec le trolox.

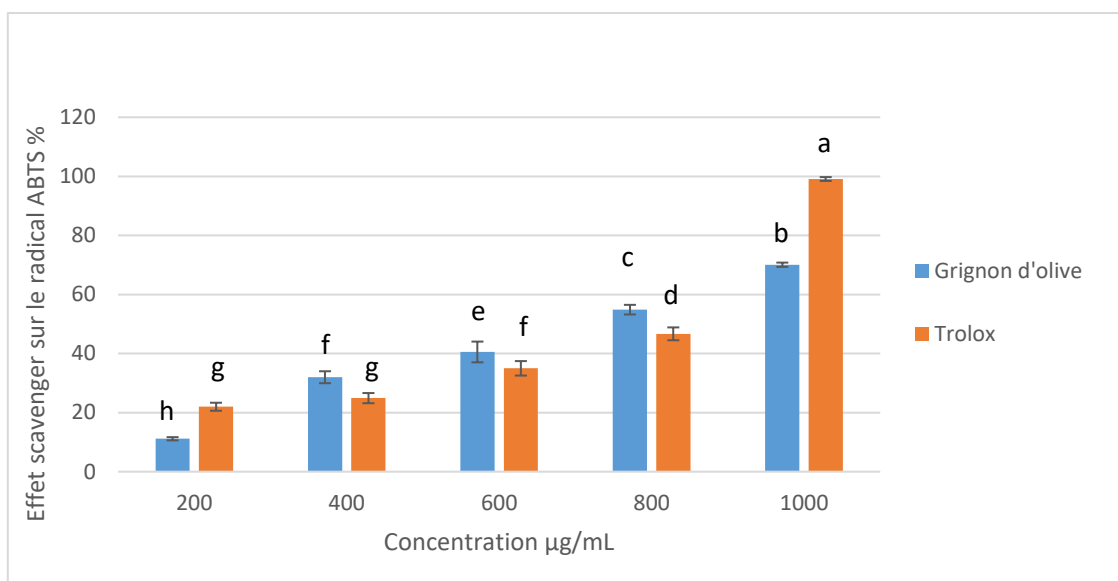
- La même lettre indique l'absence de différence significative ( $p < 0,05$ ) avec  $a > b > c > d > e > f > g > h$  et les barres verticales indiquent les écarts types (nombre d'essais=3).

### 5.8.2 Effet « scavenger » sur le radical d'ABTS :

Le test ABTS, qui est une abréviation de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), est un test chimique qui permet d'évaluer l'activité antioxydante d'un lot. C'est une approche couramment employée pour évaluer la capacité des antioxydants à neutraliser les radicaux libres. Il s'appuie sur la capacité des antioxydants présents dans l'échantillon à neutraliser le radical cation ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical).

La figure n°20 montre que la capacité antioxydante de l'extrait de son de grignon d'olive a été importante 70,06% pour 1000µg/mL, et qu'elle augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait de grignon d'olive. Trolox présente des propriétés antioxydantes plus fortes pour capter les radicaux ABTS comparativement au Grignon d'olive sur la gamme de concentrations testée.

Trolox atteint un effet scavenger significativement plus élevé, se rapprochant de 100%, tandis que Grignon d'olive présente également une activité accrue par rapport aux concentrations plus faibles, mais reste en dessous de Trolox.



**Figure 20 :** Pourcentage de pouvoir scavenger du radical d'ABTS de l'extrait de grignon d'olive à différentes concentrations comparé avec le trolox.

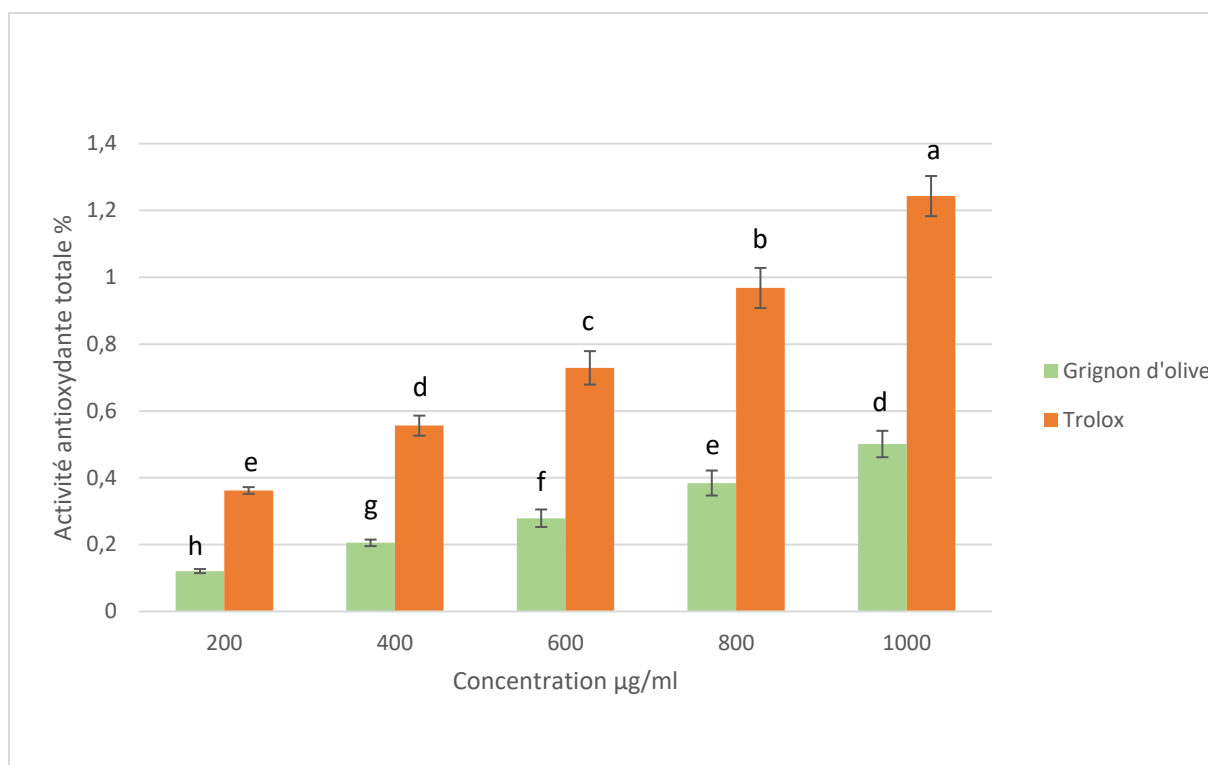
La même lettre indique l'absence de différence significative ( $p < 0,05$ ) avec  $a > b > c > d > e > f > g$  et les barres verticales indiquent les écarts types (nombre d'essais=3).

### 5.8.3 Activité antioxydante totale :

L'activité antioxydante totale de l'extrait de grignon d'olive a été importante. La figure n°21 montre que l'activité antioxydante totale augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait de grignon d'olive et du Trolox.

Le Grignon d'olive possède des propriétés antioxydantes significatives, il est moins efficace que le Trolox. Cependant, le Grignon d'olive représente une source naturelle précieuse d'antioxydants, potentiellement utilisable dans des applications alimentaires ou cosmétiques, surtout à des concentrations plus élevées.

L'analyse comparative montre que Trolox est le plus puissant antioxydant des deux, mais le Grignon d'olive possède également un potentiel antioxydant notable qui pourrait être exploité, notamment en augmentant sa concentration.



**Figure 21 :** Pourcentage de l'activité antioxydant totale (molybdate) de l'extrait de grignon d'olive à différentes concentrations comparé avec le trolox.

- La même lettre indique l'absence de différence significative ( $p < 0,05$ ) avec  $a > b > c > d > e > f > g > h$  et les barres verticales indiquent les écarts types (nombre d'essais=3).

### 5.8.4 Chélation des ions de fer ferreux :

On a effectué une évaluation de la chélation du fer ferreux en utilisant la ferozine, qui se combine avec le fer résiduel dans le milieu réactionnel et crée un chromophore rouge (Fe (II) -Ferozine) avec un maximum d'absorption à 562 nm.

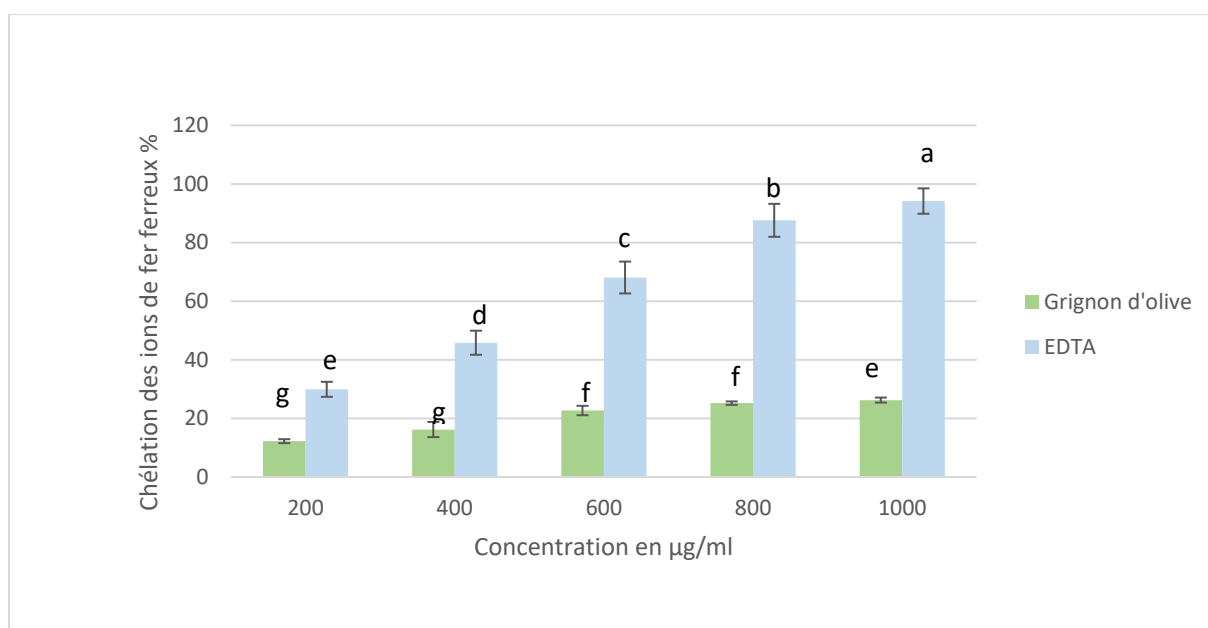
L'EDTA est un acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) qui a la capacité de se fixer aux ions métalliques et de créer des complexes chimiques solubles.

L'EDTA est principalement utilisé en tant qu'agent chélateur, c'est-à-dire qu'il se lie aux ions métalliques perturbateurs afin de les neutraliser ou de les éliminer. En se fixant aux ions métalliques, l'EDTA a la capacité de prévenir leur réactivité, leur précipitation ou la formation de dépôts indésirables.

L'extrait de grignon d'olive a présenté un pouvoir chélateur moyen par rapport à l'EDTA, avec un pourcentage de 94,17% pour une concentration de 1000 $\mu$ g/mL, et il augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait de grignon d'olive (figure n°22).

L'effet de chélation des ions ferreux augmente avec l'augmentation de la concentration pour les deux substances, Grignon d'olive et EDTA.

EDTA montre une capacité de chélation nettement supérieure à celle du Grignon d'olive à toutes les concentrations testées.



**Figure 22 :** Pourcentage de pouvoir chélateur du fer ferreux de l'extrait de grignon d'olive comparé avec l'EDTA.

- La même lettre indique l'absence de différence significative ( $p < 0,05$ ) avec  $a > b > c > d > e > f > g$  et les barres verticales indiquent les écarts types (nombre d'essais=3).

### 5.9 Activité antidiabétique :

L'activité antidiabétique de l'extrait de grignon d'olive a été évaluée par le test de l' $\alpha$ -amylase.

Chez l'homme et l'animal, l'alpha-amylase est une enzyme digestive produite par les glandes salivaires et pancréatiques ou synthétisée dans les fruits des plantes pendant leur maturation. Elle est utilisée dans l'industrie alimentaire pour transformer l'amidon et le glycogène en sucres plus simples, et elle est également employée pour la transformation de l'amidon en sucres fermentescibles (**Kaur, 2021**).

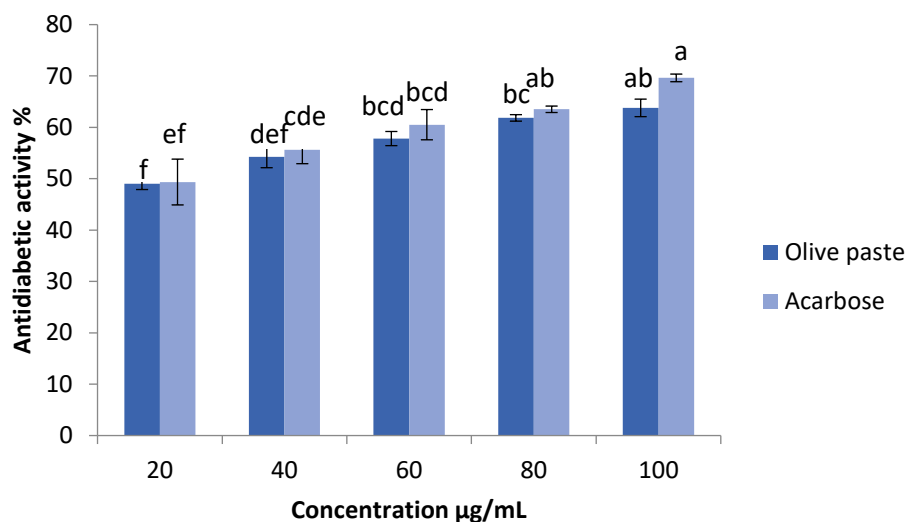
Le médicament acarbose est employé dans le traitement du diabète de type 2. Il agit comme un inhibiteur de l'enzyme alpha-glucosidase (alpha amylase), ce qui ralentit l'assimilation des sucres dans l'intestin. Ce ralentissement de l'assimilation des glucides permet de maîtriser et de réduire les niveaux élevés de sucre dans le sang après les repas (**Balaich, The human microbiome encodes resistance to the antidiabetic drug acarbose., 2021**).

Selon des recherches, les inhibiteurs naturels d'alpha amylase tels que les flavonoïdes et les composés phénoliques des plantes (comme la quercétine, l'épicatéchine et la phloridzine) ont la capacité d'inhiber l'activité de l'alpha amylase, ce qui signifie qu'ils peuvent être utilisés pour prévenir et traiter le diabète, sans ou avec peu de risque d'effets secondaires (**Khan, et al., 2018**).

L'histogramme compare l'activité antidiabétique de l'acarbose et du grignon d'olive, exprimée en pourcentage. Le grignon d'olive présente une activité antidiabétique relative plus élevée que l'acarbose à toutes les concentrations testées. La valeur IC50 est la concentration d'un composé nécessaire pour inhiber de 50 % l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose. Les valeurs IC50 pour le grignon d'olive et l'acarbose étaient respectivement de 12,18  $\mu\text{g/mL}$  et 20,44  $\mu\text{g/mL}$ . Ces résultats sont cohérents avec les résultats de l'histogramme, qui montrent que le grignon d'olive a une activité antidiabétique relative plus élevée que l'acarbose.

La mesure du taux d'inhibition révèle que l'extrait de grignon d'olive présente une activité antidiabétique similaire à celle de l'acarbose.





**Figure 23:** Pourcentages d'inhibition de l'alpha amylase par l'extrait de grignon d'olive comparé à l'acarbose.

- La même lettre indique l'absence de différence significative ( $p < 0,05$ ) avec  $a > b > c > d > e$  et les barres verticales indiquent les écarts types (nombre d'essais=3).

### 5.10 Activité anti-inflammatoire :

Le médicament indométacine est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS). On l'utilise principalement pour apaiser la douleur, diminuer l'inflammation et diminuer la fièvre (Sulukdjian, 2020). L'histogramme compare l'activité anti-inflammatoire du grignon d'olive et de l'indométhacine, exprimée en pourcentage. L'histogramme de pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique (figure 24) montre que l'extrait de grignon d'olive présente une inhibition maximale de la dénaturation des protéines à un pourcentage de 58,86 % à 1000 µg/mL, et la solution standard de l'indométacine présente une inhibition maximale de 46,48 % à la même concentration. Le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait de grignon d'olive et de l'indométacine.

Le grignon d'olive a une activité anti-inflammatoire significativement plus élevée que l'indométhacine à toutes les concentrations testées ( $p < 0,05$ ). Les valeurs IC<sub>50</sub> pour le grignon d'olive et l'indométacine étaient respectivement de 823,56 µg/mL et 1026,81 µg/mL. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de l'histogramme, qui montrent que le grignon d'olive a une activité anti-inflammatoire relative plus élevée que l'indométacine.

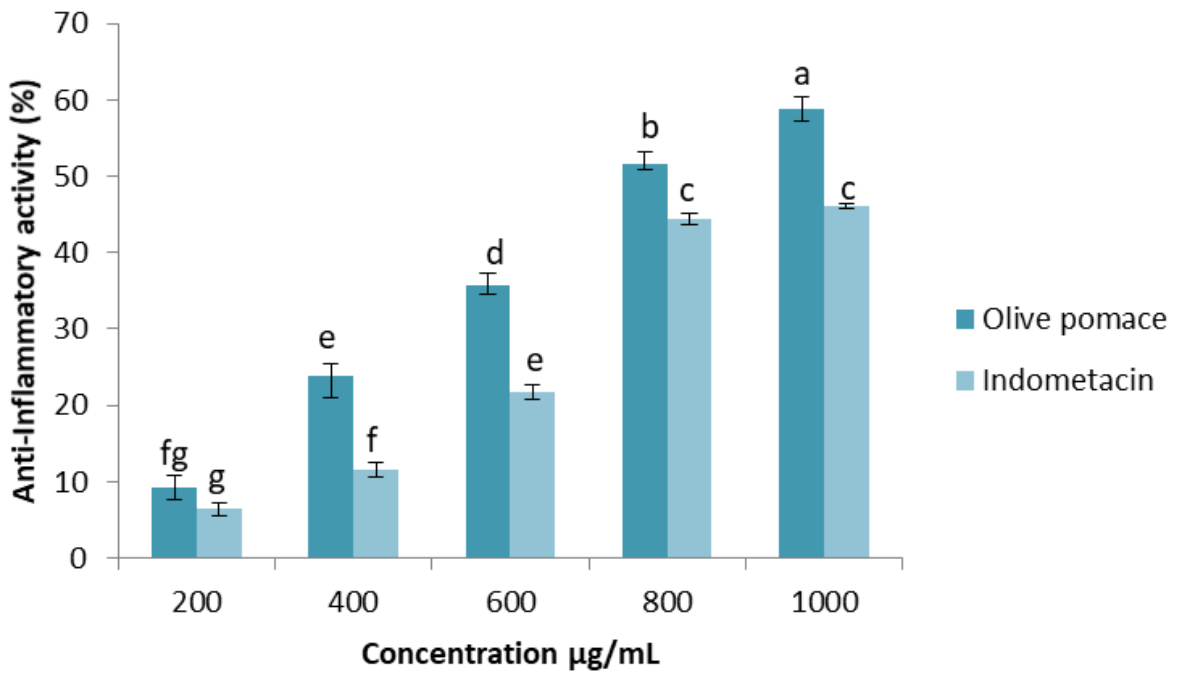


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique de l'extrait de grignon d'olive comparé avec l'indométacine.

# Conclusion

### **Conclusion :**

Les paramètres d'extraction ont été optimisés à l'aide d'une méthodologie de surface de réponse (MSR). Cette dernière a été utilisée avec succès pour étudier l'influence de la concentration d'éthanol, de la température et du temps d'extraction sur le rendement en CPT. Les conditions d'extraction optimales étaient les suivantes : éthanol 40%, puissance d'extraction 500W et durée d'extraction 300s.

Des résultats très intéressants ont été obtenus lors de l'évaluation de l'activité antioxydante, de l'effet anti-inflammatoire et de l'effet antidiabétique de l'extrait de grignons d'olive, ce qui nous a amenés à définir ce déchet comme un aliment fonctionnel.

En conclusion, les résultats de cette étude mettent en évidence l'importance de maximiser l'efficacité de l'extraction par micro-ondes et peuvent constituer une fondation pour la création de produits naturels fonctionnels dans divers secteurs. Effectivement, les industries nous proposent une variété de déchets à exploiter dans les secteurs alimentaire, thérapeutique, cosmétique et de la parfumerie.

## Références bibliographique

### A

ALI, A. O. (2020). Volatile and polyphenol composition, anti-oxidant, anti-diabetic and anti-aging properties, and drying kinetics as affected by convective and hybrid vacuum microwave drying of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 151, 11-24-63.

ANSES. (2020). *Table de composition nutritionnelle des aliments : olives*.

### B

Bagade, S. B. (2019). Recent Advances in Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Complex Herbal Samples: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 01-12.

Balaich, J. E. (2021). The human microbiome encodes resistance to the antidiabetic drug acarbose. 110 –115.

Balaich, J. E. (2021). The human microbiome encodes resistance to the antidiabetic drug acarbose. *Nature*, 110–115.

Bendini A., C. L.-P.-C.-C.-G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils; a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*.

Berger, P. D. (2017). Introduction to Experimental Design. *Springer International Publishing*, 1-19.

Berger, P. D. (2017). Introduction to Experimental Design . *Springer International Publishing*, 1-19.

Björklund, (. e. (2000).

Björklund, S. e. (2000). Analytical-Scal microwave-assisted extraction.

Braca,A, S. e. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their. 105 - 111.

### C

C. Koutroumanidis, E. S. (2005). "Olive kernel utilization for energy purposes in Greece. *Renewable Energy*,, 811-817.

Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC*, 229-248.

Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC*, 229-248.

Cendres, A. (2010). Procédé novateur d'extraction de jus de fruits par micro-onde: viabilité de fabrication et qualité nutritionnelle des jus.

Chan, C.-H. Y.-C.-L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography*, 1218, 6213-6225.

CIO. (2019). Production et valorisation des grignons d'olive. *Conseil oléicole international*.

Council, I. O. (2017). *Olive By-Products Utilization*. .

Council, I. O. (2021). *World Olive Oil Figures*.

Cunningham, D. W. (2011). Experimental Design.

## D

David, K. S. (2007). producing table olives. 328.

Djeridane, A. Y. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*,, 654–660.

Djeridane, A. Y. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*,, 654–660.

## E

Edenharder, R. G. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids . 1 - 18.

Environnement, i. d. (2019). caractérisation de grignons d'olives en vue d'une valorisation.

Eskilsson, C. B. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902, 227-250.

## F

FAO. (2015). organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

FAO. (2019).

Faucher, J. (2006). Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue.

Ferreira, S. L. (2019). Multivariate optimization techniques in food analysis—A review. *food chemistry*.

## G

Glauber, J. R. (XVII e siècle ).

Guil-Guerrero, D. J. (s.d.). l'Institut de la Grasa à Séville.

## H

Haddadi-Guemghar, H. J. (2014). Optimisation of microwave-assisted extraction of prune (*Prunus domestica*) antioxidants by response surface methodology. *International Journal of Food Science & Technology*, 2158–2166.

HAMIDA, I. (2008). influence du carbonate du sodium anhydre sur l'extraction de l'huile à partir du grignon d'olive.

<https://www.internationaloliveoil.org/>. (s.d.). 40(5).

## I

international, c. o. (2000). le marché mondial de l'huile d'olive, *Olivae*.

## J

J., G. (1996). Les huiles essentielles. *Techniques de l'ingénieur*.

Jacques Machiex, A. F. (2005). les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économiqueJean.

## K

- K., I. (2011). Valorisation des sous produits de l'activité oléicoles. *Centre National des Technologies de production plus propre*, 6-7.
- Kar, B., Kumar, R., Karmakar, L., Narayan Dola, N., Bala, A., & Mazumder, U. a. (2012). Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves. *J.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.*, 976-980.
- Kaufmann, B. &. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction . *Phytochemical Analysis*, 105-113.
- Kaur, N. K. (2021). Ipha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus. *Chemical Biology & Drug Design*, 539–560.
- Khan, M., Alam, A., Khan, K., Salar, U., Chigurupati, S., Wadood, A., . . . Riaz, M. e. (2018). Flurbiprofen derivatives as novel  $\alpha$ -amylase inhibitors: Biology-oriented drug synthesis (BIODS) , in vitro, and in silico evaluation. *Bioorganic Chemistry*, 157-167.

## L

- les grignons d'olives. (2017). *Food & agriculture Organization*.
- Liu, X. Z. (2008). Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 219–228.
- Liyanapathirana, C., & Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*.
- Lucchesi, M. E. (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*, 1079–1086.

## M

- Ma, Y. C. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 57-62.
- Mallakpour, S. R. (2011). New developments in polymer science and technology using combination of ionic liquids and microwave irradiation. *Progress in Polymer Science*, 36, 1754-1765.
- Manach C, S. A. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 727-747.
- Mandal V., M. Y. (2007). Microwave-assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *PharmacognosyReviews*, 7-18.
- Manikandan, P. M. (2012). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*.
- Meriem, B. A. (2019). caractérisation physico-chimiques des huiles d'olives stockées. (8).
- Motasemi, F. A. (2012). A review on microwave-assisted production of biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 4719-4733.

## N

- Nemes, S. M. (2009). Screening the Experimental Domain for the Microwave-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed Prior to Optimization Procedures. *Food and Bioprocess Technology*, 300-307.
- Nóbrega, J. T. (2002). Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57, 1855-1876.

## O

- Osorio-Tobón, J. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 4299-4315.

## P

- Pandey KB, R. S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. . *Oxid Med Cell Longev.*, 270-278.

## R

- Routray, W. O. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 409-424.

## S

- Sarotti, A. M. (2007). n efficient microwave-assisted green transformation of cellulose into levoglucosenone. Advantages of the use of an experimental design approach. *Green Chemistry*, 1137.
- Sethiya, N. K. (2014). The total antioxidant content and radical scavenging investigation on 17 phytochemical from dietary plant sources used globally as functional food. *Biomedicine & Preventive Nutrition*,, 439–444.
- Soler-Rivas C., E. J. (2000). Soler-Rivas Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 114, 1380-1385. .
- Sulukdjian, A. N. (2020). Intérêt de l'indométacine comme traitement d'épreuve des céphalées hémifaciales : aspects cliniques et pharmacologiques. Dans 66ème Congrès de la SFCO. *EDP Sciences*.

## T

- Thyer, B. A. (2013). Pre-Experimental Research Designs. *Quasi-Experimental Research Designs*, 29–76.
- Tommasi.N, S. e. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento and their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 105 -111.

## U

- USDA. (2020). *FoodData Central: Olives*.



## V

V. Garcia-Parra, M. B. (2015). Phenolic Compounds in Olive Pomace: Analytical Determination, Health Benefits and Industrial Applications,". *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents, Elsevier*.

Velioglu, Y. S. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4113–4117.

## W

Wang L., W. C. (2006). Recent advances in Extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 300–312.

## Y

Yang, L. A.-O. (2023). Single-Case Experimental Design in Rehabilitation : Basic Concepts, Advantages, and Challenges. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation, Publish Ahead of Print*.

## Z

Zhang, H.-F. Y.-H. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants : Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 672–688.

Zhang, H.-F. Y.-H. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. *Trends in Food Science &*, 22, 672-688.

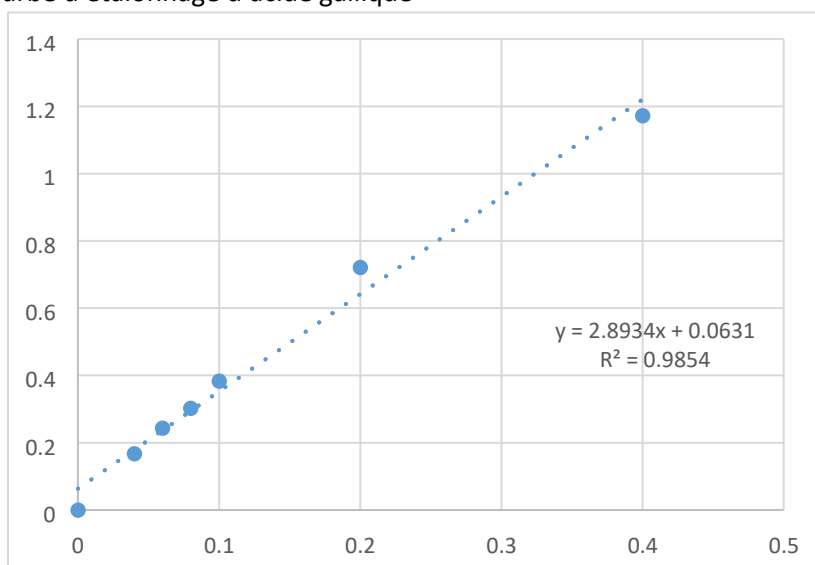
Zhong, k. W. (2010). Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*.

Zhu, X. S. (2006). Optimization of microwave-assisted solvent extraction for volatile organic acids in tobacco and its comparison with conventional extraction methods. *Analytica Chimica Acta*, 88–94.

# **Annexes**

## Annexes

**Figure 01 :** la courbe d'étalonnage d'acide gallique



**Figure 02 :** Liste des équipements et des consommables requis

Méthodes	Appareillage	Matériels	Produits et réactifs
<b>Séchages</b>	Etuve ventilée (Nuve,Turk)	Papier aluminium	Grignons d'olives
<b>Broyage</b>	Broyeur électrique		Poudre de grignons d'olives sèche
<b>Tamisage</b>		Passoire	Poudre de grignons d'olive.
<b>Extraction</b>	Micro-onde (Maxipower)	Ballon soxhlet	L'eau distillée, éthanol et la poudre de grignon d'olive (1g).
<b>Filtration</b>	Centrifugeuse	Papier filtre	
<b>Dilution</b>		Micro pipette	
<b>Dosage</b>	Spectrophotomètre	cuve	Folin-Ciocalteau et Carbonate de sodium (6%)

## **Résumé :**

L'étude visait à optimiser l'extraction des composés phénoliques du grignon d'olive par microondes pour maximiser leur rendement et à évaluer leurs propriétés antioxydantes, antiinflammatoires et antidiabétiques. La Méthodologie de Surface de Réponse a permis d'identifier les conditions optimales : 40% d'éthanol, 500W de puissance et 300 secondes de durée. Les extraits obtenus ont montré des activités biologiques significatives, suggérant que les grignons d'olive peuvent être valorisés comme aliments fonctionnels et dans les industries alimentaires, thérapeutique, cosmétique et de la parfumerie.

**Mots-clés :** Grignons d'olives ; Méthodologie de la surface de réponse.

## **ABSTRACT :**

The aim of the study was to optimize the microwave extraction of phenolic compounds from olive pomace to maximize their yield, and to evaluate their antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic properties. Response Surface Methodology was used to identify the optimum conditions : 40% ethanol, 500W power and 300 seconds duration. The extracts obtained showed significant biological activities, suggesting that olive pomace can be valorized as a functional food and in the food, therapeutic, cosmetic and perfume industries.

**Keywords :** Olive pomace ; Reponse surface methodology.