



HAL
open science

Eco-extraction de biomolécules à haute valeur ajoutée à partir de grignons d'olive

Yosra Belghith

► **To cite this version:**

Yosra Belghith. Eco-extraction de biomolécules à haute valeur ajoutée à partir de grignons d'olive. Autre. Université d'Avignon; Université de Sfax. Faculté des sciences, 2023. Français. NNT : 2023AVIG0119 . tel-04630498

HAL Id: tel-04630498

<https://theses.hal.science/tel-04630498v1>

Submitted on 1 Jul 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de Sfax
Faculté des Sciences de Sfax
Laboratoire de Chimie Organique
« LR17/ES08 »



Université d'Avignon
Laboratoire MicroNut
« UMR408 SQPOV »

THÈSE

En cotutelle

Présentée par

M^{me} Yosra BELGHITH

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN CHIMIE

Intitulée

« Eco-extraction de biomolécules à haute valeur ajoutée à partir de grignons d'olive »

Soutenue Le 16 Décembre devant le jury composé de :

Mme. Raoudha MEZGHANI JARRAYA	Professeur (FSS)	Président
Mr. Michel TREILHOU	Professeur (INU Champollion)	Rapporteur
Mr. Mhamed BEN MESSAOUDA	Maitre de Conférences (IPEST)	Rapporteur
Mr. Fakher CHABCHOUB	Professeur (FSS)	Examineur
Mme. Valérie TOMAO	Maitre de Conférences HDR (AU)	Directrice de thèse
Mr. Noureddine ALLOUCHE	Professeur (FSS)	Directeur de thèse

Année universitaire 2022-2023

RÉSUMÉ

Le grignon d'olive est le coproduit principal généré par le procédé d'extraction de l'huile d'olive. Bien que délétère pour l'environnement, le grignon d'olive est une source potentielle de molécules naturelles bénéfiques pour la santé humaine. Une partie de nos travaux a été consacrée à la caractérisation d'un extrait éthanolique de grignons d'olive. L'analyse par UPLC/MS nous a permis d'identifier 59 métabolites secondaires dont les plus abondants sont l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'oleuropéine aglycone, l'oléoside, l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique. Des tests biologiques ont montré que l'extrait éthanolique était doté d'activités antioxydante, antidiabétique et analgésique. Une deuxième partie s'est focalisée sur l'optimisation des rendements d'extraction des polyphénols de grignons d'olive à l'aide de technologies d'extraction éco-responsables. Ces travaux nous ont amené à conclure que les conditions optimales d'extraction ont été obtenues pour un ratio de (60/40) (EtOH/H₂O) à l'aide du procédé d'extraction accélérée par solvant. Dans une dernière partie, une nouvelle approche a été développée visant l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques en considérant des huiles végétales comme solvant d'extraction. Basé sur un plan factoriel complet à trois facteurs (type d'huile, température et technique d'extraction), nous avons pu montrer que les conditions optimales de l'extraction des polyphénols de grignons étaient l'extraction assistée par ultrasons dans l'huile d'olive à 65°C.

Mots clés : grignons d'olive, polyphénols, LC/MS, activités biologiques, extraction accélérée par solvant, extraction assistée par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes, microbilles, macération conventionnelle, plan factoriel complet

ABSTRACT

Olive pomace is the main by-product generated through olive oil extraction. Although toxic to the environment, olive pomace is an important source of natural products beneficial to human health. Part of our work focuses on an ethanolic extract of pomace. UPLC/MS analyses allowed us to identify 59 secondary metabolites, the most abundant of which are hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropein aglycone, oléoside, caffeic acid and *p*-coumaric acid. In addition, biological tests have shown that the ethanolic extract has antioxidant, anti-diabetic and analgesic activities. A second part based on the optimization of polyphenol extraction yields from olive pomace was carried out. This work led us to conclude that 60:40 EtOH: H₂O was the best extraction solvent ratio and that “accelerated solvent extraction” was the best extraction process. In the last part, a new approach was developed to optimize the extraction of phenolic compounds using vegetable oils as extraction solvent. Based on a complete factorial design with three factors (type of oil, temperature and extraction technique), we have concluded that the optimal conditions for the extraction of polyphenols from pomace are as follows: extraction with olive oil at 65°C using ultrasound-assisted extraction.

Keywords: olive pomace, polyphenols, LC/MS, biological activities, accelerated solvent extraction, ultrasounds assisted extraction, bead-milling, microwave assisted extraction, conventional maceration, complete factorial design

DEDICACES

♥ *En guise de reconnaissance envers mon DIEU le Tout Puissant.*

Je dédie ce modeste travail à la communauté scientifique

Espérant qu'il lui sera utile.

♥ *À l'âme de mon cher professeur Mr. Farid Chemat*

Pour votre immense contribution à ce travail, et pour votre gentillesse et votre humilité, nous nous souvenons de vous et prions pour vous avec un regret et une tendresse sans bornes. Que Dieu vous accorde au paradis, la paix des justes.

♥ *À Mes parents Noamen & Izdihar,*

Pour l'amour inestimable que vous n'avez cessé de me prodiguer. Pour la tendresse dont vous avez toujours entouré. Pour tous ce que vous avez faits pour mon bonheur et ma réussite. Que ce travail soit le témoignage de ma sincère gratitude et mon immense affection. Nulle dédicace ne serait exprimer toute ma reconnaissance, mon profond attachement et tout l'amour que je porte pour vous. Que Dieu vous bénisse et vous préserve bonne santé et longue vie.

♥ *À Mon cher mari Lied Krichen,*

Une spéciale dédicace à mon cher mari qui compte énormément pour moi, et qui je porte beaucoup de tendresse et de respect, pour son amour, ses sacrifices, sa patience et son soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitudes. Merci infiniment.

♥ *À mes chers frères Alaadin, Chiheb & ma belle sœur Nouha,*

En témoignage de la fraternité si profondément enracinée qui nous lie. Pour l'amour indéfectible et la complicité qui nous attachent. . Que Dieu vous protège et vous accorde une vie pleine de bonheur, de succès et de prospérité.

♥ *À tous ceux que j'ai omis de citer*

♥ *À toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail.*

♥ *Yosra* ♥

REMERCIEMENTS

C'est pour moi un réel plaisir de remercier toutes les personnes qui m'ont, de près ou de loin, d'une manière ou d'une autre, permis, par leur collaboration, leur soutien et leur avis judicieux, de mener à bien ce travail.

*Ce travail a été effectué au sein du **Laboratoire de Chimie Organique « LR17ES08 »** de la Faculté des Sciences de Sfax, dirigé par Professeur **Ridha BEN SALEM** et au sein du **Laboratoire MicroNut, UMR408 SQPOV** de l'Université d'Avignon, dirigé par Professeur **Olivier DANGLES** Qu'ils trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements et ma grande gratitude.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à mes encadrants Monsieur **Noureddine ALLOUCHE**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax et Madame **Valérie TOMAO**, Maître de conférences à l'Université d'Avignon, quelques mots ne suffisent pas à exprimer ma profonde gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant de superviser ce travail. Merci également pour vos disponibilités, vos gentillesse, vos encouragements et les qualités scientifiques que vous avez su mettre au service de mes apprentissages.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Madame **Raoudha MEZGHANI JARRAYA**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.*

*Mes vifs remerciements vont également à Monsieur **Michel TREILHOU**, Directeur du Laboratoire B_{TSB} "Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives" à l'Institut National Universitaire Jean-François Champollion, Université de Toulouse, Albi, France, et à Monsieur **Mhamed BEN MESSAOUDA**, Maître de Conférences à l'Institut Préparatoire aux Etudes Scientifiques et Techniques, Université de Carthage, Tunis, Tunisie, pour avoir accepté d'être membres du jury de ma thèse en tant que rapporteurs. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mes profonds respects et reconnaissances.*

*J'adresse mes remerciements les plus respectueux à Monsieur **Fakher CHABCHOUB**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également à Madame **Imen Kallel Bayouhd**, Maître Assistante à la Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, pour son aide et sa contribution à la réalisation des analyses statistiques ; Et à Monsieur **Khaled HAMDEN**, Professeur à l'Institut Supérieur des Sciences Appliquées et Technologie de Mahdia, Université de Monastir, pour m'avoir réalisée les tests biologiques.*

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe du Département de Chimie à la Faculté des Sciences de Sfax : les enseignants et les techniciens pour tous les échanges techniques, scientifiques et pour leur sympathie, leur accueil chaleureux pendant les années de thèse.

*Je me dois de remercier aussi tous mes collègues et amis du **Laboratoire de Chimie Organique LR17ESO8** pour la bonne ambiance, leur soutien et leur aide tout au long de ma thèse.*

C'est avec un grand plaisir que je tiens à exprimer ma gratitude et mon immense reconnaissance à tous ceux qui ont participé à ma formation durant toutes mes études, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et à tous ceux qui m'aiment et veillent à mon bonheur. Qu'ils veuillent apercevoir ici mes termes les plus sincères de remerciements.

-Yosra BELGHITH KRICHEN-

SOMMAIRE

SOMMAIRE	
LISTE DES ABREVIATIONS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I :	3
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. PRESENTATION DE L'OLIVIER.....	3
1. Classification	3
2. Description botanique.....	3
3. Origine et histoire	4
4. Phytochimie.....	4
II. LA VARIETE D'OLIVE AGLANDAU	5
1. Classification	5
2. Définition.....	5
3. Morphologie.....	6
III. PRODUCTION D'HUILE D'OLIVE.....	7
1. Processus d'extraction d'huile d'olive	8
2. Les sous-produits générés lors d'extraction d'huile d'olive.....	9
IV. COMPOSITION GENERALE D'HUILE D'OLIVE	11
1. La fraction saponifiable.....	11
2. La fraction insaponifiable.....	12
3. Les composés phénoliques	12
V. LES GRIGNONS D'OLIVE.....	17
1. Les caractéristiques chimiques.....	17
2. Domaines d'utilisation des grignons d'olive.....	17
VI. LES TECHNIQUES D'EXTRACTION ADOPTEES	19
1. Macération conventionnelle	19
2. Extraction accélérée par solvant « ASE »	20
3. Extraction assistée par Ultrason à sonde « UAE »	20
4. Extraction assistée par Micro-ondes « MAE ».....	22
5. Microbilles « BM »	23
VII. PREDICTION THEORIQUE : LOGICIEL COSMO-RS	24

1.	<i>Définition</i>	24
2.	<i>Mode de fonctionnement</i>	24
3.	<i>Objectifs du COSMO-RS</i>	25
VIII.	ACTIVITES BIOLOGIQUES	32
1.	<i>Activité antiradicalaire</i>	32
2.	<i>Activité antidiabétique</i>	32
3.	<i>Activité analgésique</i>	37
IX.	IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES COMPOSES CHIMIQUES.....	38
X.	PLAN D'EXPERIENCES	39
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	41
	CHAPITRE II :.....	50
	MATERIEL & METHODES.....	50
A.	ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE GRIGNONS D'OLIVE....	50
I.	RECOLTE ET IDENTIFICATION.....	50
II.	MACERATION CONVENTIONNELLE	50
III.	SCREENING PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE	51
1.	<i>Mise en évidence de familles phytochimiques</i>	51
2.	<i>Analyse quantitative de l'extrait éthanolique de grignons d'olive</i>	51
IV.	L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE	52
1.	<i>Activité anti radicalaire (test de DPPH•)</i>	53
2.	<i>La capacité anti-oxydante totale (CAT)</i>	53
3.	<i>Pouvoir réducteur (FRAP)</i>	53
V.	ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE	53
1.	<i>Induction du diabète Type 1 (DT1) chez les rats</i>	53
2.	<i>Traitement du diabète (DT1)</i>	54
VI.	ACTIVITE ANALGESIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE.....	55
1.	<i>Le principe</i>	55
B.	OPTIMISATION DE L'ECO-EXTRATION DE BIOMOLECULES A HAUTE VALEUR AJOUTEE A PARTIR DE GRIGNONS....	56
I.	PREDICTION THEORIQUE DU MEILLEUR RATIO ETHANOL-EAU POUR L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS	56
II.	OPTIMISATION DU TEMPS D'EXTRACTION : ETUDE CINETIQUE	57
III.	OPTIMISATION DU MEILLEUR RATIO ETOH-H ₂ O POUR L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS	58
IV.	INTENSIFICATION DU RENDEMENT D'EXTRACTION : TECHNIQUES INNOVANTES ET VERTES.....	58
1.	<i>Extraction accélérée par solvant « ASE »</i>	58

2.	<i>Extraction assistée par ultrason à sonde « UAE-P »</i>	58
3.	<i>Extraction assistée par ultrason à bain « UAE-B »</i>	59
4.	<i>Extraction assistée par micro-ondes « MAE »</i>	59
5.	<i>Extraction assistée par les microbilles « BM »</i>	59
V.	DETERMINATION DES PHENOLS TOTAUX	60
VI.	QUANTIFICATION DES PHENOLS TOTAUX PAR UHPLC :	60
VII.	LES ANALYSES STATISTIQUES :	60
C.	OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS PAR UNE HUILE VEGETALE	62
I.	CHOIX DES PARAMETRES DE L'OPTIMISATION	62
II.	OPTIMISATION DU TEMPS D'EXTRACTION : ETUDE CINETIQUE	63
III.	DETERMINATION DES PHENOLS TOTAUX	63
IV.	PLAN D'EXPERIENCE FACTORIEL COMPLET	63
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65
	CHAPITRE III :	68
	RESULTATS & DISCUSSION	68
A.	ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE GRIGNONS D'OLIVE.....	68
I.	EXTRACTION PAR MACERATION DE LA POUDRE DE GRIGNONS D'OLIVE	68
II.	SCREENING PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE	69
III.	ETUDE CHIMIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE.....	69
1.	<i>Spectroscopie Infrarouge (IR)</i>	69
2.	<i>Identification des composés chimiques dans l'extrait éthanolique moyennant l'analyse LC- MS</i>	71
IV.	EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE	88
1.	<i>Activité antiradicalaire (test de DPPH•)</i>	88
2.	<i>La capacité anti-oxydante totale (CAT)</i>	89
3.	<i>Pouvoir réducteur FRAP</i>	90
V.	ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE	91
1.	<i>Activité in-vitro</i>	91
2.	<i>Activité in-vivo</i>	92
VI.	ACTIVITE ANALGESIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE	93
VII.	CONCLUSION	93

B.	OPTIMISATION DE L'ECO-EXTRACTION DE BIOMOLECULES A HAUTE VALEUR AJOUTEE A PARTIR DE GRIGNONS....96	
I.	PREDICTION THEORIQUE DU MEILLEUR RATIO ETHANOL-EAU POUR L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS 97	
1.	<i>Etape de pré-prédiction.....</i>	97
2.	<i>Etape de prédiction.....</i>	97
II.	OPTIMISATION DU TEMPS D'EXTRACTION : ETUDE CINETIQUE	102
III.	OPTIMISATION DU MEILLEUR RATIO ETOH-H ₂ O POUR L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS	106
IV.	INTENSIFICATION DU RENDEMENT D'EXTRACTION MOYENNANT DES TECHNIQUES INNOVANTES ET VERTES	110
V.	COMPREHENSION DES MECANISMES D'EXTRACTION	113
VI.	CONCLUSION	113
C.	OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS DE GRIGNONS PAR UNE HUILE VEGETALE.....117	
I.	OPTIMISATION DU TEMPS D'EXTRACTION	118
II.	OPTIMISATION DES PARAMETRES D'EXTRACTION.....	119
1.	<i>1^{er} paramètre : type d'huile.....</i>	120
2.	<i>2^{em} paramètre : La température</i>	123
3.	<i>3^{em} paramètre: méthode d'extraction</i>	124
III.	EFFET DES PARAMETRES SUR LE RENDEMENT D'EXTRACTION	124
1.	<i>Validation du modèle</i>	124
2.	<i>Effet des facteurs</i>	125
3.	<i>L'analyse de la réponse tridimensionnelle</i>	129
4.	<i>Analyse des courbes d'iso-réponse</i>	130
IV.	CONCLUSION	131
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	141

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **ASE :** Extraction accélérée par solvant
- **UAE-P :** Extraction assistée par ultrasons à sonde
- **UAE-B :** Extraction assistée par ultrasons à bain
- **MAE :** Extraction assistée par micro-ondes
- **BM :** Microbilles
- **DO :** Densité optique
- **Rpm :** Rotation par minute
- **AGL :** Acides gras libres
- **DOP :** Grignon d'olive sec (Dried olive pomace)
- **MAG :** Les monoglycérides
- **DAG :** Les diglycérides
- **TAG :** Les triglycérides
- **CAT :** Capacité antioxydante totale
- **DPPH :** 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- **FRAP :** Ferric Reducing Antioxidant Power
- **HPLC :** Chromatographie liquide à haute performance
- **COSMO-RS :** COnductor like Screening Model- for Real Solvent

- **CA :** Acide caféique
- **TY :** Tyrosol
- **HT :** Hydroxytyrosol
- ***p*-CA :** *p*-coumaric acid
- **SD :** Ecart-type
- **TPC :** Composés phénoliques totaux (Total phenolic content)
- **EtOH :** Ethanol
- **IR :** Infra-rouge
- **PI :** Pourcentage d'inhibition
- **ET :** Equivalent de tyrosol
- **EAG :** Equivalent d'acide gallique
- **CI₅₀ :** Concentration d'inhibition à 50%

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : l'olivier	3
Figure 2 : caractère taxonomique et morphologique de l'olive	4
Figure 3 : la variété d'olive Aglandau.....	5
Figure 4 : infographie sur la variété d'olive Aglandau	6
Figure 5 : répartition du verger mondial en 2019.	7
Figure 6 : plan général de la production d'huile d'olive par les trois systèmes d'extractions. .	8
Figure 7 : composition d'une huile végétale	11
Figure 8 : structure du noyau phénol.....	13
Figure 9 : classification des composés phénoliques de l'huile d'olive	15
Figure 10 : fleurette de noyaux d'olives 0-50 microns	19
Figure 11 : schéma descriptif du phénomène de cavitation ultrasonore	21
Figure 12 : dispositifs d'un bain (a) et d'une sonde (b) à ultrason	21
Figure 13 : schéma descriptif du phénomène d'extraction par l'irradiation micro-ondes.	23
Figure 14 : schéma descriptif du phénomène d'extraction par microbilles	23
Figure 15 : schéma descriptif du mode de calcul global du logiciel COSMO-RS	24
Figure 16 : les différents objectifs traités par le logiciel COSMO-RS	25
Figure 17 : répartition de la densité de charge de polarisation à la surface d'une molécule conductrice	25
Figure 18 : histogramme de la charge de criblage de surface d'une molécule donnée.....	26
Figure 19 : description de la polarité moléculaire, σ -profil d'une molécule (a) et démarche de calcul d'un σ -profil d'une molécule (b).....	26
Figure 20 : exemple de graphe explicatif d'un σ -potentiel de trois solvants différents.....	30
Figure 21 : insulino-résistance et hyperglycémie. (pharmacomedicale.org)	35
Figure 22 : structure d'un spectromètre de masse.....	39
Figure 23 : extraction de la poudre de grignons d'olive par macération	50
Figure 24 : spectre infrarouge de l'extrait éthanolique	70
Figure 25 : spectre LC-MS de l'extrait éthanolique de grignons d'olive	71
Figure 26 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 1	77
Figure 27 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 2.....	77
Figure 28 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 3.....	78
Figure 29 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 7.....	78
Figure 30 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 8.....	79

Figure 31 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 9.....	80
Figure 32 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 13.....	80
Figure 33 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 16.....	81
Figure 34 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 17.....	82
Figure 35 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 20.....	82
Figure 36 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 23.....	83
Figure 37 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 30.....	84
Figure 38 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 34.....	85
Figure 39 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 36.....	85
Figure 40 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 37.....	86
Figure 41 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 44.....	86
Figure 42 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 50.....	87
Figure 43 : spectre MS ² et schéma de fragmentation du composé 55.....	88
Figure 44 : droite de calibration de l'acide gallique	89
Figure 45 : diagramme de la capacité antioxydante totale de l'extrait éthanolique.....	90
Figure 46 : présentation graphique du pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique	90
Figure 47 : protocole global d'optimisation de l'éco-extraction des grignons d'olive.....	96
Figure 48 : structures moléculaires et σ -surfaces des solvants et différents solutés étudiés... 98	98
Figure 49 : représentation graphique du σ -profil des solutés et du solvant étudiés	98
Figure 50 : σ -profil de la molécule H ₂ O.....	99
Figure 51 : représentation graphique du σ -potentiel des solutés et des solvants étudiés	100
Figure 52 : Prédiction de la solubilité par le COSMO-RS à 20°C (a) et à 50°C (b) avec les différents ratios EtOH/H ₂ O.	101
Figure 53 : droite d'étalonnage de tyrosol	102
Figure 54 : cinétique d'extraction des grignons d'olive sec à 20°C et à 50°C	103
Figure 55 : les droites d'étalonnage des 4 étalons utilisés en UPLC	104
Figure 56 : Cinétique d'extraction des grignons d'olive sec à 20°C et à 50°C : UPLC 20°C (a), UPLC 50°C (b)	105
Figure 57 : les TPC des extraits de grignons d'olive obtenus par macération dans les différents ratios EtOH/H ₂ O à 20°C et à 50°C	108
Figure 58 : Détermination de la solubilité expérimentale à 50°C des différents ratios EtOH/H ₂ O par l'UPLC, Phénols quantifiés (a), et la somme des phénols quantifiés (b)	110
Figure 59 : comparaison des différentes techniques d'extraction en termes de composés phénoliques totaux.....	111

Figure 60 : comparaison des différentes techniques d'extraction par UPLC selon la somme des phénols quantifiés (a), la teneur des différents phénols quantifiés (b)	112
Figure 61 : effet des processus d'extraction sur la structure de la poudre de grignons d'olive sèche	115
Figure 62 : droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	118
Figure 63 : cinétique d'extraction des grignons par l'huile d'olive	119
Figure 64 : droite d'étalonnage d'acide gallique.....	119
Figure 65 : effet optimal des trois paramètres : type d'huile (X_1), de la température (X_2) et la méthode d'extraction (X_3) sur le rendement.	126
Figure 66 : effet moyen linéaire de chaque facteur sur le rendement d'extraction.....	127
Figure 67 : interaction huile – température	127
Figure 68 : interaction huile-méthode d'extraction.....	128
Figure 69 : interaction température-méthode d'extraction.....	128
Figure 70 : représentation graphique : surface de réponse du rendement d'extraction.....	129
Figure 71 : les courbes d'iso-réponse des trois paramètres étudiés.	131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : matrice de conception factoriel complet des trois paramètres utilisés.....	64
Tableau 2 : rendements d'extraction et teneurs en composés phénoliques dans l'extrait éthanolique	68
Tableau 3 : résultats du criblage phytochimique de l'extrait éthanolique de grignons d'olive	69
Tableau 4 : tableau récapitulatif des composés identifiés de l'extrait éthanolique par LC-MS.	71
Tableau 5 : l'activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique	89
Tableau 6 : activité d'inhibition de la lipase et d' α -amylase de l'extrait éthanolique.....	91
Tableau 7 : activités de l'enzyme α -amylase intestinale, pancréatique et sérique et le taux de glucose sérique chez des rats Wistar traités avec l'extrait éthanolique de grignons d'olive ...	92
Tableau 8 : activités analgésiques de l'extrait éthanolique chez les souris albinos suisses....	94
Tableau 9 : suivi cinétique de l'extraction des phénols totaux à 20°C et à 50°C par la méthode de Folin Ciocalteu.....	103
Tableau 10 : suivi cinétique de l'extraction des phénols totaux à 20°C par la méthode d'UPLC	104
Tableau 11 : suivi cinétique de l'extraction des phénols totaux à 50°C par la méthode d'UPLC	105
Tableau 12 : tableau comparatif des valeurs moyennes des composés phénoliques quantifiés à 20 min de macération à 20°C et à 50°C	106
Tableau 13 : TPC des extraits de grignon d'olive obtenus par macération dans les différents ratios EtOH/H ₂ O à 20°C et à 50°C	107
Tableau 14 : rendements d'extraction des phénols quantifiés dans les extraits relatifs aux différents ratios EtOH/H ₂ O à 50°C par l'UPLC	109
Tableau 15 : teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits obtenus par les différentes techniques d'extraction en mg d'équivalence de tyrosol par g de grignons d'olive secs	111
Tableau 16 : teneurs en composés phénoliques dans les extraits obtenus par les différentes techniques d'extraction déterminées par UPLC	112
Tableau 17 : cinétique d'extraction des phénols totaux par la méthode de Folin Ciocalteu	118
Tableau 18 : suivis de l'extraction des phénols totaux moyennant l'huile d'olive et de maïs par la méthode de <i>Folin-Ciocalteu</i>	120

Tableau 19 : analyse de variance « ANOVA » des données d'intensification d'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olive.....	125
--	-----



INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'oléiculture est une composante fondamentale du secteur agricole très représentée dans le bassin méditerranéen. La culture de l'olivier occupe une place importante dans les pays méditerranéens grâce à son impact économique et sa valeur sociale, générateur d'emploi pour des milliers de familles. L'huile d'olive est une composante essentielle du régime alimentaire méditerranéen. De par ses acides gras insaturés, sa richesse en polyphénols et en vitamine E, l'huile d'olive est dotée de propriétés reconnues bénéfiques pour la santé humaine en particulier pour ses effets préventifs contre les maladies cardiovasculaires. Selon des données publiées par le conseil oléicole international (COI), la production et la consommation mondiale d'huile d'olive ont augmenté durant ces trois dernières campagnes (2019-2020, 2020-2021, 2021-2022) pour atteindre environ 3 215 000 tonnes cette année [Conseil oléicole international 2022].

Durant le processus d'extraction d'huile d'olives, des coproduits appelés margines et grignons sont rejetés. Très riches en composés phénoliques, ces coproduits posent des problèmes cruciaux de pollution. Leur pH acide et leur forte concentration en charge polluante, les rend potentiellement polluants pour l'environnement d'autant qu'ils sont faiblement biodégradables.

D'autre part, les margines et les grignons d'olive constituent une source naturelle de molécules d'intérêt pour des applications directes dans les secteurs alimentaires et cosmétiques. En effet, près de 98% de la teneur totale en polyphénols présents dans l'olive passent dans les grignons et la margine lors du processus d'extraction [Cecchi *et al.*, 2018 ; Ciriminna *et al.*, 2015]. Cette famille de composés chimiques est connue pour ses propriétés antioxydantes et ses activités biologiques bénéfiques pour la santé humaine.

A cet égard, l'oléiculture est placée au carrefour d'enjeux sociaux, économiques et environnementaux avec des problématiques multiples qui s'entrecroisent. La valorisation de ces composés bioactifs est l'objet de ce travail de thèse et ce par des méthodes d'eco-extraction. Ce travail est porté sur l'exploitation, la valorisation et la réutilisation des grignons d'olive dans divers domaines telles que l'alimentation humaine, la nutraceutique et la cosmétique par le biais de l'extraction des composés phénoliques présents dans ce coproduit.

L'objectif de ce travail de thèse a été consacré à la récupération des composés phénoliques présents dans les grignons d'olive moyennant l'extraction par un solvant vert et par une nouvelle technologie d'extraction. Pour aller plus loin, ce travail présente une étude de l'extraction des polyphénols par deux huiles végétales comme solvants pour minimiser l'utilisation des solvants pétroliers et proposer de nouveaux ingrédients de qualité alimentaire.

Le présent travail a été réalisé sous une convention de thèse en cotutelle. Une partie des travaux a été réalisée dans le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles à la Faculté des Sciences de Sfax sous la direction de Monsieur le Professeur Nouredine Allouche. Une autre partie a été élaborée dans le laboratoire MicroNut à l'université d'Avignon sous la direction de Mme la Docteur Valérie Tomao.



Ce travail est répertorié en trois chapitres :

1. Le premier chapitre est une revue bibliographique qui comporte une présentation générale de l'olivier et de l'espèce étudiée (*Olea europaea*, Aglandau). Il présente une description des processus de production d'huile d'olive et les sous-produits générés par chaque procédé ainsi que leurs compositions chimiques.

Puis il décrit les principales techniques d'extraction et d'identification utilisées durant ce travail ainsi que le mode de fonctionnement et l'objectif du logiciel « COSMO-RS ».

2. Le deuxième chapitre expose le matériel et les méthodes de travail. Il est subdivisé en trois sections dont la première présente une description du matériel végétal et les protocoles utilisés pour l'étude chimique et biologique des grignons d'olive. La deuxième section décrit les différentes techniques adoptées durant l'étude d'optimisation des rendements d'extraction. Enfin la dernière section présente les paramètres choisis pour le plan factoriel complet adopté afin d'optimiser l'extraction avec de l'huile végétale comme solvant.
3. Le troisième chapitre constitue le corps de la thèse avec trois parties décrivant l'ensemble des résultats obtenus durant ce travail.

- Dans la partie A, nous nous sommes intéressés à l'identification des composés phénoliques présents dans un extrait éthanolique des grignons d'olive ainsi qu'à certaines activités biologiques : antioxydante, antidiabétique et analgésique de l'extrait éthanolique *in-vitro* et *in-vivo*.
- La partie B, porte sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olive. Les paramètres de durée, nature du solvant et techniques d'extraction ont été pris en compte. Une prédiction théorique du pouvoir solubilisant de certains ratios de solvants a été réalisée comme une pré-étape dans cette partie.
- La partie C, a été orientée vers une nouvelle approche visant l'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olive par des huiles végétales. Cette partie se base sur un plan factoriel complet afin d'optimiser certains facteurs (type d'huile, température et méthode d'extraction) favorisant le processus d'extraction.

Finalement, ce mémoire est clôturé par des conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail ainsi que des perspectives.



CHAPITRE I :

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation de l'olivier

1. Classification

L'olivier est une plante arborescente qui appartient à la famille des oléacées dont le nom latin est « *Olea* ». Le genre *Olea* comporte plus que 136 espèces décrites par les botanistes dont 33 se rapportent à l'*Oleae europaea*, appelé aussi l'olivier d'Europe, qui se divise en deux espèces : l'olivier cultivé « *Olea sativa* » et l'olivier sauvage « *Olea silvestris* Miller » ou « *Olea oleaster* » [Georges *et al.*, 1985]. La classification botanique de l'olivier est comme suit :



Règne : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Magnoliopsida*
Sous classe : *Asterida*
Genre : *Olea*
Espèce : *europaea*
Famille : *Oleaceae*
Nom vernaculaire : Zeitoun
Nom français : Olivier

Figure 1 : l'olivier

2. Description botanique

L'olivier est un arbre fruitier au feuillage persistant, aux branches noueuses à l'écorce claire et au port buissonnant, il peut atteindre jusqu'à 20 m de hauteur, mais il est généralement taillé sur une hauteur de 5 à 8 m pour faciliter les récoltes. Les arbres ont souvent des troncs éclatés, évidés et affectant des formes très curieuses étendant leurs ramifications énormes jusqu'à 20 à 30 m.

Son fruit est une drupe ovoïde à mésocarpe charnu qui représente approximativement les deux tiers du fruit et qui est très riche en lipides. Sa forme n'est pas constante et varie



d'une variété à une autre. Sa taille peut varier entre un peu plus d'un centimètre et plus de trois pour l'olive grosse sévillane. Le noyau appelé aussi l'endocarpe est relativement gros et dur de forme ligneux dont la morphologie a aussi un caractère variétal. L'épicarpe est intimement lié au mésocarpe de couleur vert tendre qui passe au violet plus au moins noirâtre à complète maturité, brillant (dû à la présence de cire) et doux au toucher [Bianco *et al.*, 2000]. Par l'ampleur de ses racines, une surface vernissée de ses feuilles et une pause estivale dans son cycle végétatif, l'olivier peut s'adapter aux sécheresses estivales [Teuscher *et al.*, 2005].

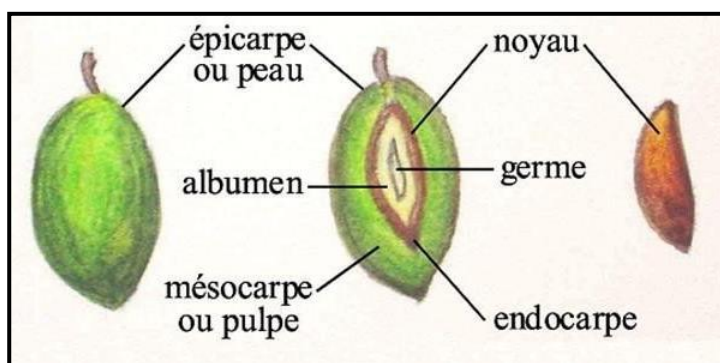


Figure 2 : caractère taxonomique et morphologique de l'olive

3. Origine et histoire

L'olivier est un arbre méditerranéen, chanté par tous les poètes de l'Antiquité. Symbole de vie et de pérennité, il constitue également une allégorie de la paix, de la sagesse et de fécondité. L'histoire de l'olivier se perd dans la nuit des temps et se confond avec celle des civilisations qui se sont succédées en Méditerranée et qui ont à jamais marqué de leur empreinte la culture de cette partie du monde [Ryan *et al.*, 1998].

En effet, des fossiles de feuilles d'olivier ont été trouvés dans des gisements pliocènes à Mongardino en Italie. Des restes fossilisés ont été découverts dans les couches du Paléolithique supérieur à l'écloserie d'escargots de Relilai en Afrique du Nord, et des morceaux d'oliviers sauvages et de pierres ont été découverts lors de fouilles de la période chalcolithique et de l'âge du bronze en Espagne. L'existence de l'olivier remonterait donc au XII^{ème} millénaire avant J.-C. [Bianco *et al.*, 2000].

4. Phytochimie

Durant des années, de nombreuses études ont montré la présence d'un très grand nombre de composés phénoliques dans les feuilles d'olivier tels que l'hydroxytyrosol, la rutine, le verbascoside, la lutéoline-7-glucoside, l'oleuropéine, l'oleuropéine aglycone, le ligstroside [Pérez *et al.*, 2005], et d'autres composés tels que l'acide quinique [Médail *et al.*,



2001]. L'oleuropéine est un composé phénolique abondant dans les cultivars d'olive [Bracci *et al.*, 2011] facilement extrait des fruits, des feuilles et des graines d'olive, même si cette molécule n'a pas été relevée dans toutes les huiles d'olive vierges [Pérez *et al.*, 2005].

Plusieurs recherches phytochimiques menées sur l'*Olivier europaea* ont conduit à l'isolement de plus d'une centaine de composés phénoliques dont des flavonoïdes, de flavones glycosides, de flavanones, d'iridoïdes, de sécoiridoïdes, de glycosides sécoiridoïdes [Obied *et al.*, 2013]. Les flavonoïdes, sécoiridoïdes et leurs glycosides (Jerman *et al.*, 2010) sont présents dans presque toutes les parties d'*O. europaea*.

II. La variété d'olive Aglandau

1. Classification

L'Aglandau est un arbuste d'olive cultivé appartenant à la famille des oléacées,

Sa classification botanique est la suivante :



Règne : *Plantae*
Genre : *Olea*
Espèce : *europaea*
Cultivar : Aglandau
Famille : Oleaceae
Nom communs : Blanquette -
Béruguette – Verdale du Vaucluse
Origine : Méditerranée

Figure 3 : la variété d'olive Aglandau

2. Définition

L'*Olea europaea* 'Aglandau' est une variété ancienne originaire des Alpes de Haute Provence. Cette variété est connue dans les vergers anciens comme Blanquette, Béruguette des Alpes-de-Haute-Provence ou Verdale du Vaucluse. Elle produit des olives ovoïdes, fermes, pulpeuses, recouverte d'une couche cireuse. Vertes à l'automne, elles deviennent rose vineux puis violet foncé à maturité. Riche en huile, elle donne de bons rendements. L'*Olivier* Aglandau est auto fertile. Il est rustique, assez résistant au froid et au vent. La récolte débute généralement en octobre pour les olives vertes, en novembre et décembre pour les olives noires.



La variété Aglandau est la première variété française de par sa représentativité dans la production d'huile estimée à hauteur de 21% dans les années 2020. En effet, les vergers peuplés à 90 % d'Aglandau constituent l'essentiel des oliveraies des départements du Vaucluse et des Alpes-de-Haute-Provence. L'ensemble du territoire où pousse l'Aglandau présente des sols calcaires légers, d'un pH (eau) variant de 8,0 à 8,5. Dans des conditions de sols plus acides, on peut observer des nouaisons difficiles, suivies d'un risque de pourrissement des fruits en fin d'automne et/ou une absence de caractéristiques organoleptiques de l'huile produite.

3. Morphologie

Comparé aux autres variétés d'olive, l'arbre de la variété Aglandau est assez moyen sous tous les angles de sa description : taille, vigueur, port, couleur du bois, forme et couleur des feuilles. Seule la longueur des entre nœuds est plutôt courte. C'est un arbre très rameux, au tronc noueux, au bois dur et dense et à l'écorce brune et crevassée. Les feuilles sont ovales allongées, portées par un court pétiole, assez dures, enroulées sur les bords, de couleur vert foncé luisant sur la face supérieure, et de couleur vert clair argenté avec une nervure médiane saillante sur la face inférieure. Le feuillage est persistant, toujours vert, mais cela ne veut pas dire que ses feuilles sont immortelles : elles se renouvellent constamment.

Les fleurs petites, blanches, sont regroupées en petites grappes de 10 à 20, poussant à l'aisselle des feuilles, en avril-mai, sur les bois de l'année précédente. Sa présence dans les régions les plus froides de la zone oléicole provençale atteste d'une bonne résistance au froid. On trouve des arbres ayant survécu au gel de 1956 jusqu'à 670 mètres dans les Alpes-de-Haute-Provence.

Le fruit est légèrement cylindrique, court, à base large hémisphérique, et à l'extrémité pointue, légèrement incurvée. Il ne devient jamais vraiment noir et peut être récolté avant véraison pour la production d'huile. L'épicarpe est lisse.

La pulpe est ferme, assez résistante aux chocs potentiellement générés durant la récolte et le stockage.

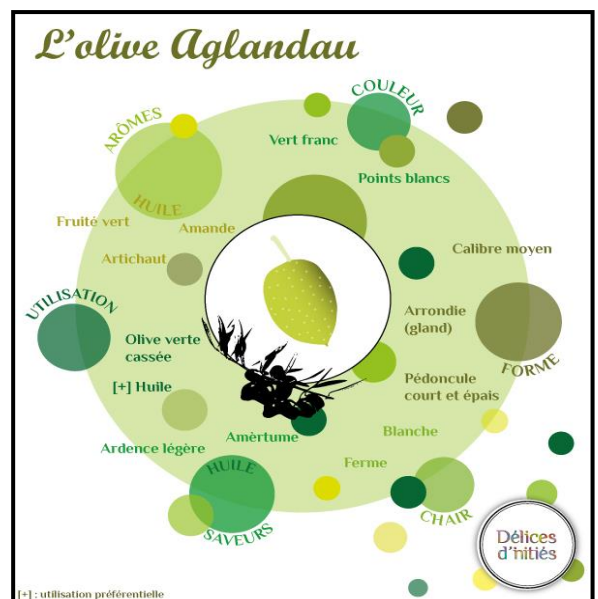


Figure 4 : infographie sur la variété d'olive Aglandau



Le noyau est relativement gros, et assez solidaire de la pulpe. Le calibre est régulier, présentant une répartition homogène de sa mise à fruits (on observe cependant fréquemment du millerandage en cas de déséquilibres nutritionnels, avec des fruits de 2 à 3 mm, en grappes). Les fruits sont généralement isolés, et l'attache pédonculaire est très solide ce qui fait de l'Aglandau une variété difficilement mécanisable.

Une des caractéristiques remarquables de cette variété est sa teneur en huile et sa facilité de traitement pour l'extraction de l'huile même s'il est nécessaire quelques fois d'ajouter un peu d'eau pour faciliter le phénomène de coalescence dans le procédé d'extraction. [Pinatel C *et al.* 2002].

III. Production d'huile d'olive

L'oléiculture est l'une des principales activités agricoles dans le monde localisée principalement (98%) dans le bassin méditerranéen. En Afrique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Tunisie, Maroc, Algérie, Libye, Egypte, Afrique du Sud et Angola. Les pays d'Europe qui cultivent l'olivier sont par ordre d'importance : L'Espagne, l'Italie, la Grèce, le Portugal, l'Albanie, Chypre, la France, la Slovénie et Malte. Le patrimoine oléicole mondial renferme un nombre d'oliviers assez important de l'ordre de 830 millions d'arbres occupant une superficie d'environ 10,6 millions d'hectares. La production atteint environ 3,3 millions de tonnes d'olives pour la campagne 2019/2020 [Marché de l'huile d'olive 2019-2020].

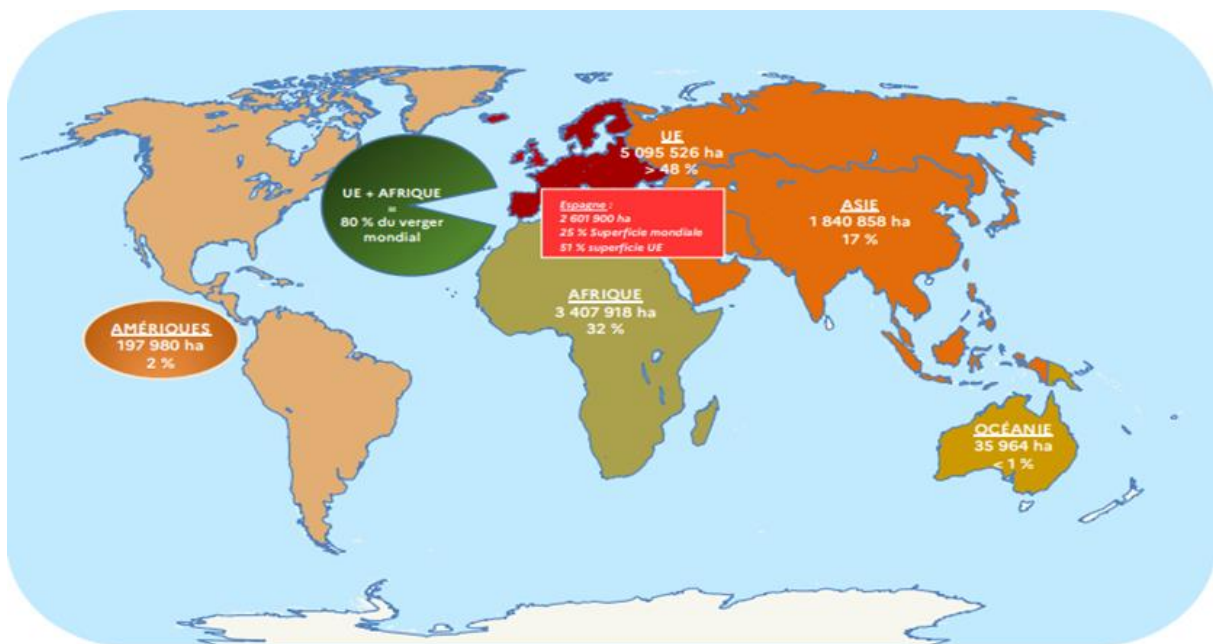


Figure 5 : répartition du verger mondial en 2019.



1. Processus d'extraction d'huile d'olive

Le processus d'extraction de l'huile d'olive commence par un lavage puis broyage des olives et se poursuit par un malaxage des pâtes résultantes et finalement la séparation de la phase huileuse (Fig. 6).

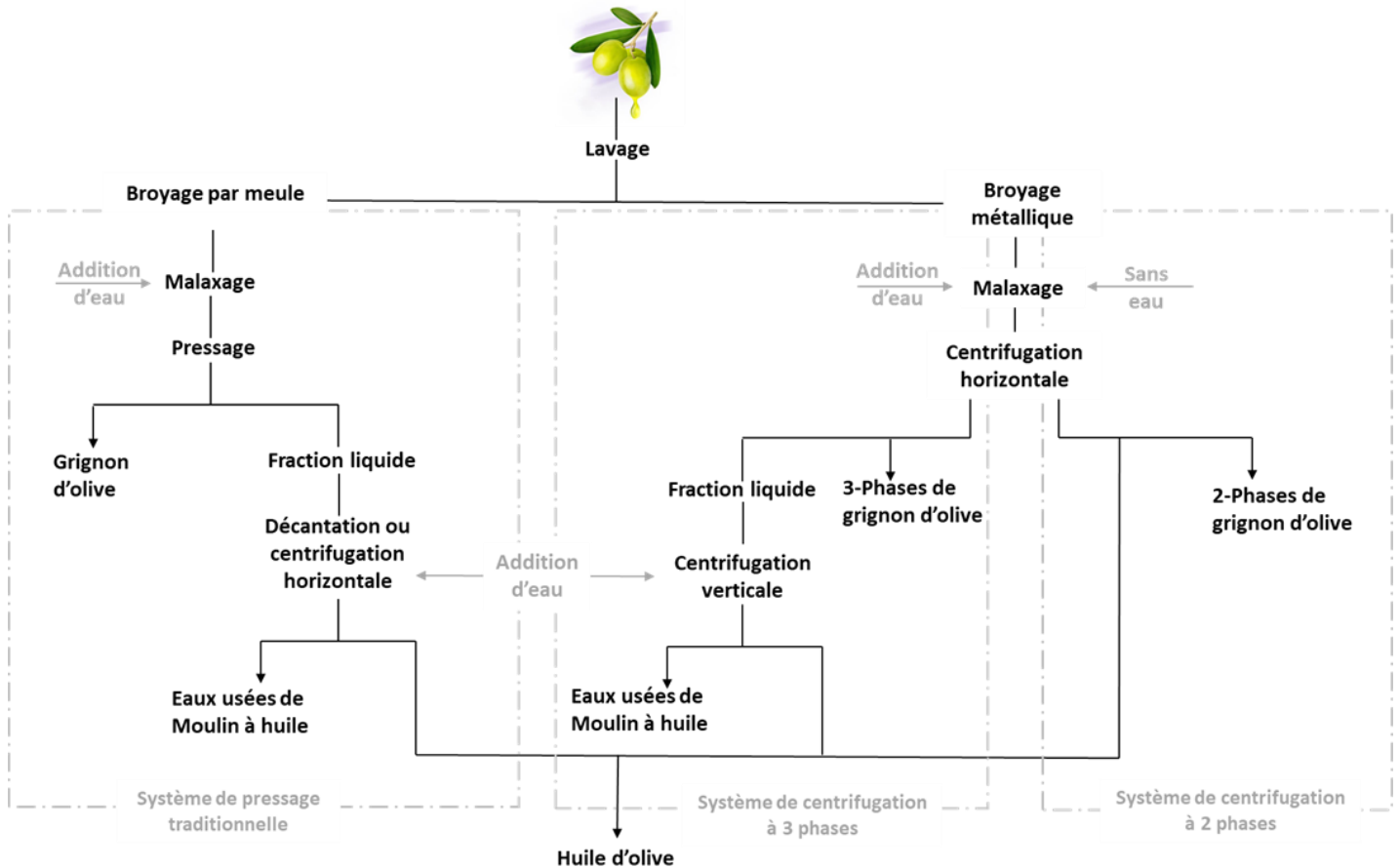


Figure 6 : plan général de la production d'huile d'olive par les trois systèmes d'extractions.

Dans le procédé de trituration traditionnelle, le broyage est effectué par une meule, par contre dans les appareils modernes on trouve les broyeurs métalliques. Les systèmes métalliques comme les broyeurs à marteaux ou à couteaux fonctionnent en continu ce qui accélère le processus de broyage et de fait augmente les volumes de production quotidiens. De plus, le choix de la technique de broyage a une grande importance sur les huiles vierges résultantes, elles peuvent être chimiquement différentes avec une qualité organoleptique et/ou une teneur en biophénols différentes (Veillet *et al.*, 2009).

Après broyage, la pâte d'olive obtenue est malaxée avant la séparation des phases. Cette étape de malaxage a une influence sur la composition de l'huile résultante en raison des



phénomènes de partage entre la phase huileuse, la phase aqueuse et la partie solide, ainsi qu'en raison de l'activité enzymatique qui se produit par les enzymes libérées de l'olive lors du broyage.

Dans les moulins traditionnels, le mélange est pressé entre des disques de fibres permettant une séparation de la phase solide appelée « grignon » qui est composée par des fragments d'olives solides et d'une phase liquide contenant principalement de l'huile d'olive et de l'eau de végétation.

La dernière étape consiste en une centrifugation ou une décantation de la partie liquide qui conduit finalement à l'huile d'olive et aux eaux usées.

Pour améliorer les rendements en huile d'olive, les procédés continus en deux et trois phases ont été étendus. Ces procédés sont basés sur des centrifugations successives horizontales et verticales directement appliquées après l'étape de malaxage. Les moulins triphasés nécessitent un ajout d'eau pour améliorer la coalescence lors du malaxage. Le volume élevé d'eaux usées qui est généré par ce système représente un inconvénient majeur, pour cette raison, la nouvelle génération de moulin biphasé a été développée avec un système centrifuge horizontal efficace qui ne nécessite pas un ajout d'eau pendant le processus de production. Par cette nouvelle technologie, on obtient uniquement l'huile d'olive et la pâte de grignon d'olive qui est un résidu solide humide d'olives broyées. Ces déchets d'olives sont considérés comme un sous-produit semi-solide composé d'eau de végétation et de morceaux d'olives solides.

Le système biphasé présente l'avantage de ne pas diluer les phénols d'olives hydrosolubles. Cependant, quel que soit le processus utilisé pour la séparation des phases, la plupart des biophénols se retrouvent dans les sous-produits. Le deuxième avantage du moulin à deux phases est le volume réduit de sous-produits, et par suite un impact environnemental minimisé.

2. Les sous-produits générés lors d'extraction d'huile d'olive

a. Margines :

Appelée aussi « eaux de végétation », les margines sont des liquides de couleur foncé (brune à brune-rougeâtre), d'aspect trouble avec une odeur prononcée [Argenson C *et al.* 1999]. Ce résidu a une forte charge saline (sels de potassium et des phosphates) et de pH acide (de 4,5 à 5), riches en matières organiques particulièrement en polyphénols. Cet effluent est caractérisé par une forte conductivité (de l'ordre de 10 mS.cm^{-1}) qui est due aux ions



calcium, potassium, chlorure et magnésium. Sa composition massique est de 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matières organiques et 0,4 à 2,5% de sels minéraux [Mekki H *et al.*, 2008]. La composition chimique des margines est très variable et dépend de plusieurs facteurs tels que la variété des olives, la maturité, la méthode de culture et le mode d'extraction de l'huile [Paraskeva *et al.*, 2006]. Le rejet de ces eaux de végétation sans aucun traitement, dans les milieux naturels pose un problème de pollution majeur à cause de sa toxicité qui est due en partie à sa forte teneur en composés phénoliques et en composés minéraux. L'évacuation de ces effluents dans les milieux aquatiques (les cours d'eau, les oueds et les fleuves) [Fiorentino A *et al.*, 2003 ; Lacomelli A *et al.*, 2000], engendre une diminution de la concentration d'oxygène dissous dans l'eau [Shabou *et al.*, 2005]. Ce phénomène participe à la pollution aquatique. En outre, l'épandage direct de ces margines sur le sol cause diverses nuisances par le fait de leur pH acide et de leur salinité élevée. De plus, l'abondance en composés phénoliques tend à déséquilibrer la microflore du [Rannali *et al.*, 2003].

b. Grignons d'olive :

Les grignons d'olive sont des sous-produits générés par le processus d'extraction de l'huile d'olive [Argenson *et al.*, 1999]. Ils peuvent être sous forme solide ou bien pâteux selon le processus d'extraction utilisé. En effet le processus à trois phases abouties à deux sous-produits : un résidu solide « grignons d'olive » et un résidu liquide « margines ». Par contre, le nouveau procédé à deux phases abouti à un seul sous-produit qui est « le grignon pâteux ». Les grignons pâteux d'olive sont composés des résidus de la pulpe, des peaux d'olive et des fragments des noyaux et de la margine ; sa composition chimique varie en fonction des variétés d'olives triturées. En général, il est composé d'une fraction riche en lignine provenant des fragments de noyaux, et une autre renfermant des glucides comme la cellulose et l'hémicellulose.

Dans une moindre mesure, on trouve de l'huile résiduelle et des faibles teneurs en protéines dont le taux dépend du procédé d'extraction et de l'optimisation de chaque étape du processus [Nefzaoui *et al.*, 1984].

Les grignons peuvent être réutilisés par l'industrie agroalimentaire pour extraire l'huile résiduelle moyennant des solvants organiques. Cette huile est constituée de lipides finement émulsionnés par les tensions superficielles qui sont inaccessibles par la pression et centrifugation. Cette huile de grignon d'olive brute extraite par des solvants doit être raffinée pour corriger certains défauts (y compris l'acidité) dus à la qualité non optimale des olives



puis mélanger avec de l'huile d'olive vierge pour être commercialisée. On obtient finalement une huile de grignon d'olive utilisable par exemple dans la fabrication du savon de Marseille.

IV. Composition générale d'huile d'olive

Toutes les huiles sont composées d'une fraction majeure dite saponifiable constituée des acides gras (essentiellement des triglycérides) et d'une fraction mineure insaponifiable contenant les polyphénols, tocophérols, caroténoïdes, stérols, etc.

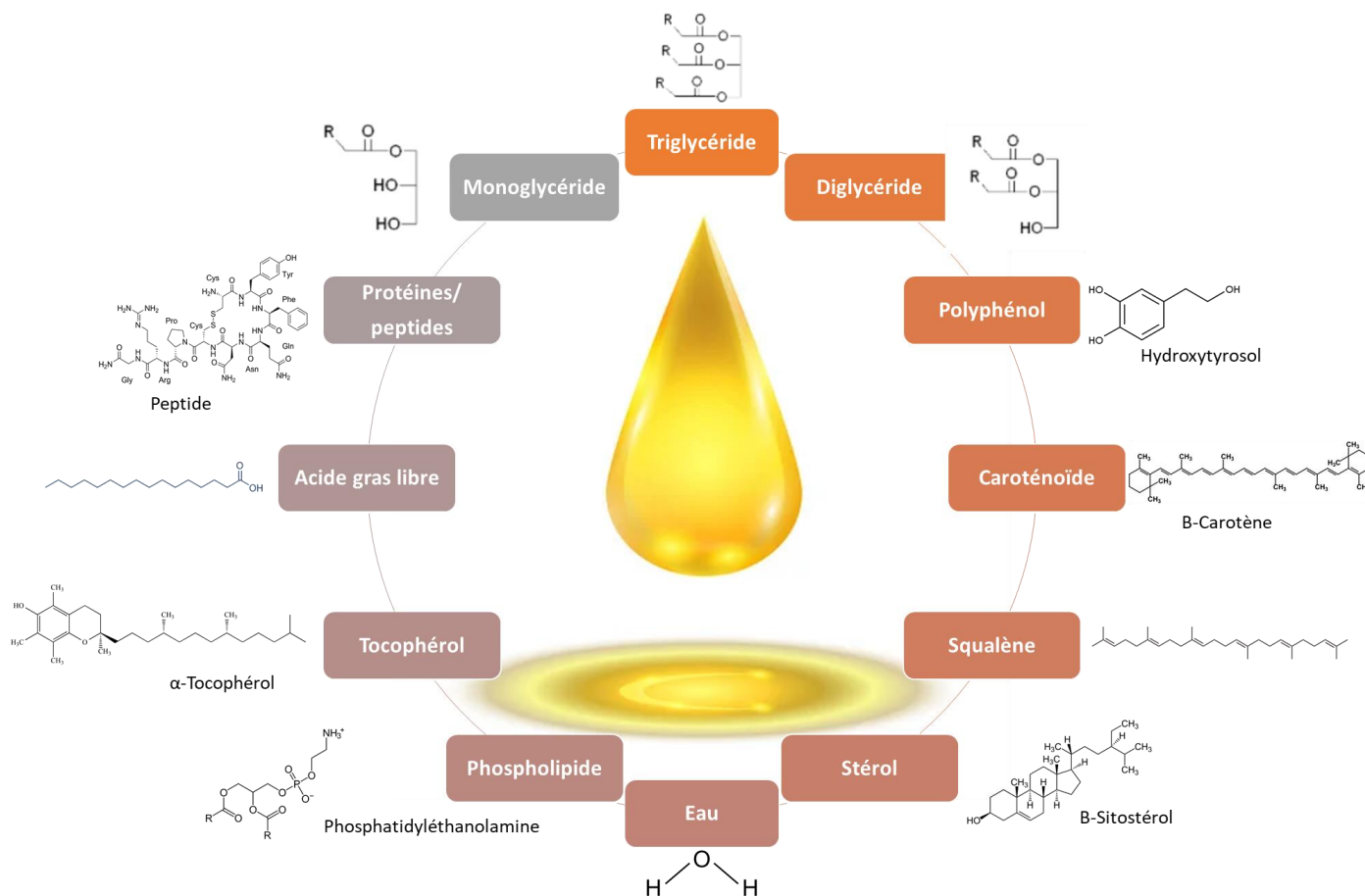


Figure 7 : composition d'une huile végétale

1. La fraction saponifiable

C'est la fraction majeure constituée de plus de 95% de triglycérides. Les triglycérides appelés aussi triacylglycérols sont des molécules qui résultent d'une réaction d'estérification de trois molécules d'acide gras (A.G) et une molécule de glycérol. Les acides gras peuvent être divisés en A.G saturé, A.G mono-insaturé et A.G poly-insaturé.

Les A.G insaturés peuvent être référencés selon la position de la première double liaison par rapport au groupement méthyl terminal. Les 2 grandes familles les plus connues du grand public sont des acides gras poly-insaturés de la famille des oméga 3 (comme l'acide



acide linoléique) et celle des oméga 6 (acide linoléique) présents naturellement dans l'huile d'olive mais le plus abondant dans l'huile d'olive est un oméga 9 : l'acide oléique. Les proportions des acides gras se répartissent généralement comme suit : 72% d'acides gras mono-insaturés, 14% d'acides gras poly-insaturés et 14% d'acides gras saturés [Harwood *et al.*, 2000].

2. La fraction insaponifiable

C'est la fraction des constituants mineurs qui représente que 1% à 5% de la composition totale d'une huile végétale. Elle peut être divisée en deux groupes, groupe des dérivés d'acides gras tels que les phospholipides, les stérides et les cires ; groupe non-reliés chimiquement aux acides gras qui contient les hydrocarbures, le squalène, les alcools aliphatiques, les tocophérols, les stérols, les pigments, les caroténoïdes et les composés phénoliques.

Les constituants mineurs d'une huile végétale représentent des indicateurs des caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques qui confèrent des propriétés sensorielles et biologiques distinctives [Harwood *et al.*, 2000].

3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés mineurs dans les huiles végétales spécifiques de l'huile d'olive qui jouent un rôle très important dans la caractérisation des huiles grâce à leur intérêt nutritionnel et stabilisant [Brenes *et al.*, 2002 ; Visioli *et al.*, 1998]. Ils participent fortement au goût piquant, à l'amertume et à l'astringence des huiles [Brenes *et al.*, 2000] ce qui contribue à la modulation de leurs saveurs, mais surtout ils lui confèrent des propriétés antioxydantes.

a. Définition :

Les composés phénoliques sont des composés phytochimiques omniprésents dans la plupart des règnes végétaux. Ce sont des métabolites secondaires abondants dans les plantes possédant une structure chimique commune comprenant au moins un cycle aromatique avec un ou plusieurs substituants hydroxyle. Ces composés présentent des centaines de structures différentes [Sabiha *et al.*, 2013] qui peuvent être divisés en plusieurs classes telles que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les lignanes et les tanins [Alu'datt *et al.*, 2017 ; Cong-cong *et al.*, 2017]. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale [Martin *et al.*, 2002].



b. Structure chimique et classification:

Le terme “phénol” englobe environ 10000 composés naturels identifiés [Hynes *et al.*, 2001 ; Mochizuki *et al.*, 2001]. Il est caractérisé par la présence d’un élément structural fondamental qui est le noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié un ou plusieurs groupements hydroxyle (OH) (Fig. 8). Ce groupement peut-être à l’état libre, ou engagé ans une autre fonction citons ester, éther ou hétéroside [Kakhlon *et al.*, 2002 ; Welch *et al.*, 2002].

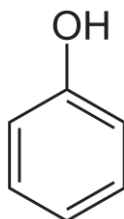


Figure 8 : structure du noyau phénol

Les composés phénoliques naturels sont synthétisés selon deux grandes voies d’élaborations de cycles aromatiques, la voie shikimate (responsable de la synthèse des acides aminés Tyr et Phe) et la voie polyacétate par la condensation des molécules de l’acétylcoenzyme A. Cette biosynthèse est responsable de la grande diversité des molécules qui sont spécifiques de chaque espèce de plante, de chaque organe et chaque tissu végétal.

La classification des composés phénoliques est basée essentiellement sur la structure moléculaire, le nombre de noyaux aromatiques ainsi les différents éléments structuraux qui les relie. On peut distinguer plusieurs classes qui dérivent de deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (fig. 9).

On distingue :

- **Les polyphénols simples :** qui présentent des structures chimiques allant de C₆ aux C₂₀ telles que les alcools et les acides phénoliques, les flavonoïdes, les lignanes et les stilbénoloïdes.

- **Les alcools phénoliques :** ils sont très rares dans la nature. Dans l’huile d’olive, on trouve l’hydroxytyrosol et le tyrosol, qui sont des alcools phénoliques dérivent directement de l’hydrolyse de l’oleuropéine et du ligstroside lors de la maturation de l’olive ou du procédé d’extraction de l’huile.
- **Les acides phénoliques :** ce sont des dérivés hydroxylés de l’acide benzoïque ou de l’acide cinnamique et ils possèdent au moins une fonction carboxyle et une fonction hydroxyle. Ils sont largement réponsus qu’on peut citer l’acide caféique, l’acide



férulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide vanilique (Yang *et al.*, 2007 ; Pinelli *et al.*, 2003 ; Garcia *et al.*, 2003).

- Les flavonoïdes : ce sont des molécules hydrosolubles qui interviennent dans la couleur des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils représentent le groupe principal de polyphénols avec plus de 4000 composés identifiés dans le règne végétal. Ils font partie des composés majoritaires trouvés dans les huiles, citons par exemple l'apigénine et la lutéoline (Ocakoglu *et al.*, 2009 ; Murkovic *et al.*, 2004 ; Ryan *et al.*, 2003).
- Les lignanes : ce sont des composés phénoliques formés de deux unités monolignols. Ils s'accumulent dans les tissus ligneux, les graines et les racines de plusieurs plantes ; Ils servent comme unités de base aux végétaux pour synthétiser les longs polymères et les tanins. Ils sont vraisemblablement impliqués dans les mécanismes de défense des plantes. Certains lignanes tels que le pinorésinol, laricirésinol et l'acide élenolique ont été détectés dans les huiles (Yang *et al.*, 2007 ; Brenes *et al.*, 2000).
- Les stilbénoides : ce sont des dérivés hydroxylés du stilbène. Ils sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures.

- **Les formes complexes** : qui résultent généralement de la condensation de certaines formes simples et qui contiennent plus de C₂₀ dans leurs structures chimiques ; telles que les tanins et les sécoiridoïdes.

- Les tanins : ce sont des polyphénols polaires existent presque dans chaque partie de la plante (racines, bois, feuilles, fruits et écorce). Les plus fameux composés de cette famille dans les huiles d'olive sont l'oleuropéine et le ligstroside.
- Les sécoiridoïdes : ce sont des métabolites secondaires présents chez de nombreux végétaux. Ils sont responsables de plusieurs propriétés thérapeutiques.

Ils sont présents avec des teneurs intéressantes dans l'huile d'olive, citons par exemple le verbascoside et le nuzhénide.

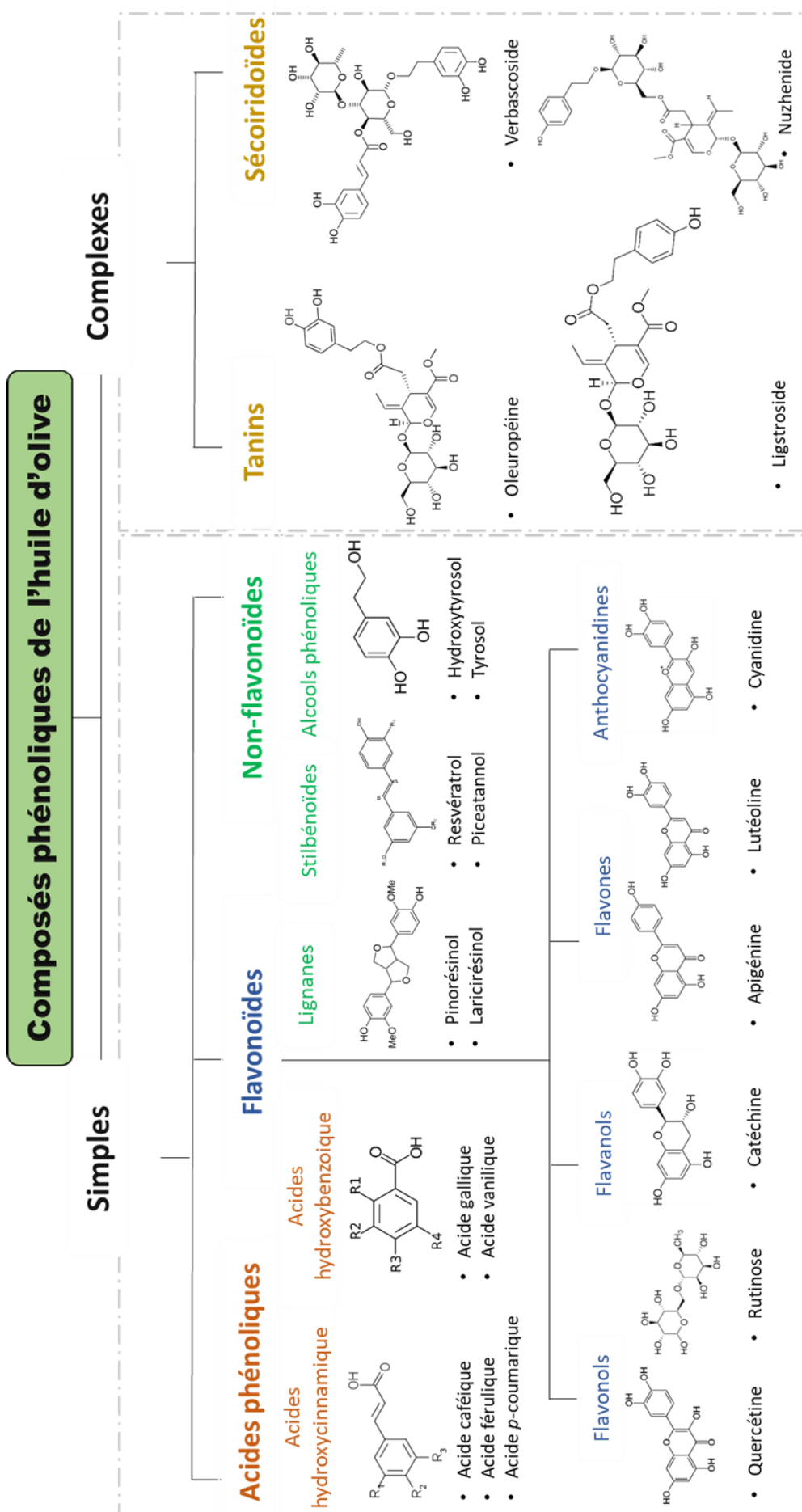


Figure 9 : classification des composés phénoliques de l'huile d'olive



c. Importance et bienfaits des composés phénoliques

Le progrès des techniques analytiques et des approches moléculaires ont aujourd'hui permis de préciser et d'affirmer la diversité et l'importance des composés phénoliques des plantes oléagineuses. Ces composés sont largement étudiés de par leur contribution à la protection de l'organisme contre le stress oxydant. De nombreuses études ont pu mettre en évidence notamment leur activité anticancéreuse *in vitro* [Bravo, 1998], antimicrobienne [Mnafgui *et al.*, 2015] et antioxydantes [Alu'datt *et al.*, 2013 ; Ghorbel *et al.*, 2021]. D'autres études ont pu aussi exposer leurs activités anti-hyperglycémiques sur des modèles animaux [Ben saad *et al.*, 2021], anti-hyperlipidémiques par leur pouvoir de diminuer l'excès en lipides dans le sang [Ben saad *et al.*, 2021], anti-inflammatoires chez l'homme en agissant comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation ainsi qu'une action cardioprotectrice [Mnafgui *et al.*, 2015 ; Mnafgui *et al.*, 2016]. Récemment des nouveaux travaux publiés par Mnafgui *et al.*, 2021 sont menés sur l'évaluation des mécanismes de protection sous-jacents de l'oleuropéine impliqués dans la réduction des lésions cérébrales.

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain en contribuant probablement à la défense de l'organisme contre les stress oxydant. Selon plusieurs études, les polyphénols sont des hypotenseurs qui jouent un rôle important dans la prévention des maladies cardio-vasculaires [Martin *et al.*, 2002 ; Khurana *et al.*, 2013]. Ils inhibent l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose pouvant provoquer l'occlusion des artères. Les flavonoïdes auraient des effets sur le fonctionnement des cellules immunitaires et inflammatoires. D'après Atrahimovich *et al.*, (2021) cette famille de composés phénoliques contribuerait à renforcer l'activité du système immunitaire. ; et d'après Kiokias *et al.*, 2018, Ils auraient un effet protecteur contre les dommages de l'ADN.

En cosmétologie, l'utilisation des composés phénoliques dans la formulation des produits cosmétiques ont divers intérêts qui sont liés aux propriétés antioxydantes, pouvoir anti-inflammatoire, effet antimicrobien, etc. Ils sont très utilisés dans les crèmes d'anti-âge en tant qu'actif antiradicalaire [Macheix *et al.*, 2005].

Dans les produits alimentaires, outre leur rôle de conservateur grâce à leurs propriétés antioxydantes, les polyphénols participent fortement aux critères de qualité par leurs capacités d'influencer l'aspect, la couleur et même le goût des aliments. La « sensation en bouche » des boissons aux fruits, l'amertume et l'astringence sont également associées à des composés phénoliques bien spécifiques. Certains composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes peuvent être utilisés comme des pigments naturels dans certains aliments [Shoji 2007].



V. Les grignons d'olive

1. Les caractéristiques chimiques

Contrairement aux autres tourteaux oléagineux les grignons bruts sont pauvres en matières azotées et riches en cellulose brute. Ils restent relativement riches en matières grasses (4-10%). [Alibes et Berge, 2011]. Les grignons sont riches en acides gras en C₁₆ et C₁₈ insaturés qui constituent 96% du total des acides gras. Ce coproduit est vulnérable à l'oxygène de l'air, à la lumière et à la température qui favorise les réactions d'oxydation. La teneur en composés phénoliques des grignons d'olive est très élevée, puisque plus que 98% de la majorité de ces composés présents dans l'olive passe dans le grignon lors du processus d'extraction de l'huile d'olive.

Parmi les composés phénoliques majoritaires on cite, l'hydroxytyrosol C₈H₉O₃, le tyrosol C₈H₁₀O₂, l'oleuropéine C₂₅H₃₂O₁₃, le nuzhénide C₃₁H₄₁O₁₇ et on trouve aussi les acides phénoliques tels que l'acide gallique C₇H₆O₅, l'acide vanilique C₈H₈O₄, l'acide caféique C₉H₈O₄, l'acide férulique C₁₀H₁₀O₄ et l'acide *p*-coumarique C₉H₈O₃.

2. Domaines d'utilisation des grignons d'olive

a. Alimentation animale

D'après une étude de la FAO, en Tunisie, les grignons bruts sont mélangés avec le son ou le cactus pour l'alimentation des dromadaires ou des ovins pendant les périodes difficiles [Alibes *et al.*, 2011]. En 2013, la FAO a également mené une expérience à Al-Jouf en Arabie Saoudite, en remplaçant pour l'alimentation de chameilles l'apport de céréales coûteuses comme l'orge par des grignons d'olive complétés par de la luzerne. Les résultats de l'expérience ont montré qu'il n'y avait aucun impact négatif sur la production de lait. Cependant, la composition en matières grasses du lait de chameilles présentait d'avantage d'acides gras insaturés, bénéfiques pour la santé humaine avec une alimentation supplémentée en grignons d'olive. Au Japon, sur Shodoshima, l'île aux olives, ce sont les bœufs qui bénéficient des grignons d'olive. L'entreprise Toyo Olives a développé une machine permettant de déshydrater et broyer les grignons, pour les transformer en croquette données en pâture aux fameux bœufs Wagyu, dont la viande est unique de la région de Kobe. 100 grammes de poudre de grignons séchés par jour au menu de ces « Boeufs Olive ».

Dans l'alimentation animale, la poudre de noyaux d'olives constitue une alternative végétale très intéressante aux céréales plus coûteuses, à la farine de poissons élevés dans des conditions douteuses ou encore à la farine d'os. En effet, les noyaux d'olives apportent



beaucoup de glucides (saccharose, glucose, fructose, pectine, xylose, mannitol et myo-inositol) et de fibres faciles à digérer (cellulose, hémicellulose et lignite).

b. Domaine cosmétique :

Dans les produits cosmétiques, le noyau d'olive est utilisé en tant qu'abrasif surtout dans les gommages pour la peau. De ce fait, le noyau sera nettoyé, séché puis réduit en poudre, pour obtenir finalement des particules solides, dures, stables et homogènes.

c. Domaine des matériaux de construction

Le granulé de noyaux d'olives est également utilisé en tant qu'agent liant et structurant dans les domaines du bâtiment. Il est utilisé sous forme de briques très résistantes mécaniquement ou comme mortier aussi performant que le béton traditionnel par la société EDILTECO France [Noble 2013]. Le directeur marketing & technique d'EDILTECO, Frank Pied, a affirmé dans un article du journal *batiactu*, que cet éco-matériau présente des caractéristiques intéressantes ainsi des performances supérieures à celles des mortiers traditionnels. Dans le cadre d'un mémoire de master (filiale génie civil) porté sur la formulation et caractérisation d'un éco-matériau de déchets végétaux, Maachou F. et Zerrouki A.W. (2020) ont pu démontrer que l'ajout de déchets de noyaux d'olive au mortier améliore ses caractéristiques thermiques et diminue sa maniabilité et sa densité.

d. Domaine du sport

Parmi les utilisations les plus pertinentes des granules de noyaux d'olives, on peut citer leur utilisation en tant que remplaçant des granules de caoutchouc qu'on retrouve habituellement sur les terrains de football, réputés toxiques et polluants [Gryniewicz-Bylina *et al.*, 2022]. Cette initiative a été prise par la France pour l'inauguration d'un terrain de foot 100% naturel « La Ciotat » en 2020. En effet, 60 tonnes de noyaux d'olives concassées ont été utilisés pour inaugurer la totalité surfacique du terrain.

e. Chauffage zéro-déchets

L'utilisation des grignons d'olive comme biomasse pour le chauffage se développe sous différentes formes. Bien que leur pouvoir calorifique soit inférieur à celui du fioul, il est possible de les transformer pour améliorer leur performance.

En Tunisie, la PME Lebrun Fils fabrique des granules de noyaux d'olives broyés, sans colle ni additif, pour un pouvoir calorifique de 6 kWh/kg. Elle met en avant l'absence de poussière ou autre matière volatile de la combustion des noyaux d'olive.



Au Liban, Joseph Al Khoury producteur et moulinier sous la marque Willani, a intégré à son moulin une machine qui confectionne des bûches de grignons, qu'il commercialise ensuite comme bois de chauffage. Les grignons sont séchés, broyés puis compactés et moulés en cylindres.

En « Crète », les olives sont dénoyautées avant le broyage puis séchées au soleil dans des grands sacs en filet avant leur utilisation comme combustible.

En Espagne, la ville de Carloza utilise les noyaux d'olive pour chauffer l'eau de la piscine municipale. Pour ce faire, il faut compter 140 tonnes de noyaux d'olives par an.

f. En cuisine

Certains boulangers ou chefs innovants intègrent de la farine de noyaux d'olives, dites Fleurette de noyaux d'olives, dans leur pâte à pain par exemple, ou les utilisent concassés et caramélisés en pâtisserie, ou broyés en chapelure. C'est un ingrédient biologique, sans céréales et sans gluten.



Figure 10 : fleurette de noyaux d'olives 0-50 microns

VI. Les techniques d'extraction adoptées

1. Macération conventionnelle

L'extraction par macération est une technique traditionnelle simple, qui peut être utilisée pour extraire des substances bioactives d'une matrice végétale. C'est une méthode d'extraction solide-liquide qui consiste à laisser tremper la matière végétale dans un solvant (solvant organique, eau, huile ou mélange hydroalcoolique) pendant une durée bien déterminée. Le solvant pénètre dans la structure cellulaire pour solubiliser des solutés, généralement de même polarité que le solvant. Pour accélérer cette technique et augmenter son efficacité, des catalyseurs physiques (le chauffage et l'agitation mécanique ou magnétique) peuvent être utilisés. Le chauffage modéré du milieu d'extraction influence le rendement et la durée de l'extraction, mais un risque d'altération de certains composés thermosensibles peut se poser. L'agitation soit magnétique ou mécanique est recommandée pour homogénéiser le mélange et augmenter la surface de contact soluté-solvant.

La fin de l'extraction est marquée par l'épuisement de la matière végétale et la saturation du solvant. L'extrait obtenu est filtré puis évaporé sous pression réduite pour obtenir finalement un résidu solide, pâteux ou huileux de la plante étudiée.



C'est une technique simple et facile à utiliser, elle ne nécessite pas d'appareillage spécifique. L'inconvénient majeur de cette technique est le temps d'extraction qui est assez long ainsi que l'utilisation d'une grande quantité de solvant.

Dans le but de trouver des solutions moins consommatrices de temps et plus respectueuses pour l'environnement, nous nous sommes tournés vers les procédés d'éco-extraction. L'éco-extraction est « basée sur la découverte et la conception de procédés d'extraction permettant de réduire la consommation énergétique, avec l'utilisation de solvants alternatifs et de ressources végétales renouvelables tout en garantissant un extrait/produit de qualité » [Chemat 2011].

2. Extraction accélérée par solvant « ASE »

L'extraction accélérée par solvant a plusieurs autres nominations, elle a été décrite par différents groupes de recherche comme une extraction par liquide sous pression, une extraction par solvant améliorée, une extraction par fluide accélérée et une extraction par solvant à haute pression. L'ASE est une technique qui applique une haute pression lors de l'extraction ce qui aide à maintenir les solvants à l'état liquide au-dessus de leur point d'ébullition. Cela se traduit par une haute solubilité et un taux de diffusion élevé des solutés lipidiques dans le solvant, ainsi qu'une meilleure pénétration du solvant dans la matrice [Zhang *et al.*, 2018]. Comme indiqué par son nom, l'extraction accélérée par solvant est une technique rapide qui peut réduire la consommation de solvant par rapport aux autres méthodes. L'ASE a été appliquée avec succès pour extraire différents types de produits naturels, notamment les saponines, les flavonoïdes et les huiles essentielles [Yi *et al.*, 2012 ; Ly *et al.*, 2010 ; Xu *et al.*, 2010 ; Xu *et al.*, 2015].

3. Extraction assistée par Ultrason à sonde « UAE »

Historiquement, l'UAE a été utilisée pour la première fois en 1950 dans le procédé de la fabrication de la bière [W. Specht, Z. Lebensm.-Untersuch. ul-Forsch. 94 (1952) 157]. L'ultrason est une fréquence sonore comprise entre 18 et 100 Hertz (Hz). L'UAE n'est réalisée que lorsque les ondes ultrasonores sont de haute puissance et de faible fréquence. Ce couplage est considéré comme « ultrasons de puissance » car il provoque des ondes ultrasonores très énergétiques qui se déplacent dans le solvant en créant des cycles alternés de haute et de basse pression, ce qui entraîne le phénomène de cavitation acoustique. La cavitation acoustique entraîne localement des différences de pression, des taux de chauffage/refroidissement, et des forces de cisaillement élevées dans le milieu liquide. Lorsque les bulles de cavitation implosent à la surface des solutés, les micro-jets et les



collisions inter-particulaires provoquent des effets tels que la sonoporation, l'érosion et la rupture des cellules. En outre, l'implosion des bulles de cavitation dans le milieu liquide crée des micro-mélanges et des macro-turbulences. Ces implosions violentes perturbent ou fragmentent la surface de la matrice solide tout en accélérant la diffusion et en améliorant le transfert de masse [Chemat *et al.*, 2008 ; Jambrak *et al.*, 2008].

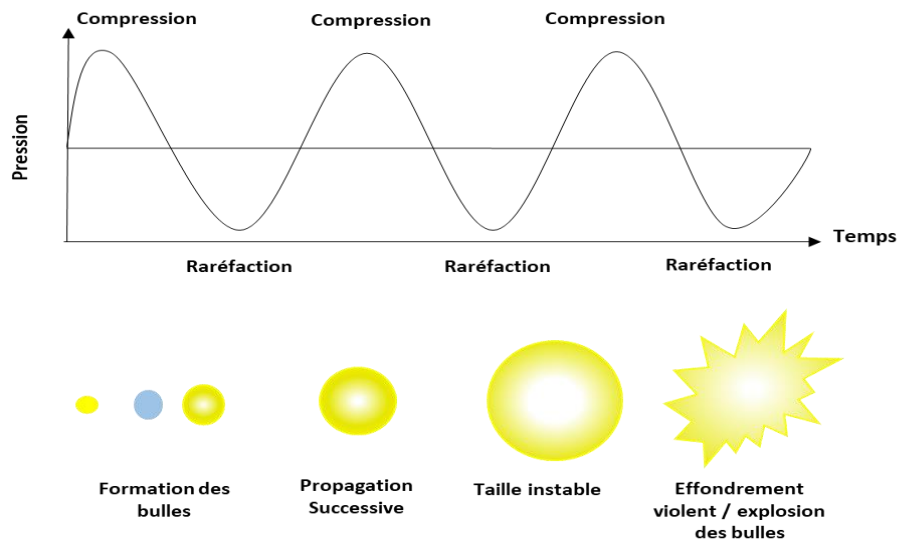


Figure 11 : schéma descriptif du phénomène de cavitation ultrasonore

Il existe plusieurs types d'appareils ultrasons mais les plus utilisés en laboratoires sont : le bain et la sonde assistés par ultrasons. Le bain à ultrasons (fig.12 a) est couramment utilisé pour la dispersion solide dans le solvant grâce à son efficacité en termes de réduction de la taille des particules solides ce qui améliore leur solubilité. Les sondes assistées par ultrasons (fig. 12 b) appelé aussi le système corné est un dispositif directement immergé dans le milieu réactionnel. Cette technique peut être considérée comme plus puissante que celle à bain car l'intensité des ultrasons est délivrée sur un petit volume (uniquement autour de la pointe de la sonde). Ce système de sonde est largement utilisé pour la sonication des échantillons de faibles volumes mais des précautions doivent être prises vis-à-vis l'augmentation rapide de la température de l'échantillon.

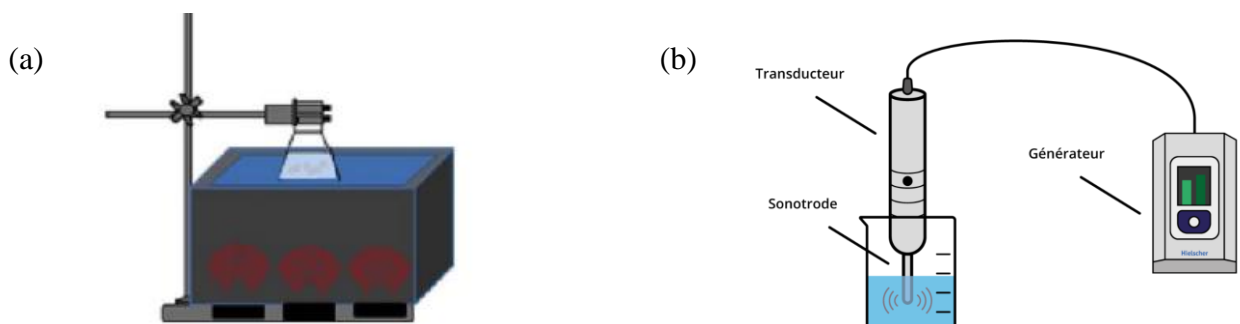


Figure 12 : dispositifs d'un bain (a) et d'une sonde (b) à ultrason



Les ultrasons sont capables de faciliter les processus d'extraction à la fois par la rupture des cellules et l'amélioration du transfert de masse dans la couche limite qui entoure la matrice solide. En effet, la perforation des membranes et des parois cellulaires, améliore leur perméabilité en constituant une étape intermédiaire avant que les cellules ne soient complètement perturbées par la sonication. En outre, les effets mécaniques de la cavitation induite par les ultrasons, tels que les ondes de chocs, les différences de pression et de chaleur, les forces de cisaillement et les micro-flux intensifient la pénétration du solvant à l'intérieur de la cellule et améliorent le transfert de masse entre la matrice et le solvant, de sorte que les matériaux intercellulaires entrent en contact avec le solvant. L'extraction par ultrasons a plusieurs avantages citons le rendement élevé, la rapidité du processus ainsi que son utilisation possible pour de nombreux solvants.

4. Extraction assistée par Micro-ondes « MAE »

En 1936, Ganzler et Lane ont été les premiers chimistes à utiliser l'énergie des micro-ondes dans l'extraction d'ingrédients alimentaires [Ganzler *et al.*, 1990]. Malgré le potentiel de cette source d'énergie, les micro-ondes n'ont été réellement mises en exergue dans les laboratoires qu'au cours des deux dernières décennies. A ce jour, l'utilisation des micro-ondes comme une technique d'extraction est documentée par plus de 2000 articles [Vinatoru *et al.*, 2017].

Le principe du chauffage micro-ondes repose sur la rotation dipolaire des molécules polaires sous l'effet d'un champ électrique alternatif. En effet, le chauffage par micro-ondes résulte de la propagation des ondes électromagnétiques dans le milieu irradié. La spécificité de cette technique repose sur le transfert de chaleur qui au contraire du chauffage traditionnel, se propage de l'intérieur du milieu irradié vers l'extérieur. Les micro-ondes ne sont absorbées que par les dipôles qui transforment leur énergie en chaleur. La rotation des dipôles irradiés par les micro-ondes et la chaleur produite, entraîne l'augmentation rapide de la température et de la pression à l'intérieur des cellules conduisant à la décomposition de la paroi cellulaire et la libération des molécules d'intérêts d'une manière sélective [Chemat *et al.*, 2017].

Cette technique présente l'avantage de la rapidité d'extraction, de sa sélectivité, et sa capacité à préserver les propriétés organoleptiques et physico-chimiques des substances d'intérêts.

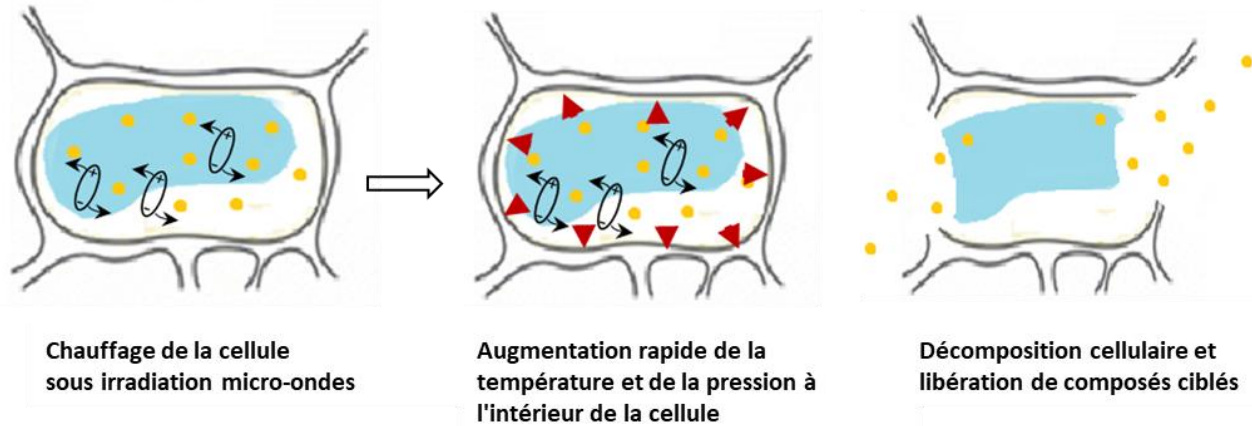


Figure 13 : schéma descriptif du phénomène d'extraction par l'irradiation micro-ondes [Chemat *et al.*, 2017].

5. Microbilles « BM »

La technique de broyage ou d'homogénéisation à l'aide de microbilles est une méthode basée sur la rupture mécanique des cellules. En utilisant cette technique, la rupture cellulaire est induite par des forces de cisaillement produites lors du mouvement de rotation des cellules et des billes [Gong *et al.*, 2016] (Figure 14). Les collisions microbilles-cellules sont également supposées être impliquées dans le mécanisme par lequel le broyage des billes perturbe les cellules [Nooralabettu *et al.*, 2010]. Plusieurs paramètres doivent être pris en considération lors de l'utilisation de cette technique, citons par exemple le diamètre, la densité et le remplissage des microbilles ainsi que la vitesse d'agitation [Montalescot *et al.*, 2015]. Ces paramètres doivent être optimisés en fonction de la rigidité de la paroi cellulaire de la matrice à étudier ainsi que de la viscosité du milieu. Le rendement de cette technique peut être optimisé par la détermination de la concentration optimale de la biomasse pour assurer une perturbation maximale des cellules. Il existe des interactions complexes entre les différents paramètres du processus, qui nécessitent un réglage fin pour garantir l'efficacité et l'efficience. Les résultats du broyage des billes peuvent s'avérer difficiles à prédire en raison de la complexité des interactions des paramètres [Burmeister *et al.*, 2013].

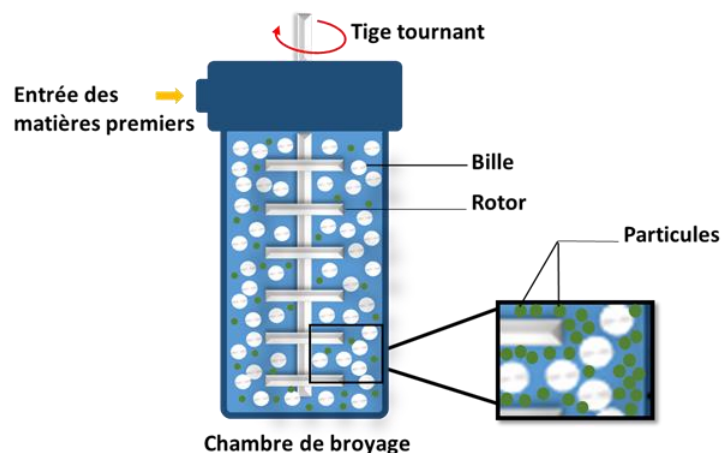


Figure 14 : schéma descriptif du phénomène d'extraction par microbilles



VII. Prédiction théorique : Logiciel COSMO-RS

1. Définition

Le COSMO c'est une abréviation de "COnductor like Screening MOdel". C'est un modèle de criblage développé par Klamt et ses collaborateurs en tant que méthode de prédiction de solvation d'un soluté dans un solvant ou mélange de solvants [Klamt *et al.* 1998].

Ce modèle est devenu très populaire en chimie computationnelle en raison de sa simplicité algorithmique et de sa stabilité numérique. En appliquant ce modèle de prédiction dans l'industrie, certaines limitations de l'ensemble de l'approche de solvation sont devenues apparentes, comme par exemple, l'incapacité de distinguer deux solvants qui ont des constantes diélectriques identiques. Cette limitation conduit à l'invention d'un nouveau concept basé sur la combinaison entre le COSMO et le traitement statistique thermodynamique des surfaces en interaction. Ce modèle a été publié par la suite en tant que modèle de criblage de type conducteur pour une réaliste solvation nommé COSMO-RS «COnductor like Screening Model for Real Solvent» [Cossi *et al.*, 2003; klamt *et al.*, 1995].

2. Mode de fonctionnement

Ce modèle est basé sur une combinaison de la chimie quantique et la thermodynamique statistique. Il permet la prédiction de toutes sortes de propriétés d'équilibre thermodynamique des liquides ce qui rend le modèle intéressant pour la prédiction des énergies de solvation.

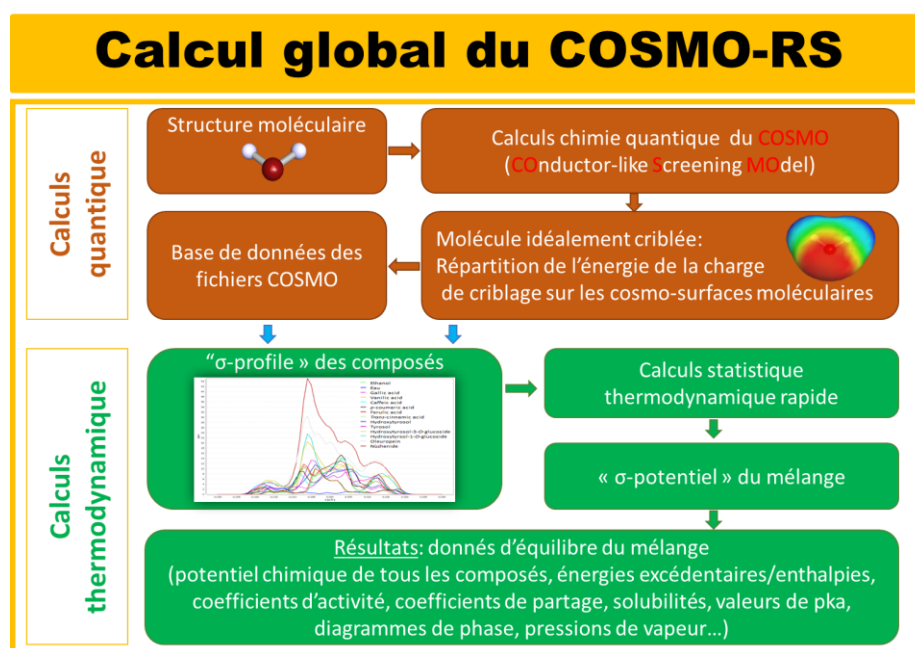


Figure 15 : schéma descriptif du mode de calcul global du logiciel COSMO-RS



3. Objectifs du COSMO-RS

Après l'insertion des molécules cibles, la démarche du COSMO-RS se déroule dans un ordre chronologique d'un ensemble des objectifs à traiter qui se répartit en 4 parties.

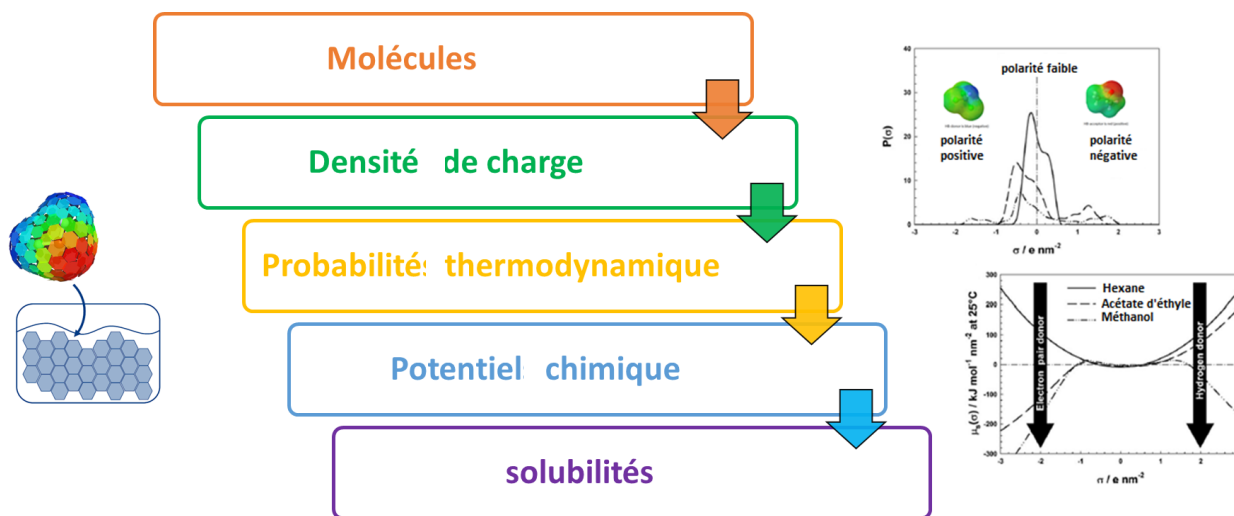


Figure 16 : les différents objectifs traités par le logiciel COSMO-RS

a. Densité de charge électrique :

La densité de charge électrique fait référence à la quantité de charge électrique par unité d'espace. Selon que l'on considère 1, 2 ou 3 dimensions, soit une ligne, une surface ou un volume, on parlera de densité, de densité surfacique ou de volume de charge. Le point de départ est la simulation (par des outils de calculs quantiques) de la molécule immobilisée, d'une part dans le vide et, d'autre part, dans un état hypothétique qui est celui d'un conducteur parfait. Dans le conducteur parfait (état COSMO), les lois de l'électrostatique stipulent que le potentiel électrostatique global (Θ) sur la surface d'une molécule individuelle doit être nul. Par contre, en supposant que chaque élément de surface est isolé, le système est équivalent à un ensemble d'éléments de surface (σ_i) avec des potentiels locaux (Θ_i) et des charges (q_i). Le modèle COSMO-RS (COSMO Real Solvation) repose sur cette image.

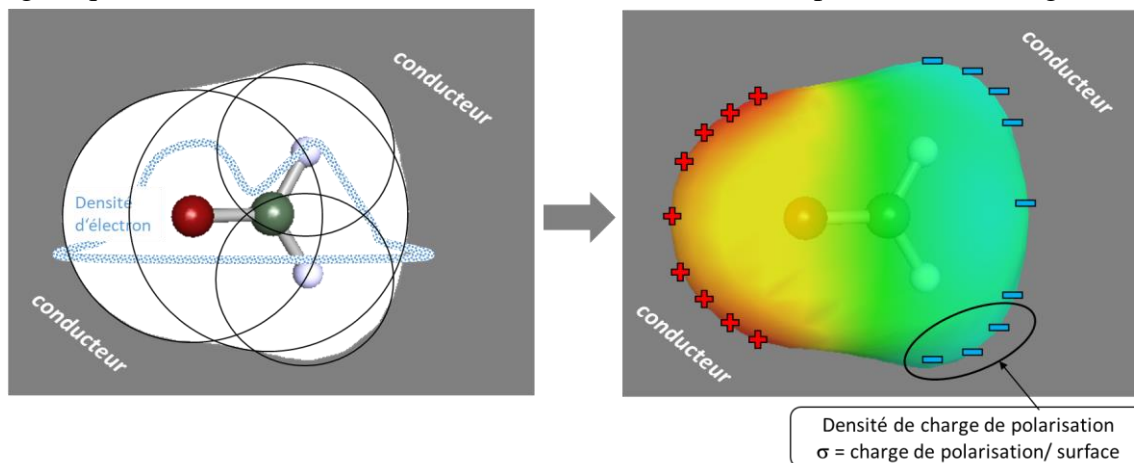


Figure 17 : répartition de la densité de charge de polarisation à la surface d'une molécule conductrice



Le traitement avec des méthodes de physique statistique d'ensembles d'éléments chargés en interaction de contact électrostatique permet de déterminer les propriétés d'excès. Pour une molécule donnée, chaque élément de surface a donc une densité surfacique de charge, encore appelée charge de polarisation ($\Theta_i = q_i/\sigma_i$), qu'à partir de laquelle le logiciel COSMO donne une représentation approximative de chaque molécule.

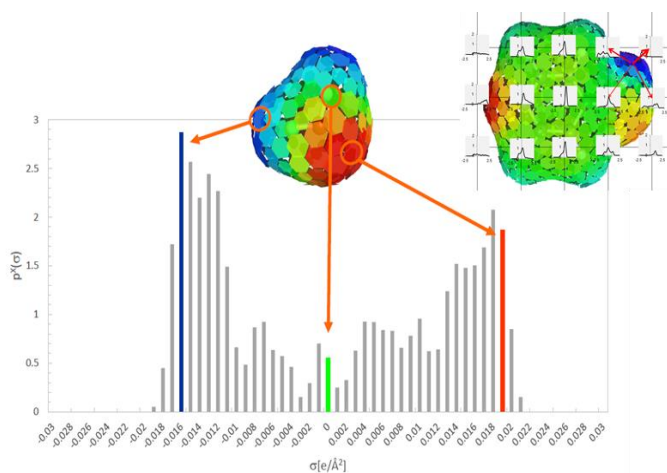


Figure 18 : histogramme de la charge de criblage de surface d'une molécule donnée

Chaque molécule peut être représentée par un histogramme de surface par rapport à la densité de charge de criblage, appelé σ (sigma) profil. Le profil σ ($p(\sigma)$) est une représentation 2D de l'information de la surface 3D σ .

Dans ce contexte, une molécule donnée peut être décrite par la répartition des charges à sa surface. Cette dernière prend la forme d'une densité de probabilité dénommée σ -profile qui relie la valeur de la densité surfacique de charge σ (en $e/\text{Å}^2$) au nombre d'éléments de surface.

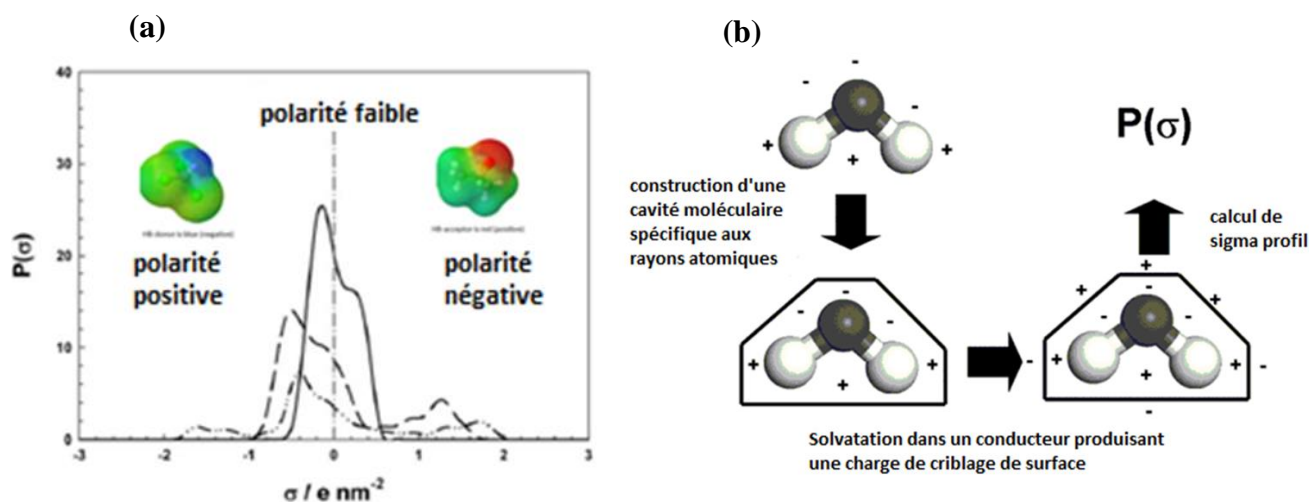


Figure 19 : description de la polarité moléculaire, σ -profil d'une molécule (a) et démarche de calcul d'un σ -profil d'une molécule (b)

Dans notre cas, nous utilisons une molécule et un solvant, donc ce système n'est pas valide car la molécule est entourée par un solvant dont les charges ne sont pas réparties de la



même façon ; C'est là qu'intervient le COSMO-RS. C'est une combinaison de COSMO avec le traitement thermodynamique statistique des surfaces en interaction, qui a été publié en tant que modèle de criblage de type conducteur pour une solvation réaliste, abrégé en COSMO-RS [Cossi et al. 2003 ; Klamt et al. 1995].

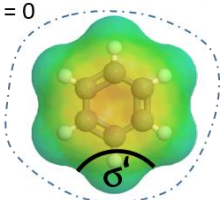
b. Probabilité thermodynamique :

- Modélisation soluté-solvant (liquide) :

Dans le cas d'un conducteur parfait décrit précédemment, la molécule est isolée et ne perçoit pas les autres molécules autour. Par contre, pour les molécules comme solvants ou les molécules dans des solvants, y compris leurs énergies d'interaction, la thermodynamique statistique doit être prise en considération. Ainsi, l'approche COSMO-RS considère l'interaction complexe dans des systèmes liquides comme des contacts locaux de segments de surface avec les densités de charge σ et σ' (interactions par paires de segments de surface).

Premièrement, pour chaque molécule isolée, la méthode COSMO est appliquée et les charges de surface apparentes sont déterminées dans une cavité.

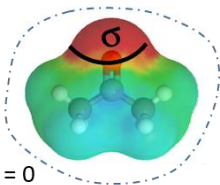
$$\Sigma e = 0$$



Plusieurs approximations sont considérées ici :

- La cavité est constituée de sphères de rayons axiaux.
- Les molécules entourées d'un conducteur parfait

$$\Sigma e = 0$$



La surface de contact moléculaire virtuelle conductrice (double couche) est calculée par la méthode COSMO chimique quantique. Les contributions les plus importantes à l'interaction énergie fonctionnelle sont l'énergie d'inadaptation électrostatique, et la liaison hydrogène. Avec la réduction de toutes les interactions à des interactions locales de paires (voir schéma ci-dessus) de pièces de surface moléculaire, l'ensemble des molécules en interaction pourrait être considéré comme un ensemble de segments de surface interactifs indépendants. Sur la base de ce modèle, les systèmes suivants peuvent être traités par des calculs COSMO-RS : estimation de l'affinité d'une molécule à une autre selon la densité de charge de contact σ .

Par conséquent, la molécule est considérée comme solvant et son affinité pour une autre molécule est représentée comme le potentiel σS (σ) ; estimation de l'affinité d'une molécule i dans un solvant S calculé comme son potentiel chimique $\mu_i S$.

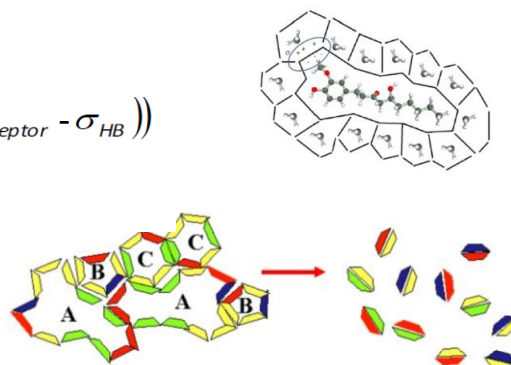


Le potentiel σ_S (σ) d'un solvant S avec la polarité σ représente le potentiel chimique par surface. Cette représentation montre l'affinité pour une certaine densité de charge d'une molécule en tant que solvant S. Plus le potentiel σ est négatif, plus l'affinité de la molécule de solvant est élevée à la densité de charge considérée. Les pièces de surface sont liées par paires de surfaces et l'énergie d'interaction totale peut être exprimée comme une somme des interactions de surface $E(\sigma, \sigma')$.

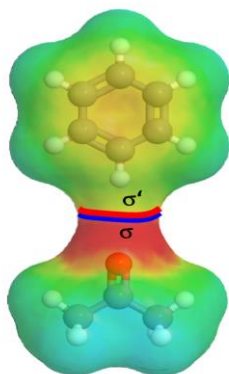
$$E_{misfit}(\sigma, \sigma') = a_{eff} \frac{\alpha'}{2} (\sigma + \sigma')^2$$

$$E_{HB} = a_{eff} c_{HB} \min(0; \min(0; \sigma_{donor} + \sigma_{HB}) \max(0; \sigma_{acceptor} - \sigma_{HB}))$$

$$E_{vdW} = a_{eff} (\tau_{vdW} + \tau'_{vdW})$$



Ainsi, l'écart énergétique entre la molécule dans un conducteur parfait (état COSMO) et la molécule dans un solvant réel (état liquide) peut être exprimé.



- Pour chaque contact de pair de surfaces, il y a un changement d'énergie
- Il en résulte un comportement différent pour les différentes substances en solution
- De toute évidence, il existe de nombreuses dispositions de contact possibles et une thermodynamique statistique est nécessaire

c. Potentiel chimique

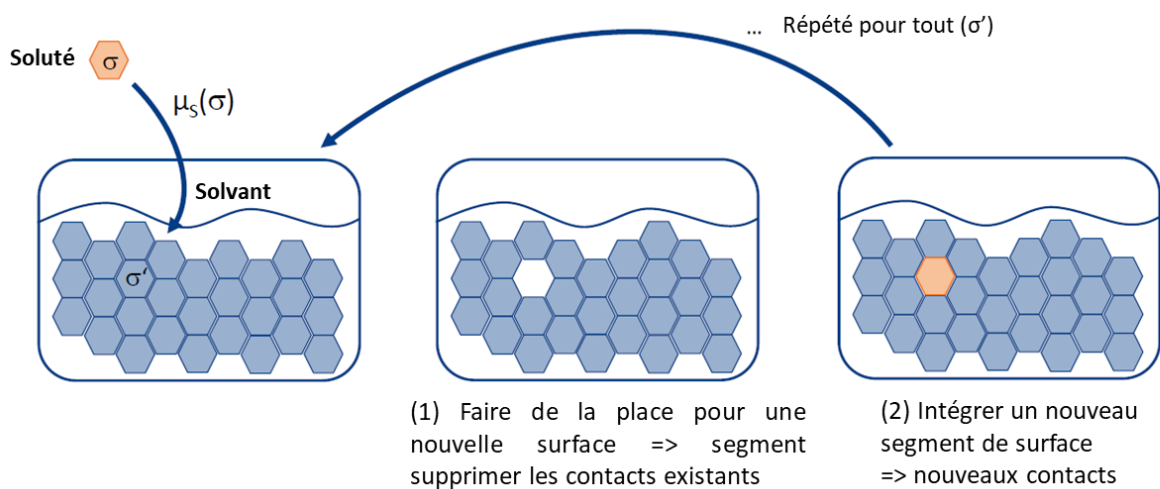
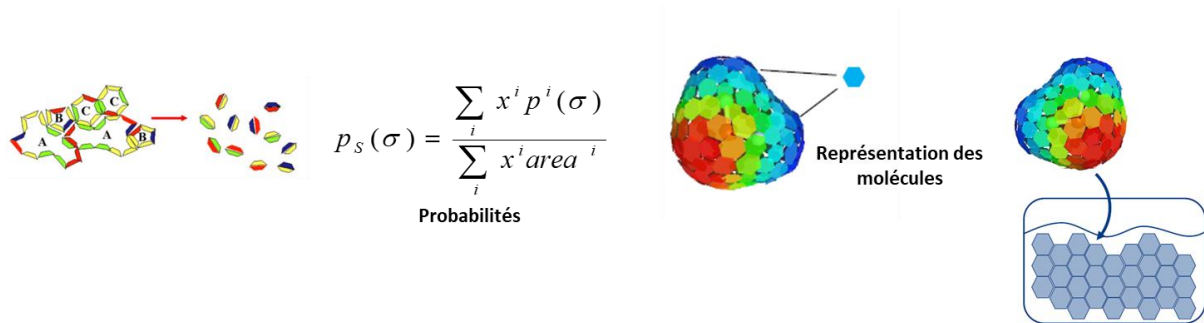
Le potentiel chimique d'une espèce chimique correspond à la variation d'énergie d'un système thermodynamique liée à la variation de quantité (nombre de moles) de i .

- Calcul du potentiel chimique :

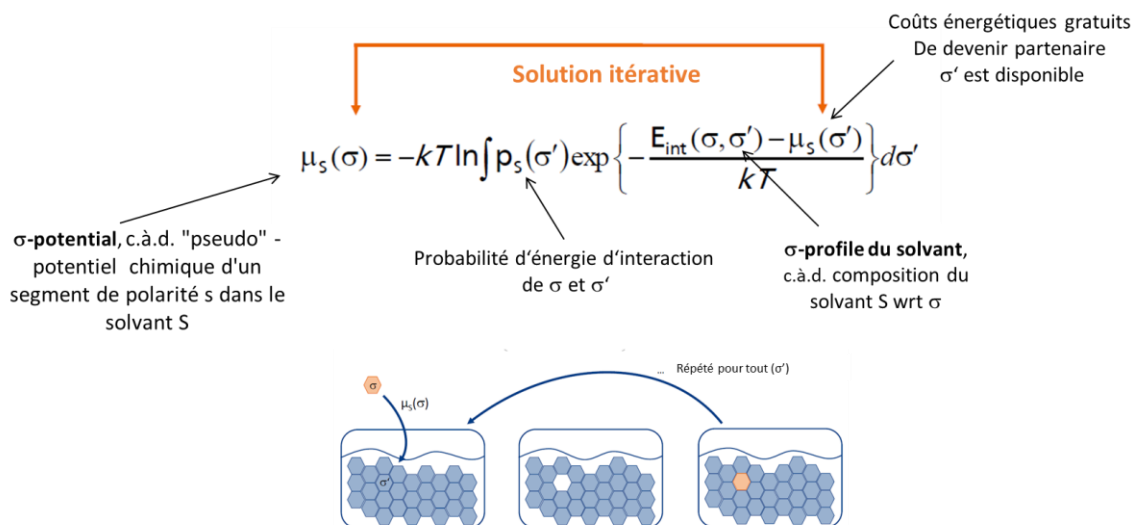
Les molécules sont « découpées » en cavités. COSMO-RS calcule le nombre de solutions possibles (équation ci-dessus) de contact entre chaque « cavité » du soluté et chaque « cavité » du solvant.



Le potentiel chimique d'ajout d'une pièce de surface de polarité σ est calculé à partir de la probabilité $p_S(\sigma')$ pour trouver une certaine polarité à l'intérieur du solvant et des termes d'interaction :



Ainsi chaque segment a son propre potentiel chimique grâce à l'équation mettant en jeu la probabilité de contact « cavité soluté/solvant », le potentiel chimique du solvant, l'énergie interne (Liaisons hydrogène, VDW, misfit). Le potentiel chimique d'un segment de surface de densité de charge σ est décrit exactement par le schéma suivant.



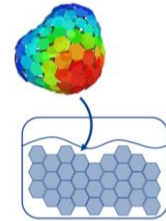
Le potentiel $\mu_S(\sigma)$ est une mesure de l'affinité du système S avec une surface de polarité s .



Le potentiel chimique du composé X dans le système S (le solvant) peut maintenant être calculé par intégration de $\mu_S(\sigma)$ sur la surface totale du composé. Pour tenir compte des différences de taille et de forme des molécules dans le système, une combinaison combinatoire supplémentaire $\mu_{C,S}^X$, qui dépend de la surface et du volume de tous les composés du mélange et de trois paramètres réglables.

Le potentiel chimique de soluté X dans S

$$\mu_S^X = \sum_{\sigma} p^X(\sigma) \mu_S(\sigma) + \mu_{C,S}^X$$



Le potentiel chimique peut être représenté avec un graphique. Il décrit le caractère donneur /accepteur d'électrons et le caractère donneur d'hydrogène de chaque molécule.

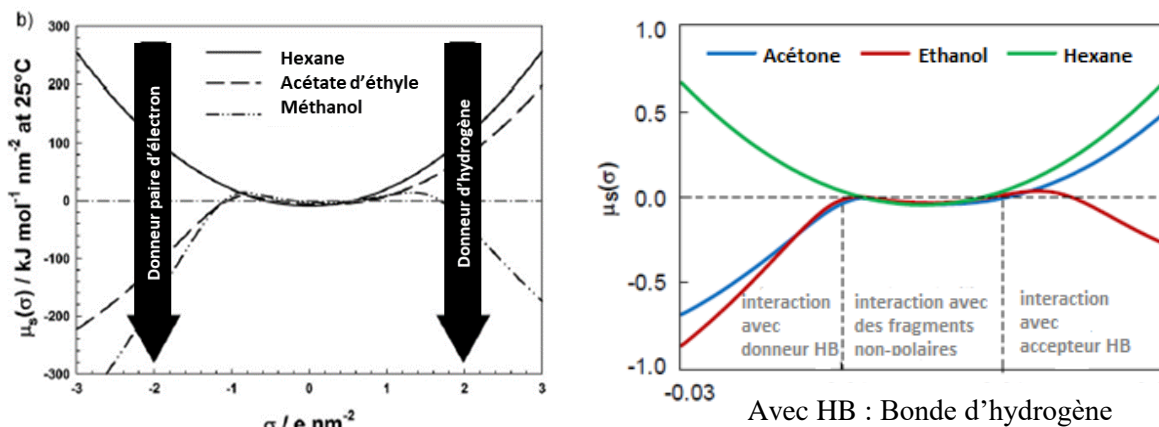


Figure 20 : exemple de graphe explicatif d'un σ -potentiel de trois solvants différents

d. Solubilité :

- Calcul de la solubilité :

La solubilité d'un soluté dans un solvant dépend du potentiel chimique ; cela est exprimé par les formules suivantes [Klamt *et al.* 2002]:

<u>Liquide</u>	<u>Solide</u>
$\Delta_S^X = \mu_S^X - \mu_X^X$	$\Delta_S^X = \mu_S^X - \mu_X^X$
$\log S_S^X = \log\left(\frac{MW^X \rho_S}{MW_S}\right) - \frac{\ln(10)}{kT} \Delta_S^X$	$\log S_S^X = \log\left(\frac{MW^X \rho^S}{MW_S}\right) + \frac{\ln(10)}{kT} [-\Delta_S^X + \min(0, \Delta G_{fus}^X)]$



• Résultats et interprétations :

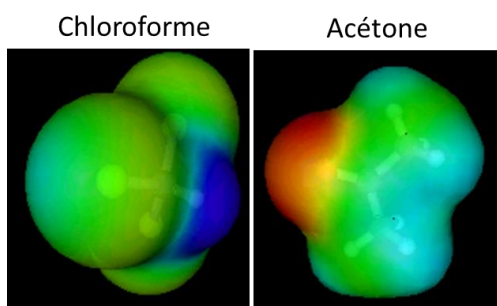
Les résultats de prédiction de la solubilité sont donnés sous forme d'un tableau comme suit :

No.	Solvent	w_RS	log ₁₀ (x_RS)	log ₁₀ (S_RS)
0	oleocanthal OOO c={0 1}	0.15069771	-0.52718437	-0.83444065
1	oleocanthal OOO OGG DAGOGO c={0 0.8 0.1 0.1}	0.26074942	-0.36615212	-0.59214179
2	oleocanthal OOO OGG DAGOGO c={0 0.7 0.2 0.1}	0.3773947	-0.25642913	-0.42901443
3	oleocanthal OOO OGG DAGOGO c={0 0.6 0.2 0.2}	0.39815724	-0.2477637	-0.40532314

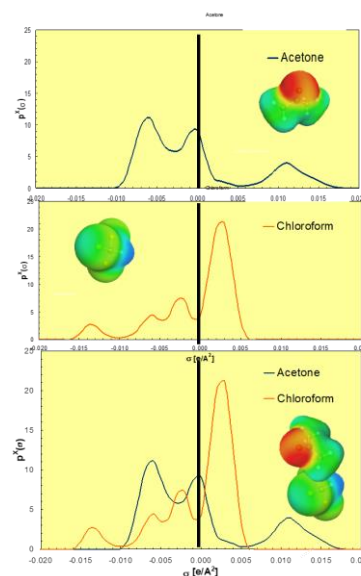
Avec :
$$\log_{10}(x_j) = \log_{10}[\exp((\mu_j^{pure} - \mu_j^{solvent} - \Delta G_{j,fusion}) / RT)]$$

En effet, lorsqu'on effectue « solvent screening » COSMO-RS crée une échelle logarithmique en réajustant les valeurs pour atteindre 0 pour la meilleure solubilité. Les autres valeurs sont données par rapport au(x) meilleur(s) à 0. Les potentiels chimiques sont tous comparés les uns aux autres et ils sont proportionnels à la valeur de solubilité. Il existe une linéarité entre les potentiels chimiques et les valeurs des logarithmes.

Exemple :



Leurs σ -profiles sont presque complémentaires



Quand on regarde l'acétone seul, une grande partie de la molécule est apolaire (-0,01 à 0,05) une autre partie se trouve dans la zone « accepteur de proton » (l'oxygène). Quand on regarde le chloroforme seul, une grande partie de la molécule est apolaire (-0,01 à 0,05), une autre partie se trouve dans la zone « donneur d'hydrogène ». Quand on regarde les deux ensembles, ils sont complémentaires, l'un accepteur, l'autre donneur donc ils sont solubles. Cosmo compare les graphes et estime la solubilité/compatibilité de la molécule dans le solvant.



VIII. Activités biologiques

1. Activité antiradicalaire

Un radical libre possède un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui lui confère une grande réactivité chimique. Les radicaux libres sont comptés dans les espèces réactives de l'oxygène (ERO) [Frankel *et al.*, 2000]. Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome oxygène, le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$), l'anion superoxyde (O_2^-). Ils peuvent participer à la dégradation cellulaire, leurs cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique [Choi *et al.*, 2018].

Les espèces réactives de l'oxygène radicalaires et non radicalaires sont générées par les cellules organisme au cours des réactions métaboliques. L'exposition à des oxydants environnementaux (rayonnement UV, alcool, polluants, tabac, pesticides...) peut contribuer à augmenter leur production (Pincemail *et al.*, 2002 ; Sorg 2004). Cette surproduction au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies, inflammatoires (Ahsan *et al.*, 2003), auto-immunes (Halliwell 1991), neurodégénératives (Sorg, 2004), cardiaques (Harrison *et al.*, 2003), diabète (Pal Yu 1994) ou certains cancers (Valko *et al.*, 2007).

Pour se protéger de ses dommages causés par les espèces réactives oxygénées, l'apport d'antioxydants alimentaires (polyphénols, caroténoïdes...) est appréciable en complément des défenses naturelles de l'organisme.

2. Activité antidiabétique

Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire qu'il est dû à une concentration sanguine élevée en sucre. L'OMS (Organisation mondiale de la santé) le définit par un taux de glycémie supérieur à 1,26 g/L (7 mmol/L) caractéristique à jeun, confirmé par deux prises de sang consécutives.

L'hyperglycémie résulte d'une carence totale ou partielle en insuline ou d'une résistance des tissus périphériques cibles à l'insuline, ayant pour conséquence, une non-absorption du glucose par les cellules et donc une augmentation anormale de la concentration sanguine de sucre.

L'insuline est une hormone sécrétée par le pancréas qui a pour rôle de réguler la concentration de glucose dans le sang, son action est hypoglycémiante.



Le diabète est l'une des principales urgences mondiales en matière de santé. Il figure parmi les 10 premières causes de décès dans le monde et représente, avec les trois autres grandes maladies non transmissibles (MNT) (maladies cardiovasculaires, cancers et maladies respiratoires chroniques), plus de 80% de tous les décès prématurés dus à des MNT. En effet, 30 à 80% des personnes atteintes de diabète ne sont pas diagnostiquées ce qui contribue dans une large mesure à la problématique du diabète. Il provoque plusieurs complications à long termes, particulièrement des lésions, des anomalies et une insuffisance de divers organes, surtout les reins, les yeux, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins [Saha *et al.*, 2012].

Il existe deux formes cliniques principales de diabète correspondant à deux mécanismes pathogéniques différents :

- le diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1
- le diabète non insulino-dépendant ou diabète de type 2.

a. Le diabète insulino-dépendant « diabète de type 1 »

Le diabète de type 1, précédemment connu sous le nom de diabète insulino-dépendant ou juvénile, représente environ 10% des cas de diabète mondiaux [Peter-Riesch *et al.*, 2002]. Il apparaît le plus souvent chez les enfants et les jeunes adultes, c'est pourquoi il est aussi appelé « diabète juvéniles ». C'est une maladie auto-immune conduisant à une destruction sélective et progressive des cellules β pancréatique, productrice de l'insuline [Boitard, 2002]. Le processus auto-immun des cellules β débute plusieurs années (5 à 10 ans voire plus) avant le début du diabète. L'évaluation de la glycémie suppose une destruction de 80 à 90 des cellules β [Grimaldi *et al.*, 2001]. Cette destruction résulte de la production d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes des cellules β . Elle semble apparaître chez des sujets génétiquement prédisposés, c'est-à-dire possédant des gènes de susceptibilité liées au système HLA, mais le processus auto-immun serait déclenché par un facteur environnemental encore mal connu [Boitard 2002]. Il pourrait correspondre à une infection virale [Horwitz 2002]. Ce processus de destruction entraîne une carence en insuline absolue et définitive responsable de l'apparition d'une hyperglycémie chronique permanente. Le pancréas étant incapable de produire l'insuline, la survie de ces malades dépend entièrement d'injection quotidienne de cette hormone, d'où son nom de diabète insulino-dépendant. Les symptômes classiques les plus connus pour ce type de diabète sont : excrétion excessive d'urine (polyurie), sensation de soif (polydipsie), faim constante, perte de poids et même altération de la vision et fatigue [Grimaldi *et al.*, 2001]. Ces symptômes peuvent apparaître brutalement.



b. Le diabète non insulino-dépendant « diabète de type 2 »

L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit le diabète de Type 2, précédemment appelé diabète non insulino-dépendant, diabète de la maturité, ou encore diabète « gras », comme une affection métabolique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise plus correctement celle qu'il produit : la déficience sécrétoire et les anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles (muscles et tissu adipeux) peuvent être associées. Le diabète est associé à des complications micro-angiopathiques et macro-angiopathiques.

Ces symptômes peuvent être les mêmes que ceux du diabète de type 1 mais sont souvent moins marqués. De ce fait, la maladie peut être diagnostiquée plusieurs années après son apparition, une fois les complications déjà présentes.

c. Physiopathologie du diabète de type 2

Le diabète de Type 2 comprend les 90-95% des patients souffrant d'un diabète et est fréquemment associé à l'obésité, la surcharge pondérale, l'hypertension artérielle ainsi qu'aux dyslipidémies. Cette pathologie comporte une importante prédisposition génétique. Le diabète de type 2 est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique dont les éléments physiopathologiques comprennent une résistance accrue des tissus périphériques (muscles, foie) à l'action de l'insuline, une sécrétion de glucagon inappropriée, une insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques, ainsi qu'une diminution de l'effet des incrétines, hormones intestinales stimulant la sécrétion postprandiale de l'insuline [American association 2007].

Les deux mécanismes principaux associés à ce type de diabète sont : des anomalies de la sécrétion de l'insuline et/ou l'insulino-résistance (figure 21). Les anomalies de l'insulino-sécrétion sont à la fois qualitatives et quantitatives. Les premières anomalies de la sécrétion de l'insuline, pouvant apparaître à un stade précoce de la maladie, se manifestent généralement par la baisse de la réaction sécrétoire rapide après stimulation par le glucose apporté par un repas, appelé pic précoce de sécrétion. À un stade plus avancé, la sécrétion de l'insuline est altérée quantitativement suite à l'accentuation des atteintes des cellules pancréatiques pouvant aller jusqu'à l'insulinopénie profonde.

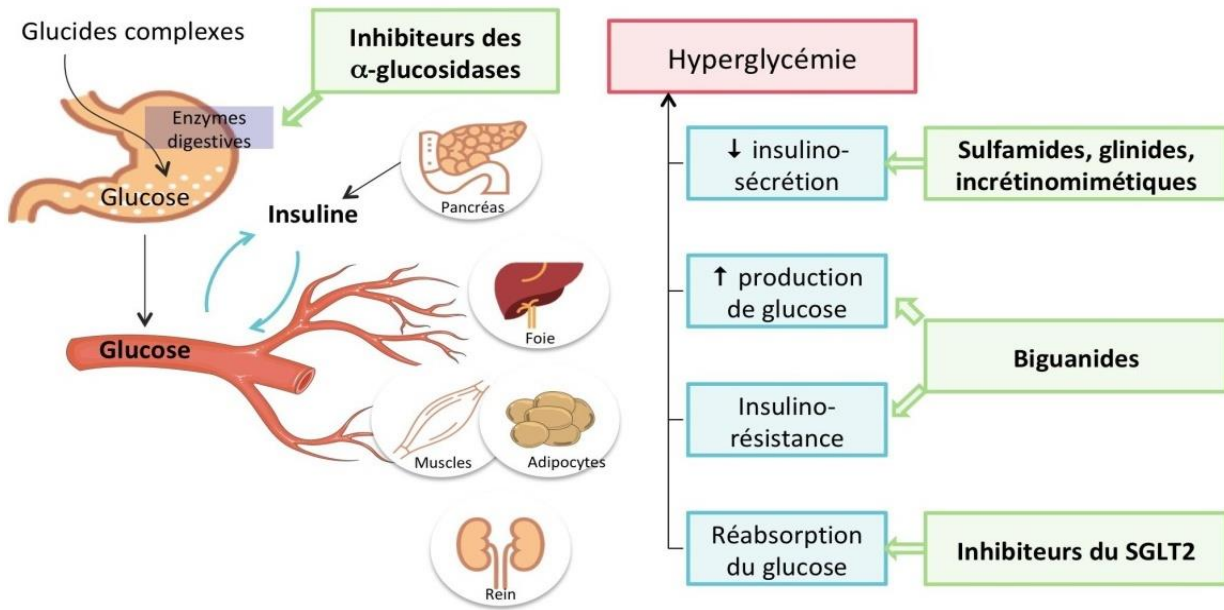


Figure 21 : insulino-résistance et hyperglycémie. (pharmacomedicale.org)

L'insulino-résistance, est la réduction de l'effet hypoglycémiant produit par une sécrétion d'insuline. Le plus souvent liée à l'obésité, l'hypertrophie du tissu adipeux viscéral induit notamment des taux importants d'acides gras libres (AGL) et de cytokines impliquées dans l'insulino-résistance. Ils en résultent une tendance à l'augmentation de la glycémie, et une capacité réduite de l'organisme de réguler rapidement sa glycémie, ce que l'on appelle l'intolérance au glucose [Calanna *et al.*, 2013].

L'intolérance au glucose est généralement considérée comme un état pré-diabétique. De plus au niveau périphérique (muscles squelettiques et tissus adipeux), la réponse à l'insuline est altérée. Des anomalies de la translocation des transporteurs de glucose et de la phosphorylation du glucose stimulés par l'insuline sont notamment impliquées. À cela s'ajoute un mécanisme décrit comme un cycle de Randle [Goldstein *et al.*, 2002 ; Capeau *et al.*, 2006] qui propose une utilisation préférentielle des acides gras plutôt que du glucose au niveau musculaire, inhibant encore la glycogénèse [Dombia *et al.*, 2019 ; Benbernou *et al.*, 2019].

Cependant, afin de pallier cette baisse de sensibilité vis-à-vis de l'insuline, on observe une période d'hyperinsulinisme, qui permet à l'organisme d'assurer en grande partie la régulation glycémique. Toute cette phase est souvent asymptomatique et peut durer de 10 à 20 ans.



Enfin, le pancréas ne pouvant plus assurer les besoins toujours croissants en insuline, l'insulino-déficience marque généralement le début des symptômes de cette pathologie, notamment les hyperglycémies chroniques.

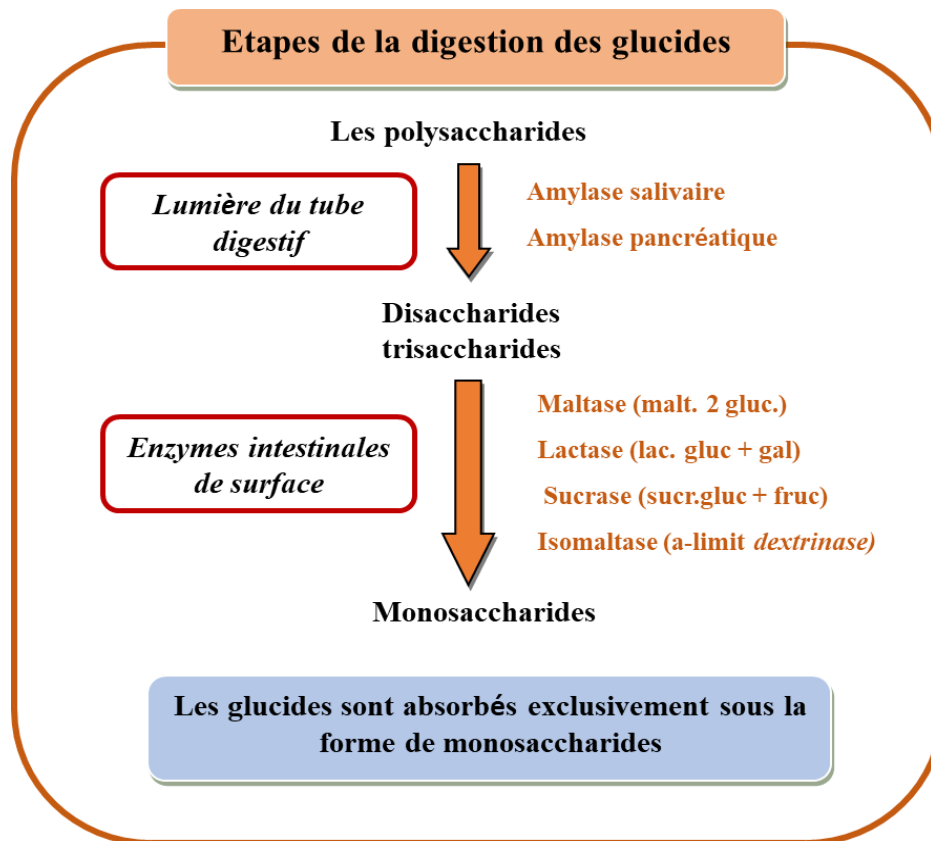
d. La phytothérapie du diabète

Depuis longtemps, la phytothérapie du diabète a pris sa part que ce soit dans la médecine traditionnelle (médecine traditionnelle chinoise, par la médecine ayurvédique, par la médecine populaire) ou la recherche scientifique (nombreuses études expérimentales, menées in vitro et in vivo, ont clairement montré que les plantes contenaient des principes actifs hypoglycémisants). Actuellement, avec l'émergence de la notion du stress oxydant qui semble jouer un rôle primordial dans les complications et les lésions des organes associées au diabète, les plantes antidiabétiques ont pris un grand intérêt comme source énorme d'antioxydant [Sahin et Candan, 2010]. Des études faites sur des plantes médicinales ont révélé leur effet antidiabétique accompagné de leur effet antioxydant élevé, ce qui donne plus d'espoir pour prévenir et/ou guérir le diabète et ses complications.

e. Action de l'inhibition de l'alpha-amylase au cours du diabète

L'alpha amylase est une enzyme endo-hydrolase qui joue le rôle d'un catalyseur de l'hydrolyse de la liaison α -1,4-glycosidique de l'amidon, de l'amylose, de l'amylopectine, de glycogène et les différentes maltodextrines. C'est une enzyme produite par les plantes, les animaux, les bactéries et les champignons.

Deux types d'enzymes d' α -amylase sont produites chez les mammifères ; l'enzyme sécrétée par les glandes parotides appelée **α -amylase salivaire** et l'enzyme sécrétée par le pancréas appelée **α -amylase pancréatique**. La digestion d'un polysaccharide (l'amidon par exemple) commence dans la bouche par l'action de l' α -amylase salivaire en oligomères. Cette digestion est arrêtée par le pH faible de l'estomac. Lorsque les aliments passent de l'estomac vers l'intestin où il y a une neutralisation, la digestion de l'amidon est complétée par l' α -amylase pancréatique en maltose, maltriose et petite malto-oligosaccharides [DeFronzo *et al.*, 1992].



Plusieurs études ont montré que l'inhibition de l'alpha-amylase pancréatique contribue à la diminution de la glycémie postprandiale ce qui conduit à la prévention des complications associées au diabète. La plupart de ces agents inhibiteurs sont synthétiques et ont des effets secondaires tels que les vomissements et la diarrhée.

3. Activité analgésique

Les analgésiques sont des médicaments du système nerveux, qui agissent comme des modificateurs de la perception douloureuse. Ils ont le rôle d'atténuer ou de supprimer la douleur par une action périphérique ou centrale, sans provoquer la perte de conscience.

La douleur est définie comme une sensation émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle. C'est un phénomène neurophysiologique complexe contenant plusieurs composantes : sensorielle, affective et comportementale. Il est connu que la douleur est subjective, c.à.d. qu'elle est perçue d'une façon différente d'un individu à un autre. La réaction à la douleur s'effectue en plusieurs étapes mais dans une période très restreinte. En effet, la douleur est due à la stimulation de récepteurs spécialisés appelés « les nocicepteurs » ou « nocicepteurs ». Ils sont constitués par des terminaisons libres de fibres nerveuses. La stimulation directe de ces nocicepteurs par un stimulus physique, chimique ou thermique, engendre une sensation de douleur immédiate et fugace : c'est la première douleur. Par la suite, des médiateurs chimiques libérés par les tissus lésés comme la sérotonine et l'histamine, sensibilisent de nouveau les nocicepteurs, provoquant une autre douleur diffuse et



tardive : c'est la deuxième douleur. Finalement, les fibres afférentes provenant des nocicepteurs excitent les neurones spinaux, engendrant la transmission de l'information douloureuse par les voies ascendantes vers plusieurs régions cérébrales qui constituent les zones de la perception de la douleur et de la réponse : c'est la réaction à la douleur. Toutes ces étapes se produisent en un temps relatif à une vitesse variable entre 30 et 120 m/sec. La douleur est un phénomène physiologique protecteur, il a le rôle d'un signal d'alarme qui informe le sujet qu'un stimulus nocif menace son intégrité. Par ailleurs, le sujet peut adopter une attitude qui évite des lésions supplémentaires.

Une douleur aiguë ou prolongée sera insupportable par le sujet, ce qui nécessite l'action d'un calmant soit l'analgésique pour atténuer ou même supprimer ce malaise. Selon l'intensité et la localisation de la douleur, le type du calmant doit être choisi. Les deux principales classes d'analgésique existantes sont les analgésiques centraux et les analgésiques périphériques.

Les analgésiques centraux les plus connus et les plus utilisés sont les analgésiques morphiniques appelés aussi opioïdes. Leur rôle principal est d'atténuer la propagation des influx ioniques et donc de diminuer la libération de neurotransmetteurs excitateurs et par la suite inhiber la perception à la douleur. Ils ont donc un effet analgésique puissant et direct au niveau médullaire. Cette classe d'analgésiques est utilisée uniquement dans le traitement des cas extrêmes des douleurs aiguës et n'est délivrée que sur ordonnance médicale à cause de ses effets secondaires. Parmi ces effets latéraux gênants on peut citer : l'euphorie, la dépression respiratoire et la dépendance physique.

Les analgésiques périphériques sont des produits de structures chimiques très diverses qui sont utilisés dans le traitement des douleurs modérées. Leur action se déroule au niveau sensitif de la douleur ; Ils agissent principalement par inhibition de l'activité de la prostaglandine synthétase. Ils ont la particularité d'être dénués de toute action toxicomanogène. Cette classe d'analgésiques est divisée en trois sous-classes qui sont : les antipyrétiques, les antipyrétiques et anti-inflammatoires, et les analgésiques purs.

IX. Identification et quantification des composés chimiques

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS) est une technique séparative basée sur l'association de la capacité de séparation de la chromatographie en phase liquide et de la détection en spectrométrie de masse hautement sensible et sélective.



La spectrométrie de masse est une technique de caractérisation chimique qui permet l'identification des composés chimiques présents dans un échantillon. Son mode de fonctionnement consiste à produire des ions ($m^{\pm ze}$) à partir des atomes ou des molécules présents dans un échantillon et de le séparer en fonction de leur rapports masse/charge (m/z) et de leur abondance dans le but de les identifier de déterminer leur structure chimique ainsi que de les quantifier. Elle est peut être définie comme suit :

- une source d'ionisation dans laquelle les molécules sont ionisées à partir d'un échantillon vaporisé.
- un ou plusieurs analyseurs qui consistent à séparer les ions formés en fonction de leur rapport m/z .
- un détecteur qui mesure un courant électrique proportionnel à la quantité d'ions reçus aux différentes valeurs de m/z .
- un système de traitement de données qui transforme le courant électrique en un signal chromatographique.

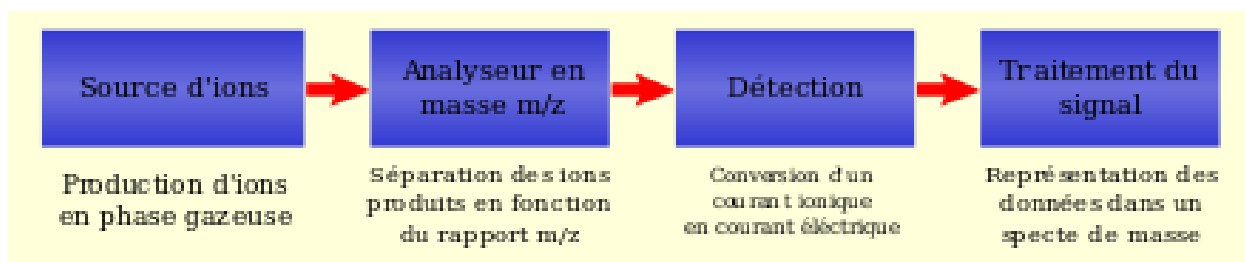


Figure 22 : structure d'un spectromètre de masse

Depuis l'essor des procédés d'ionisation à pression atmosphérique, il existe deux types de sources d'ionisation qui sont majoritairement utilisées pour l'analyse des composés phénoliques par HPLC/MS : l'ionisation par electrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). L'ESI repose sur l'introduction d'une solution de l'échantillon à analyser dans un capillaire porté à un potentiel élevé (positif ou négatif).

X. Plan d'expériences

Les grandes industries européennes ont commencé à utiliser les plans expérimentaux vers les années 1980. Actuellement, la majorité des industries utilise cette méthode expérimentale au stade de la conception aussi bien qu'au cours de la production. C'est un outil de qualité qui assure la reproductibilité et la maintenance de la qualité du produit à commercialiser. Il existe plusieurs types de plans d'expériences tels que le plan factoriel complet ou fractionnaire, le plan Box-Behnken, la méthode Taguchi, la méthodologie des



surfaces de réponse etc. Le type du plan d'expérience doit être choisi selon le nombre, le type des paramètres et des expériences à mise-en œuvre au cours de l'expérimentation.

❖ **Le plan factoriel complet :**

Les plans factoriels complets et fractionnaires à 2 et à 3 niveaux sont les plans les plus utilisés dans les entreprises. En effet, la conception factorielle permet à l'expérimentateur d'étudier l'effet combinatoire des facteurs sur une réponse envisagée. Dans notre investigation, nous avons utilisé le plan factoriel complet à deux niveaux pour chaque facteur. Dans ce plan, les unités expérimentales prennent toutes les combinaisons possibles de ces niveaux à travers les facteurs étudiés. Le nombre total d'expériences pour étudier K facteurs à deux niveaux est de 2^K [Antony 2014]. Ce plan est particulièrement utile dans les étapes préliminaires d'un travail expérimental, en particulier lorsque le nombre de paramètres à envisager ou le nombre de facteurs ne dépasse pas 4.



Références Bibliographiques

A

- Ahsan H., Ali H., Ali R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity, *Clinical and experimental immunology*, Volume 131, 398 – 404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02104.x>
- Alibes X., Berge Ph., Martilotti F., Nefzaoui A., Zoiopoulos P. (2011). Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen. ISBN 92-5-201488-8.
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alli, I. (2014). Effect of phenolic compound removal on rheological, thermal and physico-chemical properties of soybean and flaxseed proteins. *Food Chemistry*, 146, 608–613.
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Ereifej, K., Alli, I. (2013). Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. *Food Chemistry*, 139, 93–99.
- American Association of Clinical Endocrinologists Diabetes Mellitus Clinical Practice Guidelines Task Force. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the management of diabetes mellitus. *Endocr Pract.* (2007) 13 (suppl 1), 1-68
- Antony, J. (2014) Full factorial designs. Design of experiments for engineers and scientists (second edition). 63-85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099417-8.00006-7>
- Argenson C., Regis S., Jourdain J-M. et Vaysse P. (1999). L'Olivier. Ed. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. Paris, 8-183.
- Atrahimovich D., Avni D., & Khatib S. (2021) Flavonoids-Macromolecules interactions in human diseases with focus on Alzheimer, atherosclerosis and cancer. *Antioxidants (Basel)* 10(3), 423. DOI: [10.3390/antiox10030423](https://doi.org/10.3390/antiox10030423)

B

- Benbernou H.Y., (2019). Contribution à l'étude comparative du bilan biologique chez la femme diabétique de type 2 avant et après la ménopause.
- Ben Saad A.; et al. (2021). Antihyperlipidemic, antihyperglycemic, and liver function protection of *olea europaea* var. meski stone and seed extracts: LC-ESI-HRMS-based composition analysis. *J. Diabetes Res.* <https://doi.org/10.1155/2021/6659415>.
- Bianco A.D et Uccella N. (2000). Biophenolic components of olives. *Food Research International* . 33, 475 – 485.
- Boitard, E., Chahinian, H., Nini, L., et al. (2002). Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* 37, 653–662. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0946-7>



- Bracci T., Busconi M., Fogher C., Sebastiani L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports*. 30(4), 449–462.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.
- Brenes M., Garcia A., Rios J. J., Garcia P. & Garrido A. (2002) Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *The International Journal of Food Science and Technology*. 37(6), 615-625.
- Brenes M., Hidalgo F. J., Garcia A., Rios J. J., Garcia P., Zamora R. & Garrido A. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of American oil Chemist's Society*. 77(7), 715-720.
- Bruns R.E., Scarminio I.S., Neto B.B. (2006). Statistical Design–Chemometrics, *Elsevier*, Amsterdam.
- Burmeister, C.F.; Kwade, A. (2013). Process Engineering with Planetary Ball Millss. *Chem. Soc. Rev.* 42, 7660–7667. [CrossRef]

C

- Calanna S., Christensen M., Holst J.J., Laferrère B., Gluud L.L., Vilsbøll T., Knop F.K. (2013). Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies. *Diabetologia*. 56, 965-972.
- Capeau J., Bastard J.P., Vigouroux C. (2006). Syndrome métabolique et insulino-résistance : physiopathologie. *MT Cardio*. 2, 155-164.
- Catherine Zimmermann ; André Deom, Dagmar Kessler, CSCQ, (2009).
- Chemat, F. (2011). Éco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs. Paris: Dunod.)
- Chemat F, Rombaut N., Meullemiestre A., Turk M., Perino S., Fabiano-Tixier A.S., Abert-Vian M. (2017). Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *J. Innovative food science and emerging technologies*. 41, 357-377.
- Chemat, F., Tomao, V., & Viot, M. (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Handb. food anal. instrum.* CRC Press
- Choi Y.H. (2018). Schisandrin A prevents oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis by attenuating ROS generation in C2C12 cells. *Biomed. Pharmacother.* 106, 902-909.
- Conseil Oleicole international. (2022) La consommation mondiale d'huile d'olive a augmenté au cours des trois dernières années.
- Cossi M, Rega N, Scalmani G, Barone V. (2003). Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J Comput Chem*. 24(8), 669– 681.



D

- David H., Kohn S. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*. 54(1), 101-111.
- De Fronzo, R.A. (1992). Pathogenesis of Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus : a balanced overview. *Diabetologia* 35, 389–397 <https://doi.org/10.1007/BF00401208>
- De Hoffmann E., Stroobant V. (2005). Spectrométrie de masse. *Troisième édition*, Paris. 425.
- Dombia A.K. (2019). Evaluation des risques cardiovasculaires chez les patients diabétiques type 2 au CSRef de la commune II.

F

- Fedeli E., (1977). Lipids of olives. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. 15, 57-74.
- Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Moraco P., Nardelli A. and Temussi F., (2003). Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity comparison of low molecular-weight phenol compents. *Journal of agricultural food chemistry*. 51, 1005-1009.
- Frankel E.N. et Meyer A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(13), 1925-1941.

G

- Ganzler, K. Szinai, I. (1990) *Journal of Chromatography*. 520 257.
- Garcia A., Brenes M., Garcia P., Romero C. & Garrido A. (2003). Phenolic content of commercial olive oils. *European Food Research and Technology*. 216(6), 520-525.
- Georges J.Aillaud, (1985). L'olivier et l'huile d'olive, le point de vue des botanistes, l'huile d'olive en méditerranée, 13-24.
- Ghorbel A.; et al. (2021). Extraction yield optimization of oleaster (*Olea europaea* var. *sylvestris*) fruits using response surface methodology, LC/MS profiling and evaluation of its effects on antioxidant activity and autophagy in HFF cells. *J. Food Meas. Charact.* 15, 4946–4959. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01058-7>.
- Gilmour S.T. (2006). Response surface designs for experiments in bioprocessing. *Biometrics* 62, 323-331. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2005.00444.x>
- Goldstein B.J. (2002). Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Cardiology*. 90, 3-10.
- Gong, M.; Bassi, A. (2016). Carotenoids from Microalgae: A Review of Recent Developments. *Biotechnol. Adv.* 34, 1396–1412. [CrossRef]
- Grimaldi MD, et al. (2001). Maternally inherited diabetes and deafness : a multicenter study, *Annals of internal medicine*.



- Gryniewicz-Bylina B., Rakwic B., Slomka-Slupik B (2022). Tests of rubber granules used as artificial turf for football fields in terms of toxicity to human health and the environment. *Sci Rep.* 12(1): 6683. [Doi: 10.1038/s41598-022-10691-1](https://doi.org/10.1038/s41598-022-10691-1).

H

- Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal Medicine.* 91(3C), 14S.
- Harwood J. L. & Aparicio R. (Eds.) (2000). Handbook of olive oil: analysis and properties. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publications, Inc. 620 pages.
- Hynes M.J., O’Coinceanainn M. (2001). The kinetics and mechanisms of the reactions of aluminium (III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and adrenaline. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 84, 1-12.
- <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antidiabetiques-les-points-essentiels>.

J

- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering,* 86, 281–287.
- Jerman T., Trebše P., Vodopivec B. M. (2010). Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry.* 123(1), 175–182.

K

- Kakhlon O., Cabantchik Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes1. *Free Radical Biology & Medicine.* 33(8), 1037–1046.
- Khurana S., Venkataraman K., Hollingsworth A., Piche M. and Tai T.C. (2013). Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients.* 5(10), 3779-3827. [doi: 10.3390/nu5103779](https://doi.org/10.3390/nu5103779)
- Kiokas S., Proestos C., & Oreopoulou V. (2018) Effect of natural food antioxidants against LDL and DNA oxidative changes. *Antioxidants (basel),* 3; 7 (10), 133. [DOI: 10.3390/antiox7100133](https://doi.org/10.3390/antiox7100133)
- Klamt A. (1995). Conductor-like screening model for real solvents: a new approach to the quantitative calculation of solvation phenomena. *J Phys Chem* 99, 2224– 2235.
- Klamt, A., Eckert, F., Hornig, M., Beck, M. E., & Bürger, T. (2002). Prediction of aqueous solubility of drugs and pesticides with COSMO-RS. *Journal of computational chemistry,* 23(2), 275-281.
- Klamt A., Jonas V., Burger T., Lohrenz J.C., (1998). Refinement and parametrization of COSMO-RS, *J. Phys. Chem. A.* 102, 5074-5085.



L

- Lacomelli A., (2000). Olive mill waste water and SAP adopted by BACRON contracting parties. Work shop and agro-industry development in the coastal areas, with special focus on the olive oil industry. Beirut-Lebanon.
- Lea A.G.H. (1992). Flavor, color and stability in fruit products: The effect of polyphenols. In : Hemingway, R.W, Laks, P.E. (eds) Plant polyphenols. *Basic life sciences* book series. 59. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3476-1_49
- Lv GP, Huang WH, Yang FQ, Li J, Li SP. (2010) Pressurized liquid extraction and GC–MS analysis for simultaneous determination of seven components in *Cinnamomum cassia* and the effect of sample preparation. *J Sep Sci.* 33(15), 2341–8.

M

- Maachou F. & Zerrouki A. W. (2020). Mémoire de fin d'étude de master (filière génie civil) : Formulation et caractérisation d'un éco matériaux à base de déchet végétaux. Université Yahia Fares de Medea. Faculté de Technologie. Dspace.univ-medea.dz
- Macheix J. J., Fleuriet A. & Billot J. (1990). Fruit phenolics. CRC press. Boca Raton. USA. 1-126.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux (Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique). Edition technique et documentation, Lavoisier.
- Madsen H.L., Bertelsen G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Sci. Technol.* 6, 271-277.
- Marché de l'huile d'olive, Monde, Europe, France– Compagne 2019-2020 ; édition juillet (2021) ; FranceAgriMer
- Martin S., Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie.* 51, 304-315.
- Mazza G. & Miniati E. (1993) Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRC press. Boca Raton, USA. 64-67.
- Médail F., Quézel P., Besnard G., Khadari B. (2001). Systematics, ecology and phylogeographic significance of *Olea europaea* L. ssp. *maroccana* (Greuter & Burdet) P. Vargas et al., a relictual olive tree in South-west Morocco. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 137(3), 249–266.
- Mekki H., Anderson M., Ben Zina M., Ammar E., (2008). Valorization of olive mill wastewater by its incorporation in building bricks. *Journal of Hazardous Materials.* 158, 308–315.
- M.H. Alu'datt, T. Rababah, M.N. Alhamad, M.A. Al-Mahasneh, A. Almajwal, S. Gammoh, K. Ereifej, A. Johargy, I. Alli, (2017). *Food Chem.* 218, 99–106.
- Mnafgui K.; et al. (2015). Preventive effects of oleuropein against cardiac remodeling after myocardial infarction in Wistar rat through inhibiting angiotensin-converting enzyme



activity. *Toxicol. Mech. Methods* 25, 538–546. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1053648>.

- Mnafgui K.; et al. (2016). Protective effect of hydroxytyrosol against cardiac remodeling after isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. *Cardiovasc. Toxicol.* 16, 147–155. <https://doi.org/10.1007/s12012-015-9323-1>.
- Mnafgui K.; et al. (2021). Oleuropein protects against cerebral ischemia injury in rats: molecular docking, biochemical and histological findings. *Neurochem. Res.* 46, 2131–2142. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03351-9>.
- Mochizuki M., Yamazaki S.I., Kano K., Ikeda T. (2001). Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim. Biophys. Acta -General Subjects.* 1569, 35–44.
- Montalescot, V.; Rinaldi, T.; Touchard, R.; Jubeau, S.; Frappart, M.; Jaouen, P.; Bourseau, P.; Marchal, L. (2015). Optimization of Bead Milling Parameters for the Cell Disruption of Microalgae: Process Modeling and Application to *Porphyridium Cruentum* and *Nannochloropsis Oculata*. *Bioresour. Technol.* 196, 339–346. [CrossRef]
- Moutier N, Pinatel C, Martre A, Roger Jp, Khadari B, Burgevin Jf, Ollivier D, Artaud J. (2004). Identification et caractérisation des variétés d'oliviers cultivées en France (Tome 1). *Naturalia Publications*, Turriers, France
- Murkovic M., Lechner S., Pietzka A., Bratacos M. & Katzogiannos E. (2004). Analysis of minor components in olive oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 61(1-2), 155-160.
- M. Vinatoru, T.J. Mason, I. Calinescu, (2017). Ultrasonically Assisted Extraction (UAE) and Microwave Assisted Extraction (MAE) of Functional Compounds from Plant Materials, *Trends in Analytical Chemistry*.

N

- Nefzaoui A. et BenDhia B., (1978). Mise au point sur les expériences réalisées sur l'utilisation des grignons d'olive en alimentation animale. In. Séminaire sur l'olivier, Mahdia, Tunisie, 116 pages.
- Noble G. (2013). Un mortier léger à base de noyaux d'olives. *Batiactu*. www.batiactu.com
- Nooralabettu, K.P. (2010). Cell Disruption Techniques. In *Downstream Process Technology: A New Horizon In Biotechnology*; PHI Learning Private Limited: *New Delhi, India*, 101–126

O

- Obied H. K. (2013). Biography of biophenols: past, present and future. *Functional Foods in Health and Disease.* 3(6), 230–241.
- Ocakoglu D., Tokatli F., Ozen B. & Korel F. (2009). Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry.* 15(2), 401-410.



P

- Paraskeva P., Diamadopoulos E., (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81, 1475–1485.
- Peter-Riesch B, Golay A, Faravel L, Da Silva J, Makoundou V, Assal JP, (2002). The impact of callosities on the magnitude and duration of plantar pressure in patients with diabetes mellitus. A callus may cause 18,600 kilograms of excess plantar pressure per day. 28(5), 356-361.
- Pérez J.A., Hernández J. M., Trujillo J. M., López H. (2005). Iridoids and secoiridoids from Oleaceae. *Studies in Natural Products Chemistry*. 32, 303–363.
- Pierre M., Lys M. (2007). *Secrets des plantes*. Editions Artémis.
- Pinatel C., (2002). Les variétés d'oliviers. *Le nouvel Olivier* 30, 3-14.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutr. Clin. Métabol.* 16, 233-239.
- Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N., Vincieri F. F., Cimato A. & Romani A. (2003). Minor polar compounds and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oils from Tuscany. *Food Chemistry*. 80(3), 331-336.

R

- Ranalli G., Alfano G., Bahammi M., Belli G. et Lustrato, (2003). Gestion des sous-produits de la filière oléicole au Maroc ; Identification des solutions éco- compatibles et économiquement soutenables pour la valorisation des résidus de l'huile d'olive et la réduction de l'impact environnemental dans les régions de Fès, Meknès et Merrakesh. *Organisation des Nations Unies pour le Développement Industriel*, 8(3), 5-59.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. 20, 933.
- Romero C., Brenes M, Garcia P. & Garrido A (2002). Hydroxytyrosol 4-β-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruit and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(13), 3835-3839.
- Ross R. (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*. 340, 115-126.
- Ryan D et Robards K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*. 123, 31-44.
- Ryan D., Prenzler P. D., Lavee S., Antolovich M. & Robards K. (2003). Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(9), 2532-2538.



S

- Sabiha Achat. (2013). Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Autre. Université d'Avignon ; Université Abderrahmane Mira - Bejaïa (Bejaïa, Algérie), Français. ffNNT : 2013AVIG0248ff. fftel-00978529
- Saha S.K., Haque E., Islam D., Matiar Rahman., Islam R., Parvin A., Rahman S. (2012). Comparative study between momorcida charantia (wild and hybrid variety) on hypoglycemic and hpolipidemic activity of alloxan induced type 2 diabetic long evant rats. *Journal of Diabetes Mellitus*. 2, 131-137.
- Sahin S.B., Candan F. (2010). Chemical Composition and In vitro Antioxidant and Antidiabetic Activities of Eucalyptus Camaldulensis Dehnh. Essential oil. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 7, 216.
- Shabou R., Zairi M. and BenDhia H., (2005). Characterization and environmental impacts of olive oil waste water. *Disposal Environmental Technology*. 26, 35-45.
- Shoji T. (2007) Polyphenols as natural food pigments: changes during food processing. *American journal of food technology*. 2(7), 570-581.
- Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *C. R. Biol.* 327, 649-662.

T

- Teofilo R.F. Ferreira M. (2006). Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quimica Nova* 29, 338-350
- Teuscher E, Anton R et Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiment et huiles essentielles. 521, 355 – 359.
- Tuck L. K. & Hayball P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of nutritional biochemistry*. 13(11), 636-644

V

- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telsar J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of Biochemistry & Cell biology*. 39, 44- 84.
- Veillet S., Tomao V., Bornard I., Ruiz K., Chemat F. (2009). Chemical changes in virgin olive oils as function of crushing systems: Stone mill and hammer crusher. *Comptes Rendus. Chimie*, Tome 12. 8, 895-904. [10.1016/j.crci.2009.01.003](https://doi.org/10.1016/j.crci.2009.01.003)
- Visioli F. & Galli C. (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition Reviews*. 56(5), 142-147.



W

- Welch K.D., Davis T. Z., Aust S.D. (2002). Iron Autoxidation and Free Radical Generation: Effects of Buffers, Ligands, and Chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysique*. 397(02), 360–369.

X

- X. Cong-Cong, W. Bing, P. Yi-Qiong, T. Jian-Sheng, Z. Tong, Chin. (2017). advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials, *J. Nat. Med.* 15, 0721–0731.
- Xu J, Zhao WM, Qian ZM, Guan J, Li SP. (2010). Fast determination of five components of coumarin, alkaloids and bibenzyls in *Dendrobium* spp. using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography. *J Sep Sci.* 33(11), 1580–6.
- Xu FX, Yuan C, Wan JB, Yan R, Hu H, Li SP, Zhang QW. (2015). A novel strategy for rapid quantification of 20(S)-protopanaxatriol and 20(S)-protopanaxadiol saponins in *Panax notoginseng*, *P. ginseng* and *P. quinquefolium*. *Nat Prod Res.* 29(1), 46–52

Y

- Yang D. P., Kong D. X. & Zhang H. Y. (2007) Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry*. 104(3), 1269-1271.
- Yang D. P., Kong D. X. & Zhang H. Y. (2007). Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry*. 104(3), 1269-1271.
- Yi Y, Zhang QW, Li SL, Wang Y, Ye WC, Zhao J, Wang YT. (2012). Simultaneous quantification of major flavonoids in “Bawanghua”, the edible flower of *Hylocereus undatus* using pressurised liquid extraction and high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 135(2), 528–33.
- Yuting C., Rongliang Z., Zhongjian J., Yong J. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *FRBM*. 9, 19-21.

Z

- Zhang, QW., Lin, LG. & Ye, WC. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med* 13, 20 <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>



CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES

A. ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE GRIGNONS D'OLIVE

I. Récolte et identification

Les grignons d'olive sont issus de la trituration de la variété « *Aglandau* » récoltée en octobre 2019 et cultivée selon les règles de l'agriculture biologique (Moulin Castelas, aux Baux-de-Provence, France). Ce moulin est équipé d'un système de centrifugation à deux phases qui permet la production d'un seul sous-produit « la pâte de grignons d'olive humide » qui contient environ 70% de phase liquide. Les grignons frais ont été mis dans des sachets hermétiques et immédiatement congelé et conservé à l'obscurité à -20 °C jusqu'à utilisation.

Après pressage, la phase liquide obtenue est lyophilisée (Cryotec qosmos-80, France) puis broyée (Qlive 870873, France). Le taux d'humidité de la poudre obtenue est mesurée l'aide d'un humidimètre (Ohaus MB35, USA) pour exprimer les résultats par matière sèche.

II. Macération conventionnelle

100 g de poudre de grignons d'olive ont été mises en macération dans 500 ml d'éthanol dans un ballon de 1 L pendant deux heures à 50°C sous agitation mécanique. Par la suite, le macérât est filtré puis concentré à sec sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif pour récupérer finalement un extrait éthanolique brut des grignons d'olive.

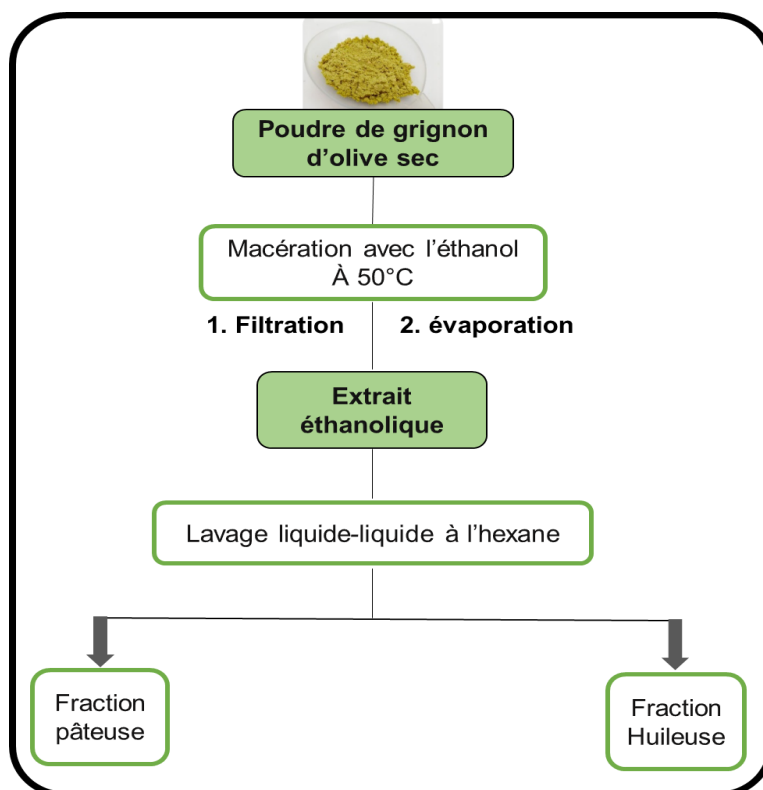


Figure 23 : extraction de la poudre de grignons d'olive par macération



III. Screening phytochimique et biologique

1. Mise en évidence de familles phytochimiques

La phase aqueuse de grignons d'olive a été testée pour la présence de certains métabolites secondaires. Une solution (S) de l'extrait éthanolique a été préparée (1:1 ; soluté : solvant) (m/v) puis testée selon les différents protocoles expérimentaux P1 à P6.

P1 : Test de stérols et terpénoïdes (réaction de Libermann) : à 1 mL de (S), 0,2 mL d'anhydride acétique et 4 gouttes de H₂SO₄ concentré sont ajoutés. La présence de ces métabolites est confirmée par le changement de coloration du violet au bleu-vert.

P2 : Test des flavonoïdes : à 1 mL de (S), 2 mL d'EtOH 50% en présence des quelques gouttes de HCl 0,1 M et deux à trois copeaux de Mg sont ajoutés. Le test est positif si la couleur de la solution varie de l'orangée vers le rouge-violet.

P3 : Test des alcaloïdes (Réaction de Mayer) : à 1 mL de (S), 0,5 mL d'HCl 0,1 N avec 5 gouttes de réactif de Mayer sont ajoutés. L'apparition d'un précipité blanc dans le liquide concentré confirme la présence de ces métabolites.

P4 : Test des saponines : 1 mL de la solution (S) est mélangé avec 1 mL d'eau distillée suivi de 2 min d'agitation. Le test est positif par la formation de mousse.

P5 : test des tanins : l'ajout de FeCl₃ à 1% dans 1 mL de la solution (S), permet de détecter la présence des tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques, et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques.

P6 : Test des caroténoïdes et/ou triterpènes (réaction de Carr et Price) : à 1 mL de la solution (S), 5 gouttes de la solution de « SbCl₃ (20%) / chloroforme » sont ajoutées : l'apparition d'une coloration fugace bleu à bleu violacé indique la présence de l'un ou de ces métabolites.

2. Analyse quantitative de l'extrait éthanolique de grignons d'olive

L'étude quantitative des extraits bruts de grignons d'olive avait pour objectif la détermination de la teneur des phénols totaux et des flavonoïdes. En effet, les grignons d'olive sont connus par leur composition riche en polyphénols. Selon les études réalisées par Cecchi *et al.*, 2018; Ciriminna *et al.*, 2015, 2% des polyphénols passent dans l'huile d'olive durant le procédé de trituration et presque 98% migrent dans le coproduit résultant.



a. Dosage des polyphénols totaux

La teneur totale en polyphénols de l'extrait éthanolique de grignons d'olive a été déterminée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu avec de légères modifications [Khaled *et al.*, 2007]. En bref, un volume de 0,5 mL de l'extrait (1 mg/mL) a été ajouté à 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois). Après 5 min, 2 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium (7,5 %) ont été ajoutés. Les solutions obtenues ont été incubées à l'obscurité pendant 1 h puis leurs absorbances ont été mesurées à 760 nm. Chaque extrait est mesuré trois fois. La quantification des composés phénoliques a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage en acide gallique. La teneur des composés phénoliques dans l'extrait est exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme d'extrait sec.

b. Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes de l'extrait éthanolique des grignons d'olive a été déterminée selon la méthode colorimétrique décrite par Li *et al.*, (2015). Brièvement, 250 μ L de l'extrait (1 mg/mL) ont été mélangés à 75 μ L d'une solution de NaNO_2 (5%) et 75 μ L d'une solution de chlorure d'aluminium hexa-hydraté (AlCl_3) à 10%. Après 6 min d'incubation à l'obscurité à la température ambiante, 500 μ L d'une solution de NaOH (1 M) ont été ajoutés au mélange. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à une longueur d'onde 510 nm par rapport à un blanc par spectrophotométrie. La teneur totale en flavonoïdes a été calculée à l'aide l'équation de la droite de régression de la courbe d'étalonnage de la quercétine (référence) et les résultats ont été exprimés en mg d'équivalence de quercétine par g d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

$$Y = 1,4392 x \ ; \ R^2 = 0,9946$$

Soient :

- Y : L'équation de la droite de régression linéaire de la densité optique par rapport à la concentration.
- R^2 : Le coefficient de détermination des variables x et y (le carré du coefficient de corrélation linéaire r).

IV. L'activité anti-oxydante de l'extrait éthanolique

Dans le but d'étudier l'activité antioxydante des grignons d'olive, 3 tests de mesures complémentaires ont été appliqués sur l'extrait éthanolique.



1. Activité anti radicalaire (test de DPPH•)

Le protocole utilisé pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait par la méthode DPPH est décrit par Trigui *et al.*, 2013. Brièvement, un volume de 1 mL de différentes concentrations de l'extrait éthanolique a été ajouté à 2 mL d'une solution de DPPH (0,04 g/L dans l'éthanol). Les solutions résultantes ont été incubées à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. La concentration inhibitrice CI_{50} relative à la valeur de $PI=50\%$ est déterminée à partir de la courbe puis comparée avec celle de la vitamine E.

2. La capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale de l'extrait éthanolique des grignons d'olive a été testée selon la méthode décrite par Prieto *et al.*, 1999. Un aliquote de 0,1 mL de la solution à tester (1 mg/mL dans l'éthanol) a été mélangé avec 1 mL de solution de réactif (acide sulfurique de 0,6 M, phosphate du sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les solutions résultantes ont été incubées dans un bain-marie à 95 °C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre un blanc contenant 1 mL de solution du réactif et 0,1 mL d'éthanol. L'acide gallique est l'étalon de ce dosage et la capacité antioxydante totale de l'extrait a été exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique (EAG/g d'extrait sec).

3. Pouvoir réducteur (FRAP)

L'extrait éthanolique est solubilisé dans 5 mL d'eau distillée, puis un volume de 0,5 mL de cette solution (ou H₂O pour l'échantillon de contrôle) a été mélangé avec 0,5 mL d'une solution à 1 % de ferricyanure de potassium et 0,5 mL d'un tampon phosphate (0,02 M, pH 7). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement, un volume de 0,5 mL d'une solution d'acide trichloracétique 0,1% est ajouté suivi d'une centrifugation à 2000 tr/min pendant 5 min. 1,5 mL de surnageant est mélangé à 0,2 mL de chlorure ferrique à 0,1%. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc. L'activité réductrice de l'acide ascorbique est utilisée comme standard et les résultats sont exprimés en valeur moyennes ± écarts-types.

V. Activité antidiabétique de l'extrait éthanolique

1. Induction du diabète Type 1 (DT1) chez les rats

L'induction de diabète se manifeste par une solution monohydrate d'alloxane dans une solution saline de NaCl 0.9 % à pH 4 à raison de 120 mg/kg de poids corporel. La préparation



et l'injection intra péritonéale doivent être consécutives. L'alloxane va provoquer une libération intensive d'insuline ce qui engendre la diminution du taux du glucose dans le sang et entraîne une hypoglycémie aiguë qui peut causer la mort de l'animal. Après 6 heures environ, une solution de glucose à 20 % est administrée aux rats afin d'éviter tous symptômes d'hypoglycémie, de même, le glucose est ajouté à l'eau de la boisson à 5 % pour les 24 heures. L'alloxane est réinjecté pour le deuxième jour aussi. Après la période de traitement, les rats marquant une hyperglycémie (glycémie supérieure à 1,2 g/L), seront soumis aux analyses.

2. Traitement du diabète (DT1)

L'évaluation du pouvoir d'inhibition de l' α -amylase *in vitro* de l'extrait éthanolique été déterminée à l'aide d'un dosage spectrophotométrique en utilisant l'acarbose comme une substance de référence [Gella *et al.*, 1997]. Une quantité de l'extrait a été dissoute dans le DMSO à des concentrations de 50, 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$. La solution de l'enzyme α -amylase a été préparée en ajoutant 0,5 mg d' α -amylase dans 1 mL de tampon phosphate (20 mM, pH 6,9). Le mélange incubé 15 min à 37°C puis 1 ml d'amidon (0,5 %) a été ajouté au mélange qui est ré-incubé 15 min à la même température.

Une solution de l'enzyme lipase (100 $\mu\text{g/mL}$ d'un tampon de phosphate de potassium (0,1 mM, pH 6,0)) a été utilisée dans ce test. L'extrait éthanolique du grignon d'olive a été pré-incubé avec la solution de lipase pendant 10 min à 37°C. Par la suite, 0,1 ml de substrat NPB a été ajouté. La quantité de *p*-nitrophénol formée a été mesurée après 15 min à 37°C. Chaque expérience a été réalisée en triplicat.

L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 405 nm (Jenway 6405 UV / Visible, Grande-Bretagne). De même, une réaction de contrôle a été effectuée dans les mêmes conditions sans l'extrait de grignon d'olive. Le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé par l'expression suivante :

$$\text{PI} = [(\text{Absorbance contrôle} - \text{Absorbance Test}) / \text{Absorbance contrôle}] \times 100$$

- **DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- **NPB** : Butyrate de *p*-Nitrophényle



VI. Activité analgésique de l'extrait éthanolique

1. Le principe

Le test de torsion permet d'évaluer l'activité analgésique périphérique. L'effet analgésique de l'extrait éthanolique des grignons d'olive a été déterminé en mesurant le nombre de torsions abdominales induites par l'injection intra-péritonéale (IP) de l'acide acétique (0,6 %).

La technique utilisée a été réalisée selon la méthode décrite par Ouédraogo et ses collaborateurs [Ouédraogo *et al.*, 2011]. Cinquante-cinq minutes après l'administration intra-gastrique de l'extrait ou du standard (l'acide salicylique 100 mg/kg), les souris ont reçu par voie intrapéritonéale l'acide acétique (0,6 %) à la dose de 10 mL/kg. Cinq minutes après l'injection de l'acide acétique, le nombre de torsions a été compté chez chaque souris durant 30 min. Les solutions préparées ont été administrées par voie intra-gastrique 55 min avant l'injection de l'acide acétique. L'effet analgésique périphérique a été évalué selon la formule suivante :

$$\%d'inhibition = (1 - Wt/Wb) * 100$$

Avec :

- Wb : moyenne du nombre de torsions du groupe témoin
- Wt : moyenne du nombre de torsions du groupe traité.

Dans notre étude :

Les souris albinos suisses ont été réparties au hasard en trois groupes composés chacun de cinq animaux. Tous les groupes ont d'abord été traités avec de la levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) (3 mL/kg de suspension à 10 % sous-cutanée) pour l'induction de la fièvre. Après 24 h, les animaux du groupe 1 ont été traités avec de l'eau distillée et ont servi de contrôle négatif. Les animaux du groupe 2 ont été traités avec du paracétamol (Aspégic) par voie orale et pris comme contrôle positif. Les animaux des groupes 3 ont été traités avec l'extrait éthanolique à une dose de 50 mg/Kg de poids corporel. Les résultats ont été exprimés en nombre de contorsions détectées durant une période de 5 min après injection de l'acide acétique ainsi qu'en pourcentage d'inhibition des crampes.



B. OPTIMISATION DE L'ECO-EXTRACTION DE BIOMOLECULES A HAUTE VALEUR AJOUTEE A PARTIR DE GRIGNONS

I. Prédiction théorique du meilleur ratio Ethanol-Eau pour l'extraction des polyphénols

L'extraction des composés phénoliques des végétaux ou de leurs coproduits est influencée par différents facteurs comme la nature de la matrice, le pH, la température, la polarité du solvant, le rapport soluté/solvant et le temps d'extraction. Dans notre étude, l'éthanol et l'eau sont considérés comme des solvants verts. L'optimisation de la proportion EtOH/H₂O a été menée par une étude théorique à l'aide du logiciel COSMO-RS puis confirmé par des études expérimentales.

La prédiction COSMO-RS est une procédure qui se déroule en deux étapes comprenant des étapes microscopiques et macroscopiques. On commence par la première étape du modèle COSMO qui consiste à simuler l'environnement conducteur virtuel dans lequel les molécules étudiées sont intégrées. Dans un environnement donné, la molécule induit une densité de charge de polarisation à sa surface. Par conséquent, l'algorithme de calcul quantique auto-cohérent convertit la molécule à l'état d'énergie optimale dans le conducteur en fonction de la géométrie et de la densité électronique de la molécule. La deuxième étape utilise des calculs thermodynamiques statistiques. La densité de charge de polarisation induite par la molécule est utilisée pour quantifier l'énergie de l'interaction des segments de surface interagissant par paires attribué à la liaison hydrogène et l'électrostatique. A la surface de chaque molécule, la distribution 3D des charges de polarisation est convertie en une fonction de composition de surface appelée « le profil S ». Ce profil S fournit des informations détaillées sur la distribution de la polarité moléculaire. Par la suite, le potentiel chimique du segment de surface appelé « potentiel σ », est calculé en utilisant la thermodynamique de l'interaction moléculaire basé sur le profil S obtenu. Tout récemment, une intégration directe de la fonction de réponse du solvant 'potentiel sigma' du COSMO-RS dans l'auto-consistance de la chimie quantique. Dans le présent travail, le programme COSMOthermX (version C30 release 13.01) a été utilisé. Des mélanges hydroalcooliques d'EtOH : H₂O avec une variation des pourcentages d'éthanol de 0 à 100% ont été modélisés. Les calculs ont été effectués à 20°C et à 50°C pour chaque mélange. Après une étude



bibliographique approfondie, la sélection des solutés a été basée sur les principaux polyphénols détectés dans les grignons d'olive [Malapert *et al.*, 2017].

En mettant en œuvre le modèle COSMO dans le logiciel COSMOtherm (C30 1401, CosmothermX14, COSMOlogic GmbH & CO.KG), la solubilité relative des principaux composés du grignon d'olive selon différents rapports EtOH : H₂O a pu être calculée. Le calcul se fait de la manière suivante :

$$\log_{10}(x_j) = \log_{10}\left[\frac{\exp\left(u_j^{\text{pure}} - u_j^{\text{solvent}} - \Delta G_{j,\text{fusion}}\right)}{RT}\right]$$

- x_j : solubilité de j
- μ_j^{pure} : le potentiel chimique du composé pure j
- μ_j^{solvant} : le potentiel chimique de j à des infinités de dilution
- $\Delta G_{j,\text{fusion}}$: l'énergie libre de fusion de j

La solubilité relative est toujours calculée à une dilution infinie. Le logarithme de la meilleure solubilité est défini à 0 et tous les autres solvants sont classés par rapport au solvant de référence ou le meilleur solvant trouvé.

II. Optimisation du temps d'extraction : Etude cinétique

Une étude cinétique préliminaire a été réalisée afin d'optimiser le temps nécessaire pour extraire la majorité des composés phénoliques à partir des grignons d'olive. Le solvant utilisé pendant l'étude cinétique est basé sur la littérature et les résultats de la prédiction théorique obtenus par le logiciel COSMO-RS. Selon la littérature [Çepo *et al.*, 2017 ; Barros *et al.*, 2013 ; Nawaz *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2008], les ratios du solvant hydroalcoolique les plus utilisés dans ce type d'extraction sont des ratios allant de 50% à 80% d'éthanol ou de méthanol, ce qui est confirmé aussi par la prédiction théorique. Le ratio 60% EtOH et de 40% H₂O a été choisi pour les études préliminaires.

5 g de grignons d'olive secs sont mis en suspension dans 50 mL de solvant éthanol/eau (rapport soluté/solvant, 1 :10) sous une agitation constante pendant 3 h. Un prélèvement de 5 mL de la solution est réalisé à $t = 0$ puis après 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 120 min et 180 min pour étudier la cinétique de l'extraction du grignon d'olive par la détermination de la quantité des phénols totaux (TPC) de l'extrait. Cette procédure est réalisée à 20°C et à 50°C. Trois mesures ont été prises pour chaque étape.



III. Optimisation du meilleur ratio EtOH-H₂O pour l'extraction des polyphénols

Après une prédiction théorique de la solubilité relative des solutés étudiés dans les différents ratios éthanol : eau, et l'optimisation de la durée d'extraction, il est nécessaire finalement de confirmer le meilleur ratio du solvant. De ce fait, la macération conventionnelle a été mise en œuvre à deux températures différentes : 20°C et 50°C pour déterminer les solubilités expérimentales. Le même principe d'extraction décrit dans la partie d'étude cinétique est utilisé pour chaque ratio EtOH/H₂O : 5 g de grignons d'olive sec sont mis en suspension dans 50 mL de solvant éthanol/eau (rapport soluté/solvant, 1 :10) sous une agitation constante pendant 20 min à une température de 20°C puis de 50°C. Les prélèvements ont été faits en triplicat pour les analyses spectrophotométriques et chromatographiques.

IV. Intensification du rendement d'extraction : techniques innovantes et vertes

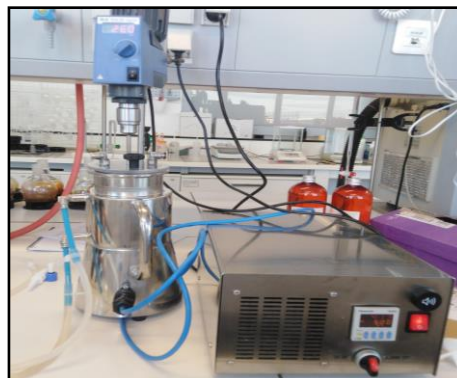
1. Extraction accélérée par solvant « ASE »

Un extracteur rapide de type (E-916/E-914, BUCHI, Suisse) a été utilisé pour l'ASE. Les conditions opératoires ont été fixées à 100 bars pour la pression d'extraction, 50°C pour la température pour un cycle d'extraction. 1 min de temps de préchauffage avant 5 min d'extraction et enfin 3 min de décharge. 6 g de poudre de grignons d'olive ont été mélangés avec du sable et versés dans des cellules d'extraction de 120 ml, puis 60 ml de mélange (EtOH/H₂O 60:40 v/v) ont été injectés dans les cellules pour collecter finalement les extraits.



2. Extraction assistée par ultrason à sonde « UAE-P »

L'UAE des grignons d'olive a été réalisée à l'aide d'une sonde à ultrasons (20 KHz, 1 kW, UIP 1000 hdT, Hielscher Ultrasonic GmbH, Allemagne). 15 g de poudre de grignons d'olive ont été immergés dans 150 mL de mélange hydroalcoolique (EtOH-H₂O 60:40 v/v). La solution a été insérée dans un réacteur à double





enveloppe connecté à un système de refroidissement/chauffage (Ministat 125, Huber, Allemagne) pour maintenir la température à 50 °C pendant l'extraction. Ensuite, ce mélange a été soumis aux ultrasons pendant 5 min avec une puissance ultrasonore de 500 W.

3. Extraction assistée par ultrason à bain « UAE-B »

L'UAE-B a été réalisée dans un réacteur d'extraction par ultrasons PEX 1 (REUS., Contes, France). Il est composé d'un réacteur en inox de dimensions 14 × 10 cm et d'une capacité maximale de 1 L, équipé d'un transducteur à la base qui fonctionne à 25 kHz de fréquence, avec une puissance d'entrée maximale (puissance de sortie du générateur) de 350 W. Le contrôle et la régulation de la température d'extraction de 50°C est assuré par un réacteur à double enveloppes à circulation eau à l'aide d'un système de refroidissement/chauffage (Ministat 125, Huber, Allemagne).



15 g de poudre de grignons d'olive immergées dans 150 mL de solvant d'extraction (EtOH-H₂O 60:40 v/v) ont été introduits dans le réacteur à ultrasons.

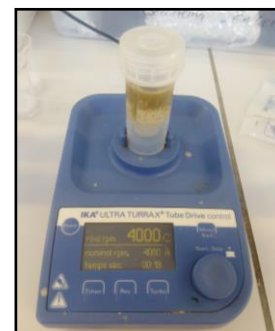
4. Extraction assistée par micro-ondes « MAE »

Un système Milestone EOS-GR (Microwave Gravity System, Italie) équipé d'un capteur de température infrarouge et de deux magnétrons de 950 W a été utilisé pour la MAE. Dans un ballon à fond rond de 500 ml, 15 g de poudre de grignons d'olive ont été immergés dans 150 ml de mélange éthanol : eau (60:40 v/v). La puissance était préalablement fixée à 100W et la température était mesurée à 5 min d'extraction (entre 52°C et 54°C).



5. Extraction assistée par les microbilles « BM »

L'extraction assistée par microbilles a été réalisée en tube d'entraînement de 20 mL de type ULTRA-TURRAX (UTTD, Ika, Allemagne). Une masse de 1 g de grignons d'olive a été mélangée à 20 g de billes de céramique et à 10 mL de mélange éthanol : eau préchauffée (60:40 v/v) puis, le mélange a été soumis à 4000 rpm, pendant 5 min. Les extraits ont été conservés à -18°C jusqu'à l'analyse.





V. Détermination des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été réalisé par la méthode du Folin-Ciocalteu. Un volume de 2,5 mL de l'extrait préalablement dilué (1 : 1000) a été mélangé avec 125 µL du réactif de Folin-Ciocalteu, après 3 min de repos, un volume de 50 µL d'une solution aqueuse saturée du carbonate de sodium (Na_2CO_3) a été ajouté. Après agitation, la solution a été incubée pendant 60 min à l'obscurité. La densité optique a été mesurée par la suite à 750 nm (UV-Visible specord S600, analytic jena). Le tyrosol a été utilisé comme référence pour la gamme étalon.

VI. Quantification des phénols totaux par UHPLC :

La quantification des phénols totaux a été faite par la UPLC (Acquity UPLC[®] H-Class plus system (Waters, Milford, MA, USA)) équipée d'un détecteur à barrette de diodes (DAD 200-800 nm, Waters, Milford, MA, USA). Pour la détermination de la teneur en composés phénoliques dans les différents extraits du grignon d'olive, une méthode UPLC en phase inversée a été appliquée comme décrite par Malapert *et al.* 2018. La séparation a été réalisée sur une colonne Acquity UPLC-BEH C18 (2,1 mm * 50 mm, granulométrie 1,7 µm). La phase mobile a été acidifiée à l'eau à 1% par de l'acide formique (solvant A) et de l'acétonitrile (Solvant B). Le gradient était linéaire et les proportions de solvant B utilisées étaient les suivantes : 0–10 min 1–20 %, 10–12 min 20–30 % et 12–14 min 30–100 %. Le volume d'injection était de 1 µL et la température de la colonne a été maintenue à 35°C. Le long des trois étapes du gradient, le débit était de 0,30, 0,35 et 0,40 mL/min. La détection a été réalisée sur une gamme de 200 et 600 nm avec 1,2 nm de résolution. La quantification des principaux composés phénoliques a été réalisée à partir de courbes d'étalonnage construites avec l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique. Les composés phénoliques ont été détectés et quantifiés à 280 nm. Toutes les analyses ont été faites en triplicat.

VII. Les analyses statistiques :

L'expression des variables continues a été prise comme valeur moyenne \pm écart type (SD). La distribution de normalité de toutes les variables quantitatives (TPC, 3-hydroxytyrosol, tyrosol, acide caféique et acide *p*-coumarique) a été analysée et validée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Ensuite, afin de comparer la moyenne de TPC entre tous les groupes de ratio de solvant à 20°C et 50°C, un test paramétrique ANOVA et un test post-hoc (Tukey) ont été utilisés. Le test *Student* a été utilisé pour comparer la valeur moyenne de la quantité de 3-hydroxytyrosol, tyrosol, acide caféique et acide *p*-coumarique après 20 min de



macération à deux températures : 20°C et 50°C. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics 23 (Armonk, NY, USA) à un niveau de confiance de 95 % (valeur de $p < 0,05$ considérée comme statistiquement significative). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.



C. OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS PAR UNE HUILE VÉGÉTALE

I. Choix des paramètres de l'optimisation

Grâce à leurs compositions variées en acides gras polyinsaturés, les huiles végétales peuvent être des solvants verts pour l'extraction de certains composés d'intérêts à partir d'une matrice végétale. L'oléo-extraction est une nouvelle approche récemment développée par des chercheurs du domaine de la chimie verte, visant l'évaluation et l'optimisation du pouvoir solubilisant des huiles végétales pour certains composés bioactifs. Une étude portée par Yara-Varón et ses collaborateurs, 2017, a souligné le pouvoir solubilisant des huiles végétales pour des composés bioactifs et l'intérêt des solvants biosourcés comme une alternative aux solvants d'origine pétrolier. Une autre étude portée par Li Ying *et al.*, 2019 sur l'extraction des composés volatiles et non-volatiles des feuilles de romarin par une gamme d'huiles végétales a montré que certaines huiles ont la capacité d'extraire des composés aromatiques et des molécules antioxydantes non volatiles. Ils ont montré aussi que le pouvoir solubilisant des huiles peut être amélioré par l'ajout de certains composés des dérivés oléiques comme les diglycérides, glycéryle mono-oléate et les glycéryle mono-stéarate.

Le pouvoir solubilisant de certains composés polaires par des huiles végétales est trouvé lié à la présence de ses composés mineurs dans la composition des huiles. A cet égard, cette partie de thèse a été portée sur l'étude du pouvoir solubilisant des deux huiles alimentaires pour extraire des composés phénoliques à partir de la poudre de grignons d'olive. Ce travail a été réalisé à l'aide d'un plan factoriel complet à 3 facteurs : le type d'huile, la méthode d'extraction et la température. Pour simplifier l'étude, deux niveaux pour chaque paramètre ont été choisis en accord avec l'état de l'art.

La température ambiante a été utilisée comme référence (25°C) et une deuxième température de 65°C a été choisie. La macération conventionnelle a été choisie comme méthode de référence et l'UAE a été choisie comme technique d'extraction innovante.

L'extraction assistée par ultrason a été réalisée dans un réacteur d'extraction par ultrasons numérique CS-YJ-5120-1 (Chine). Il est composé d'un réacteur en inox d'une capacité maximale de 5 L, équipé d'un transducteur à la base du réacteur qui fonctionne à 40 KHz de fréquence, avec une puissance d'entrée maximale (puissance de sortie du générateur) de 120 W. Le système est équipé d'un régulateur de température (0 à 80°C) et un régulateur



de temps (1 à 99 min). 5g de la poudre de grignons d'olive ont été immergées dans 50 mL d'huile végétale et soumis aux ultrasons à une température de 25°C puis à 45°C pour chaque type d'huile pour une durée de 45 min.

II. Optimisation du temps d'extraction : Etude cinétique

L'étude cinétique a été réalisée par une macération conventionnelle à température ambiante (25°C). 10 g de grignons d'olive secs ont été mis en suspension dans 100 mL d'huile d'olive sous une agitation constante pendant 3 h. Des prélèvements de 5 mL du mélange réactionnel ont été effectués durant l'extraction à $t = 0$ puis après 15 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 120 min et 180 min. Les résultats ont été présentés sous forme des valeurs de la quantité des phénols totaux (TPC) pour chaque prélèvement. Les mesures ont été réalisées en triplicat.

III. Détermination des phénols totaux

La méthode utilisée pour extraire les composés phénoliques à partir des huiles a été décrite par Tsimidou *et al.*, 1998 avec une légère modification. 5 mL de l'extrait huileux a été mélangé avec 5 mL d'hexane (1 :1, V/V) et puis extrait avec 10 ml de méthanol (60% 1 :1, V/V) trois fois par décantation. L'extrait polaire obtenu est filtré par un filtre de porosité 0,45 μm puis concentré à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Finalement les extraits ont été conservés à -18°C jusqu'à leur réutilisation pour analyse.

IV. Plan d'expérience Factoriel complet

Le plan d'expérience factoriel complet (2^n) à trois facteurs a été utilisé afin d'optimiser le rendement d'extraction des composés phénoliques à partir du grignon d'olive. Le logiciel Minitab Version 16 a été utilisé pour ce travail.

Trois facteurs indépendants ont été choisis dans notre étude (X_1 , X_2 , X_3) ; à deux niveaux à, appelés niveau « bas : -1 » et niveau « élevé : +1 » :

- Huile d'extraction (X_1 : huile de maïs (-1) et huile d'olive (+1))
- La méthode d'extraction (X_2 : Macération (-1) et Ultrason (+1))
- La température (X_3 : 25°C (-1) et 65°C (+1))

La matrice de conception des différentes expériences par le plan factoriel complet contenant huit expériences. Ils ont été mis en œuvre pour évaluer les effets de trois paramètres (X_1 , X_2 , X_3) sur le rendement d'extraction (tableau 1).

**Tableau 1** : matrice de conception factoriel complet des trois paramètres utilisés

Expériences	X ₁ : Type d'huile		X ₂ : Méthode d'extraction		X ₃ : Température	
	H. Mais (-1)	H. Olive (+1)	Macération (-1)	Ultrason (+1)	25°C (-1)	65°C (+1)
1	+		+		+	
2	+		+			+
3	+			+	+	
4	+			+		+
5		+	+		+	
6		+	+			+
7		+		+	+	
8		+		+		+



Références Bibliographiques

A

- Aluyor E.O., Ozigagu C.E., Oboh O.I., Aluyor P. (2009). Chromatographic analysis of vegetable oils: A review. *Sci. Res. Essays*. 4, 191–197.

B

- Barros, F.; Dykes, L.; Awika, J. M.; Rooney, L. W. (2013). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. *J. Cereal Sci.* 58, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.011>
- Belghih Y., Kallel I., Rosa M., Stathopoulos P., Skaltsounis L.A., Allouche N., Chemat F. (2022). Intensification of biophenols extraction yield from olive pomace using innovative green technologies. *Biomolecules*, 13(1), 65. <https://doi.org/10.3390/biom13010065>

C

- Cecchi L., Migliorini M., Zanoni B., Breschi C. & Mulinacci N. (2018). An effective HPLC based approach for the evaluation of the content of total phenolic compounds transferred from olives to virgin olive oil during the olive milling process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98, 3636-3643.
- Čepo, D. V.; Albahari, P.; Končić, M. Z.; Radić, K. (2017). Solvent extraction and chromatographic determination of polyphenols in olive pomace. *Food in Health and Disease* 6, 7-14. <https://www.researchgate.net/publication/319752053>.
- Chen B., Mc Clements D.J., Decker E.A. (2011). Minor components in food oils: A critical review of their roles on Lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 901–916. [doi: 10.1080/10408398.2011.606379](https://doi.org/10.1080/10408398.2011.606379).
- Ciriminna R., Meneguzzo F., Fidalgo A., Ilharco L. M., & Pagliaro M. (2015). Extraction, benefits and valorization of olive polyphenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 118(4), 503–511.

G

- Gella, F.J., Gubern, G., Vidal, R., Canalias, F., (1997). Determination of total and pancreatic a-amylase in human serum with 2-chloro-4- nitrophenyl-a-D-maltotriose as substrate. *Clinica Chimica Acta* 259, 147–160.



H

- Harborne J.B., (1998). *Phytochemical Methods: A guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd edition, New York: *Chapman. Hall. Int. Ed.*, 234-245.

K

- Khaled T., Feras Q.A., Mohammad G., Mohammad M. and Tamam E.E. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.*, 104(4), 1372–1378. [Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.064](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.064).

L

- Li, J.-E., Fan, S.-T., Qiu, Z.,-H., Li, C., Nie, S.-P. (2015). Total flavonoids content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Mosla chinensis* Maxim. Cv. Jiangxiangru. *LWT. Journal of Food Science and Technology*. 64(2), 1022-1027.
- Li, Ying, Kunnitee Bundeasomchok, Njara Rakotomanomana, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Romain Bott, Yong Wang, & Farid Chemat. (2019). Towards a Zero-Waste Biorefinery Using Edible Oils as Solvents for the Green Extraction of Volatile and Non-Volatile Bioactive Compounds from Rosemary. *Antioxidants* 8(5), 140. <https://doi.org/10.3390/antiox8050140>

M

- Malapert, A.; Reboul, E.; Loonis, M.; Dangles, O.; Tomao, V. (2018). Direct and rapid profiling of biophenols in olive pomace by UHPLC-DAD-MS. *Food Anal. Methods*. 11, 1001–1010. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1064-2>.
- M. Tsimidou, G. Papadopolus, D. Boskou, (1992). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil part 1, *Food Chemistry* 45, 141–144. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90025-W](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90025-W)

N

- Nawaz, H.; Shi, J.; Mittal, G. S.; Kakuda, Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Sep. Purif. Technol.* 48, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.006>.

O

- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44, 307–315.



- Ouédraogo, N. ; Tibiri, A. ; Sawadogo, R. W. ; Lompo M. ; Hay, A. E. ; Koudou, J. ; Dijoux, M. G. and Guissou, I. P. (2011). Antioxidant anti-inflammatory and analgesic activities of aqueous extract From stem bark of *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(10), 2047-2053.

P

- Prieto P., Pineda M. and Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269(2), 337–341. [Doi: 10.1006/abio.1999.4019](https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019).

S

- Sinnecker S, Rajendran A, Klamt A, Diedenhofen M, Neese F. (2006). Calculation of solvent shifts on electronic g-tensors with the conductor-like screening model (COSMO) and its self-consistent generalization to real solvents (direct COSMO-RS). *J Phys Chem A*. 110, 2235–2245.

T

- Trigui, M., Hsouna, A. B., Tounsi, S., & Jaoua, S. (2013). Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*. 41, 150–157. [doi:10.1016/j.indcrop.2012.04.011](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.011)

W

- Wang, J.; Sun, B.; Cao, Y.; Tian, Y.; Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem.* 106, 804–810. [https://doi.org/ 10.1016/j.foodchem.2007.06.062](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.062).

Y

- Yara-Varón, E.; Li, Y.; Balcells, M.; Canela-Garayoa, R.; Fabinao-Tixier, A.S.; Chemat, F. (2017). Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. *Molecules*. 22, 1474. [doi: 10.3390/molecules22091474](https://doi.org/10.3390/molecules22091474)



CHAPITRE III :

RÉSULTATS & DISCUSSION

A. ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE GRIGNONS D'OLIVE

I. Extraction par macération de la poudre de grignons d'olive

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs ainsi que pour l'étude de leurs effets biologiques et thérapeutiques. Dans cette partie, nous avons choisi la macération conventionnelle moyennant un solvant vert l'éthanol pour l'extraction de la poudre de grignons d'olive. L'extrait éthanolique obtenu était bi-phasique ce qui nous amené à réaliser des extractions liquide-liquide afin de séparer ces deux fractions pour obtenir finalement, un extrait éthanolique monophasique sans des traces de corps gras (voir la figure 24 dans le chapitre matériel et méthodes).

Après la macération, nous avons quantifié la teneur en composés phénoliques dans l'extrait éthanolique et évalué par la suite leur activité antioxydante. Le rendement d'extraction et les teneurs phénoliques de l'extrait éthanolique sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 2 : rendements d'extraction et teneurs en composés phénoliques dans l'extrait éthanolique

Extrait	Rendement d'extraction (%)	Composés phénoliques	
		Phénols totaux (mg EAG/g grignons d'olive secs)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g grignons d'olive secs)
EtOH	11,2%	2,48 ± 0,06	0.644 ± 0,008

L'extrait obtenu est formé de deux phases bien séparées : une phase lipidique contenant les acides gras et des glycérides et une phase polaire, contenant les composés phénoliques ainsi que les sucres existant dans les grignons ainsi que tous les autres composés polaires de l'olive. Le lavage de l'extrait éthanolique moyennant l'hexane nous a permis de récupérer 49,13% de cet extrait sous forme d'une pâte.



II. Screening phytochimique de l'extrait éthanolique

La mise en évidence de certaines familles de métabolites secondaires de l'extrait éthanolique de grignons d'olive est investiguée moyennant des méthodes colorimétriques. Le tableau 3 résume les résultats des tests phytochimiques de l'extrait éthanolique.

Tableau 3 : résultats du criblage phytochimique de l'extrait éthanolique de grignons d'olive

Tests phytochimiques	Extrait éthanolique
Terpénoïdes/stéroïdes	+
Flavonoïdes	+
Alcaloïdes	-
Saponines	+
Tanins	+
Caroténoïdes/Triterpènes	+
Quinones libres	-
Noyaux tropolones	-

(+) Présent, (-) Absent (test négatif)

Les résultats du screening phytochimique réalisé sur l'extrait éthanolique montrent la présence des stéroïdes, des terpénoïdes, des saponines, des caroténoïdes, des triterpènes et des flavonoïdes dans notre échantillon. En revanche, les alcaloïdes, les tanins, les quinones libres et les noyaux tropolones n'étaient pas présents dans l'extrait.

III. Etude chimique de l'extrait éthanolique

1. Spectroscopie Infrarouge (IR)

Une étude spectroscopique par les ondes IR a été réalisée sur un échantillon de l'extrait éthanolique qui a abouti à la détection de certaines bandes spécifiques à des fonctions chimiques.

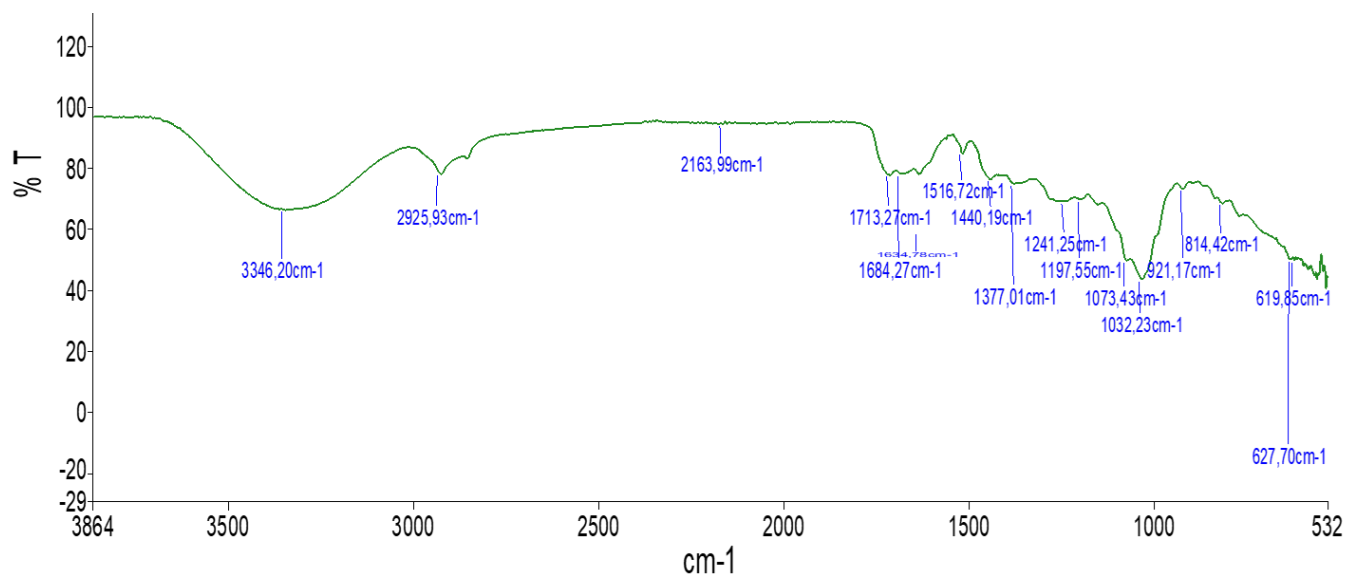


Figure 24 : spectre infrarouge de l'extrait éthanolique

Une bande large est détectée de 3100 à 3500 cm^{-1} correspondant à l'élongation des liaisons OH. Cette bande peut être attribuée aux vibrations des OH dans des alcools, des phénols ou des groupes carboxyliques.

Les deux bandes détectées autour de 2925 et 2855 cm^{-1} sont attribuées respectivement à des élongations asymétriques et symétriques des CH dans des chaînes aliphatiques.

Les bandes larges vers 1600 et 1684 cm^{-1} peuvent être attribuées à l'élongation des C=C des composés aromatiques et des alcènes, et à l'élongation C=O dans les cétones ou les aldéhydes. La bande vers 1700 cm^{-1} peut être attribuée aux groupements carbonyles des acides carboxyliques.

Les bandes observées dans la zone 1200 à 1400 cm^{-1} sont attribués à la vibration d'élongation symétrique des $-\text{COO}-$, à l'élongation des CO des acides carboxyliques et à la déformation angulaire symétrique des méthyles.

Les bandes entre 900 et 1200 cm^{-1} sont attribuées à l'élongation des CO dans les groupes carboxyliques de molécules organiques, mais aussi aux vibrations de déformation OH dans des alcools primaires ou des éthers aromatiques.

La présence de ces différentes bandes d'absorption et spécifiquement celles de l'élongation des liaisons OH et les bandes d'élongation des C=C aromatiques peut nous confirmer la présence des composés phénoliques dans cette fraction.



2. Identification des composés chimiques dans l'extrait éthanolique moyennant l'analyse LC-MS

Le spectre LC-MS de l'extrait éthanolique de grignons d'olive (fig. 25) montre une richesse en composés organiques majoritairement des composés phénoliques. Les pics avec des temps de rétention de 1,06 ; 3,42 ; 3,60 ; 6,70 et 9,34 min représentent les composés majoritaires de l'extrait éthanolique. Le spectre montre aussi des composés d'abondance plus ou moins importante et d'autres composés minoritaires qui ont des pics relativement faibles.

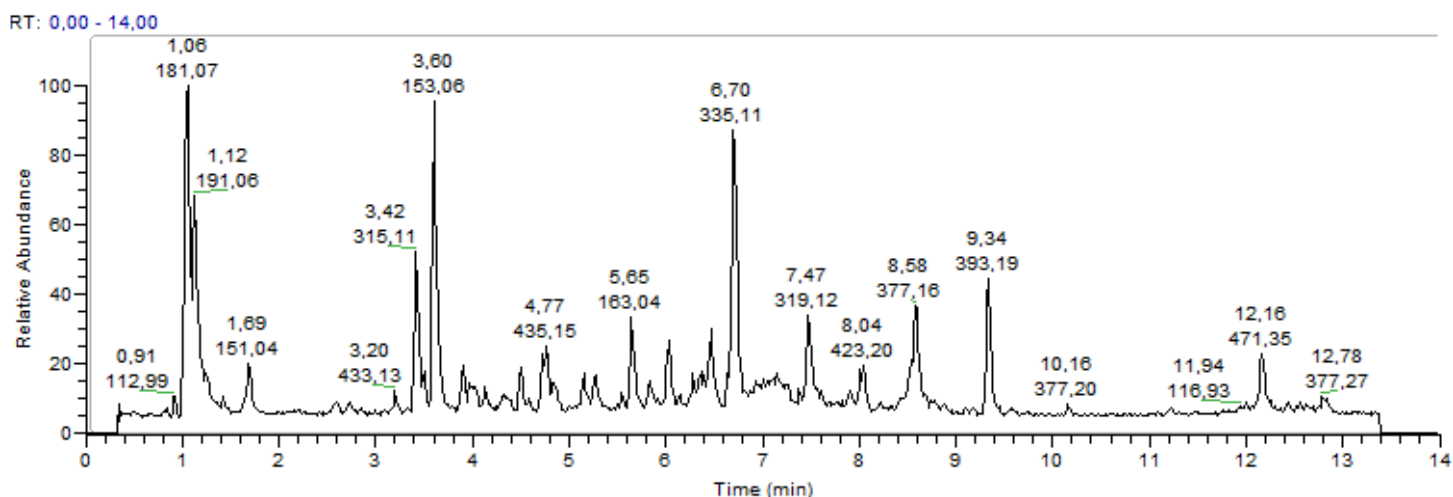


Figure 25 : spectre LC-MS de l'extrait éthanolique de grignons d'olive

Les composés qui ont été identifiés sont illustrés dans le tableau 4 qui comporte le nom du composé identifié, son abondance relative par rapport à la somme des composés détectés, sa formule brute, l'ion moléculaire m/z [M-H]⁻, les principaux fragments et son temps de rétention en min.

Tableau 4 : tableau récapitulatif des composés identifiés de l'extrait éthanolique par LC-MS.

N°	Nom des composés	Abondance %	Formules brutes	m/z [M-H] ⁻	Les principaux fragments (%)	Tr (min)	Réf
Hydroxytyrosol, Tyrosol et leurs dérivés							
1	Hydroxytyrosol	6,88	C ₈ H ₉ O ₃	153,06	123,04(100)	3,68	[Ghorbel <i>et al.</i> , 2021]
2	Hydroxytyrosol hexoside	10,89	C ₁₄ H ₁₉ O ₈	315,11	153,06(100) ; 123,04 ;	3,38	[Ben Saad <i>et al.</i> , 2021]
3	Acétate d'hydroxytyrosol	2,89	C ₁₀ H ₁₁ O ₄	195,06	59,01(100)	6,96	[Katsina <i>et al.</i> , 2021]



4	Dérivé n°1 d'hydroxytyrosol	1,54	-	447,15	153,06(100) ; 123,04 ; 89,02	3,58	-
5	Dérivé n°2 d'hydroxytyrosol	0,42	-	481,19	153,06(100) ; 123,04 ; 69,03 ; 71,01	5,51	-
6	Dérivé n°3 d'hydroxytyrosol	0,67	-	523,18	197,08(100) ; 153,09	6,82	-
7	Tyrosol	1,50	$C_8H_{10}O_2$	137,02	136,86(100) ; 183,86 ; 93,03 ; 111,94	4,51	[Ghorbel <i>et al.</i> , 2021]
8	Tyrosol glucoside	3,05	$C_{14}H_{20}O_7$	299,11	71,01(100) ; 89,02 ; 101,02 ; 119,05 ; 138,06	3,87	-
Oleuropéine et ses dérivés							
9	Oleuropéine	0,28	$C_{25}H_{32}O_{13}$	539,18	153,06(100) ; 95,05 ; 123,04 ; 377,12 ; 307,08 ; 275,09	6,93	[Liorent-Martinez <i>et al.</i> , 2015]
10	Oleuropéine glucoside	0,42	$C_{31}H_{41}O_{18}$	701,22	95,05(100) ; 539,18 ; 377,12 ; 307,08 ; 275,09	5,89	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
11	Oleuropéine aglycone	3,04	$C_{22}H_{32}O_{16}$	377,14	197,08(100) ; 153,09;	4,69	[Liorent-Martinez <i>et al.</i> , 2015]
12	Dérivé d'oleuropéine aglycone	1,57	-	755,33	241,11(100) ; 139,08 ; 377,16 ; 59,01	8,57	-
13	Oléoside (Secologanoside)	5,32	$C_{16}H_{22}O_{11}$	389,11	69,03(100) ; 121,07 ; 101,02 ; 209,04 ; 345,12	4,11	[Liorent-Martinez <i>et al.</i> , 2015] ; [Ghorbel <i>et al.</i> , 2021]
14	Oléoside glucoside	1,09	$C_{22}H_{32}O_{16}$	551,14	161,02(100) ; 69,03 ; 133,03 ; 389,11 ; 507,15	5,98	-
15	Oléoside di- glucoside	0,18	$C_{28}H_{42}O_{21}$	713,2	161,02(100) ; 69,03 ; 133,03 ; 507,15 ; 551,14	5,48	-
16	Oléoside méthyle ester	1,75	$C_{17}H_{23}O_{11}$	403,12	121,03(100) ; 371,10 ; 89,02 ; 101,02 ; 165,06 ; 223,06 ; 179,06	5,01	[Michel <i>et al.</i> , 2015] [Kabbash <i>et al.</i> , 2023]
Les flavonoïdes							
17	Lutéoline	6,53	$C_{15}H_{10}O_6$	285,04	133,03(100) ; 151,01	7,47	[Kabbash <i>et al.</i> , 2023] [Michel <i>et al.</i> , 2015]



18	Lutéoline glucoside	1,90	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447,09	285,04(100)	5,80	[Liorent-Martinez <i>et al.</i> , 2015]
19	Lutéoline rutinoside	0,43	$C_{27}H_{29}O_{15}$	593,15	285,04(100)	5,61	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
20	Apigénine	0,24	$C_{15}H_{10}O_5$	270,05	117,03(100) ; 151,0	8,23	[Jinguo <i>et al.</i> , 2016]
21	Apigénine-7-O-glucoside	0,59	$C_{21}H_{19}O_{10}$	431,06	241,02(100) ; 103,92 ; 288,03 ; 269,03 ; 153,09 ; 213,02	4,74	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
22	Apigénine-7-O-rutinoside	0,45	$C_{27}H_{29}O_{14}$	577,15	269,05(100)	6,04	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
23	Rutine	0,18	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,15	300,03(100) ; 271,03 ; 255,03	5,57	[Liorent-Martinez <i>et al.</i> , 2015]
24	Quercétin	0,13	$C_{15}H_{10}O_7$	301,04	151,00(100) ; 179 ; 121,03 ; 107,01 ; 65,00	7,56	[Jinguo <i>et al.</i> , 2016] ; [Chernonosov <i>et al.</i> , 2017]
25	Rutinose	1,32	$C_{12}H_{22}O_{10}$	325,09	119,05(100) ; 163,04 ; 183,01, 66,96	4,29	-
26	7,3',4',5'-Tetrahydroxy flavanone	0,81	$C_{15}H_{10}O_6$	287,15	287,15(100) ; 59,01 ; 73,03 ; 139,08 ; 123,04 ; 95,05	8,05	[Jinguo <i>et al.</i> , 2016]
27	Dérivé n°1 de Tétrahydroxy flavanone	0,38	-	495,18	287,15(100) ; 325,16 ; 423,20 ; 67,19 ; 139,08 ; 123,04 ; 73,03	8,03	-
28	Dérivé n°2 de Tétrahydroxy flavanone	0,90	-	459,18	287,15(100) ; 325,16 ; 423,20 ; 67,19 ; 139,08 ; 123,04 ; 73,03	8,03	-
29	Gallocatechine	0,84	$C_{15}H_{13}O_7$	305,07	96,96(100) ; 59,01 ; 225,11	4,66	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
Les acides phénoliques							
30	Acide caféique	8,38	$C_9H_8O_4$	179,03	135,04(100)	4,81	[Jinguo <i>et al.</i> , 2016]
31	Acide caféique hexose	0,47	$C_{15}H_{18}O_9$	341,08	179,03(100) ; 135,04	3,92	[Jinguo <i>et al.</i> , 2016]
32	Acide caféique diglycoside	0,12	$C_{21}H_{29}O_{13}$	489,30	66,70(100) ; 135,04 ; 179,03	6,11	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
33	Dérivé d'acide caféique hexose	0,40	-	661,22	341,10(100) ; 221,04 ;	7,48	-



					159,04 ; 95,05		
34	Acide férulique	0,14	$C_{10}H_{10}O_4$	193,05	134,04(100) ; 178,03 ; 148,05	4,30	[Jinguo <i>et al.</i> , 2016] ; [Chernonosov <i>et al.</i> , 2017]
35	Acide gallique monohydraté	0,51	$C_7H_5O_5$	187,1	125,10(100)	6,41	[Jinguo <i>et al.</i> , 2016]
36	Acide vanilique	0,43	$C_8H_8O_4$	167,03	123,04(100)	3,37	[Irakli <i>et al.</i> , 2016]
37	Acide <i>p</i> -coumarique	5,31	$C_9H_8O_3$	163,04	119,05(100)	5,63	
38	Acide quinique	3,99	$C_7H_{12}O_6$	191,06	191,06(100) ; 85,03 ; 192,06 ; 93,03 ; 127,04	1,09	[Da Silva Mathias <i>et al.</i> , 2019] ; [Kabbash <i>et al.</i> , 2023]
39	Dérivé n°1 d'acide quinique	1,36		533,17	191,06(100) ; 85,03 ; 93,03 ; 192,06 ; 355,98	1,12	-
40	Dérivé n°2 d'acide quinique	0,12		421,07	191,06(100) ; 85,03 ; 99,93	1,16	-
41	Acide Lithospermique	1,16	$C_{27}H_{22}O_{12}$	537,15	145,03(100) ; 69,03 ; 493,16	6,46	[Irakli <i>et al.</i> , 2016]
42	Glucoside d'acide loganique	0,35	$C_{22}H_{33}O_{15}$	537,19	179,07(100) ; 375,14 ; 195,07 ; 146,04	4,89	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
43	Acide tétrahydroxy-octadécénoïque	1,24	$C_{18}H_{36}O_6$	345,09	149,02(100) ; 147,04 ; 121,03 ; 59,01 ; 327,09 ; 191,03	8,53	[Jinguo <i>et al.</i> , 2016] ;
Les sécoiridoïdes							
44	Verbascoside (secoiridoide Glucoside)	2,58	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623,2	161,02(100) ; 133,03	5,61	[Liorent-Martinez <i>et al.</i> , 2015] [Katsina <i>et al.</i> , 2021]
45	β -Hydroxy-verbascoside (secoiridoide Glucoside)	0,25	$C_{29}H_{35}O_{16}$	639,19	161,02(100) ; 133,03 ; 179,03 ; 621,18	4,96	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
46	Acide élénolique glucoside	2,21	$C_{17}H_{23}O_{11}$	403	101,02(100) ; 71,01 ; 89,02 ; 181,07 ; 223,13 ; 119,03	5,29	[Katsina <i>et al.</i> , 2021]
47	Dérivé d'Acide élénolique	2,64	$C_{20}H_{34}O_{13}$	481,19	371,13(100) ; 71,01 ; 151,04 ;	5,24	[Katsina <i>et al.</i> , 2021]



	hexoside				59,01		
48	Dérivé d'Acide élénolique	1,19	$C_{11}H_{14}O_6$	241,10	139,08(100) ; 59,01 ; 69,03 ; 95,05	8 ,55	[Katsina <i>et al.</i> , 2021]
49	Loganine glucoside	0,32	$C_{23}H_{38}O_{16}$	569,19	299,11(100) ; 453,14 ; 389,11 ; 356,04 ; 313,78	7,00	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
50	Nuzhénide	0,43	$C_{31}H_{41}O_{17}$	685,24	101,02(100) ; 453,14 ; 421,15 ; 299,11 ; 523,18	6,14	[Katsina <i>et al.</i> , 2021]
51	Oléaceine	2,07	$C_{17}H_{20}O_6$	319,11	111,01(100) ; 199,06 ; 85,03 ; 59,01 ; 69,03 ; 5,05 ; 181,05	7,43	[Katsina <i>et al.</i> , 2021]
Autres							
52	Vanilline (Aldéhyde)	2,41	$C_8H_7O_3$	151,03	123,04(100)	4,46	[Katsina <i>et al.</i> , 2021]
53	Aesculin (coumarine)	0,46	$C_{15}H_{15}O_9$	339,06	177,02(100)	4,13	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
54	Aesculétine (coumarine)	0,48	$C_9H_5O_4$	177,01	135,04(100)	4,85	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
55	Ligstroside (iridoide)	0,49	$C_{25}H_{31}O_{12}$	523,18	101,02(100) ; 453,14 ; 69,00 ; 291,09 ; 259,10 ; 223,06 ; 361,13	7,13	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
56	Fructose ou autre disaccharide	0,52	$C_{12}H_{21}O_{11}$	341,10	89,02(100) ; 71,01 ; 59,01 ; 101,02 ; 179,06 ; 113,02	1,18	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
57	Acetoxypinoresinol 4'-β-D-glucoside (lignane)	0,01	$C_{28}H_{33}O_{13}$	577,19	415,14(100) ; 151,04 ; 136,02 ; 59,01	5,49	[Michel <i>et al.</i> , 2015]
58	Syringaresinol	0,24	$C_{22}H_{26}O_8$	417,17	371,13(100) ; 71,01 ; 89,02 ; 101,02 ; 151,08 ; 177,05	5,56	[Bengana <i>et al.</i> , 2013]
59	Dérivé de syringaresinol	0,16	-	479,21	371,13(100) ; 71,01 ; 89,02 ; 417,19 ; 153,06 ; 293,09 ; 356,07	5,56	-
Non-identifiés							
60	ni	0,42	-	313,09	151,04(100) ; 123,04	1,70	-
61	ni	0,75	-	351,10	199,06(100) ; 151,04 ; 111,08 ; 123,04 ; 59,01	5,23	-
62	ni	0,65	-	471,16	66,73(100) ;	5,25	-



					178,09 ; 270,99 ; 290,93 ; 367,88		
63	ni	0,81	-	245,10	111,08(100) ; 201,11 ; 155,07 ; 59,01	5,27	-
64	ni	0,51	-	371,13	71,01(100) ; 151,08 ; 85,03	5,56	-
65	ni	0,10	-	339,20	183,01(100) ; 340,20 ; 67,35	12,08	-
66	ni	0,67	-	693,21	357,10(100) ; 221,04 ; 95,05 ; 159,04	6,70	-
67	ni	0,65	-	535,14	145,03(100) ; 69,03 ; 117,03 ; 163,04	6,63	-
68	ni	0,28	-	789,39	257,14(100) ; 259,14 ; 59,01 ; 394,19	9,33	-
69	ni	0,31	-	396,19	260,15(100) ; 257,14 ; 59,01 ; 66,71 ; 69,03 ; 121,07	9,34	-
70	ni	0,12	-	506,12	99,93(100) ; 115,92 ; 476,11	10,16	-
71	ni	0,35	-	563,34	281,25(100) ; 283,25 ; 253,09	12,20	-

T_r = temps de rétention (min) ; $[M-H]^-$ m/z : masse de l'ion pseudo-moléculaire ; ni = composés non-identifiés

- Identification du composé n°1 :

Le composé 1 ($T_r = 3,68$ min), a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 153,06$ et une formule brute ($C_8H_9O_3$). Son spectre HRMS/MS (fig. 26) contient un pic de base à $m/z = 123,04$ $[M-H-30]$ correspondant à la perte d'une molécule CH_2OH et un autre pic $m/z = 109,03$ $[M-H-44]$ correspondant à la perte d'une molécule C_2H_4OH . En se basant sur la base de données LC/MS trouvées dans la littérature et du schéma de fragmentation, ce composé a été identifié comme **l'hydroxytyrosol** [Ghorbel *et al.*, 2021] qui appartient à la classe des alcools phénoliques. Ce composé est un produit de dégradation de l'oleuropéine et il représente l'un des composés les plus abondants dans l'extrait avec un pourcentage de 6,88%.

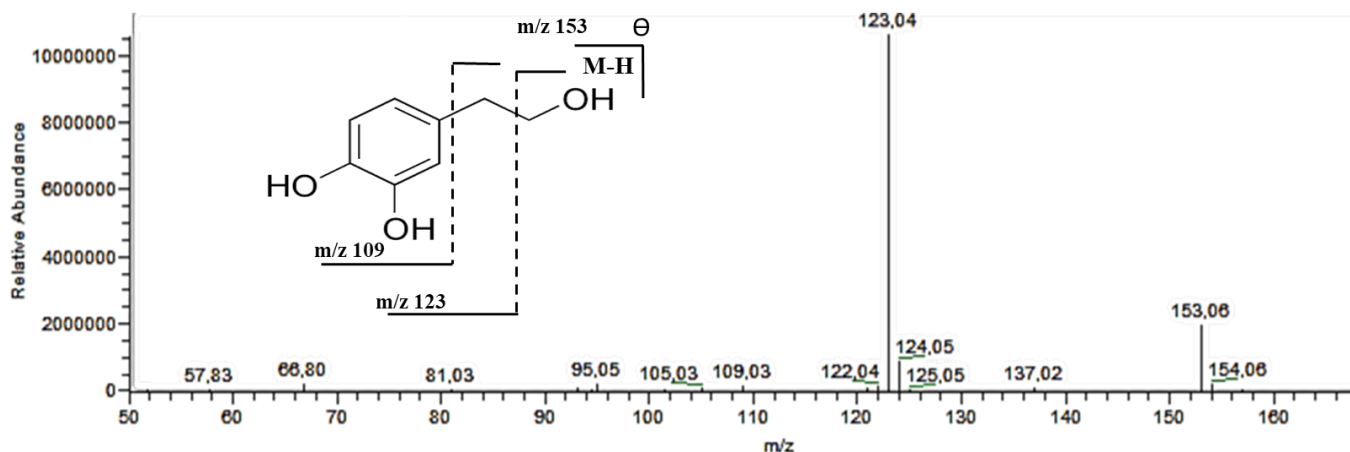


Figure 26 : spectre MS² et schéma de fragmentation du composé 1

- Identification du composé n°2 :

Le composé 2 (Tr = 3,38 min), a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire [M-H]⁻ à m/z = 315,10 et une formule brute (C₁₄H₁₉O₈). Son spectre MS² (fig. 27) contient un pic de base à m/z = 153,06 [M-162-H]⁻ correspondant à la perte d'une molécule d'hexose et un autre pic m/z = 123,04 [M-162-30-H]⁻ correspondant à l'élimination d'une molécule CH₂OH. Ce composé a été détecté avec une abondance de 10,89% par rapport aux autres composés phénoliques, qui représente la teneur la plus élevée. Il est identifié à l'**hydroxytyrosol hexoside** [Ben Saad *et al.*, 2021].

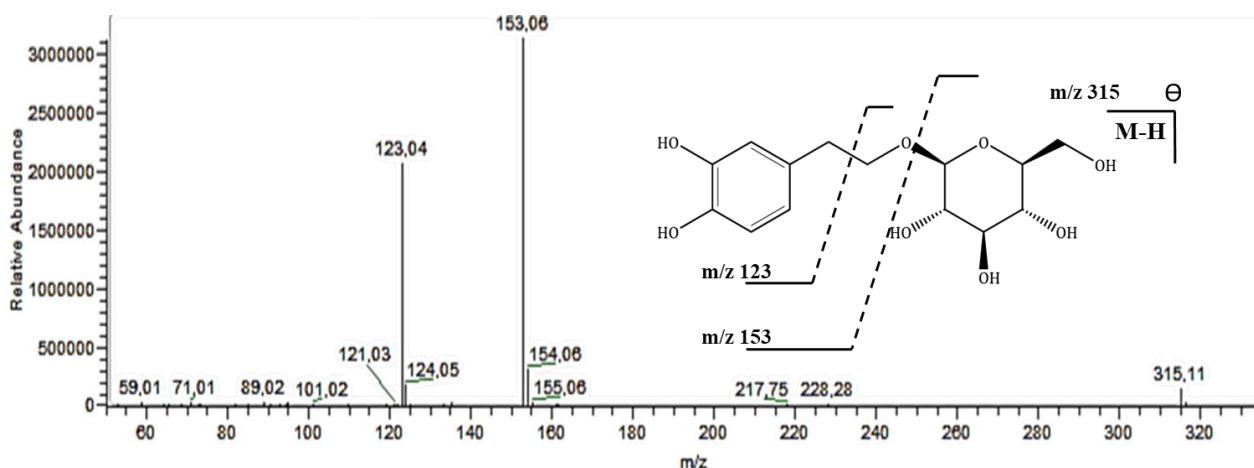


Figure 27 : spectre MS² et schéma de fragmentation du composé 2

- Identification du composé n°3 :

Le composé 3 (Tr = 6,96 min), a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire [M-H]⁻ à m/z = 195,06 et une formule brute (C₁₀H₁₁O₄). Son spectre MS² (fig. 28) a généré un seul



fragment majeur $m/z = 59,01$ $[M-136-H]^-$ correspondant à la perte du groupement acétate $C_2H_3O_2$. Ce composé a été identifié comme étant l'**acétate d'hydroxytyrosol** [Katsina *et al.*, 2021].

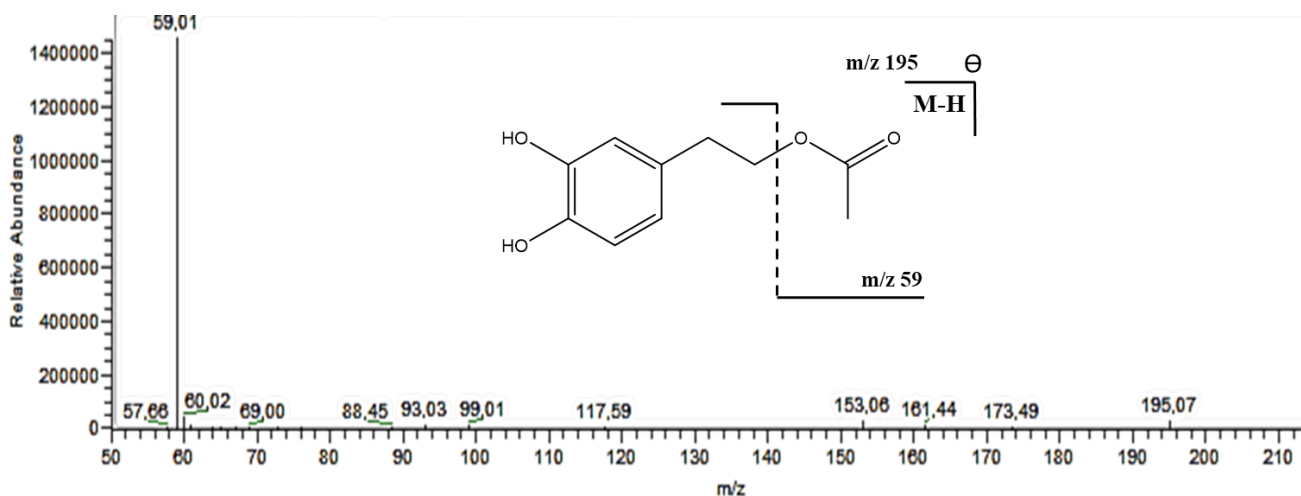


Figure 28 : spectre MS^2 et schéma de fragmentation du composé 3

- Identification du composé n°7 :

Le composé 7 (Tr = 4,51), a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 137,02$ et une formule moléculaire ($C_8H_{10}O_2$). Son spectre MS^2 (fig. 29) a généré un fragment majeur $m/z = 136$ $[M-H]^-$ correspondant à la perte d'un proton et un fragment $m/z = 93,03$ $[M-44-H]^-$ résultant de l'élimination d'une molécule C_2H_4OH . Ce composé a été identifié comme étant le **tyrosol** [Ghorbel *et al.*, 2021].

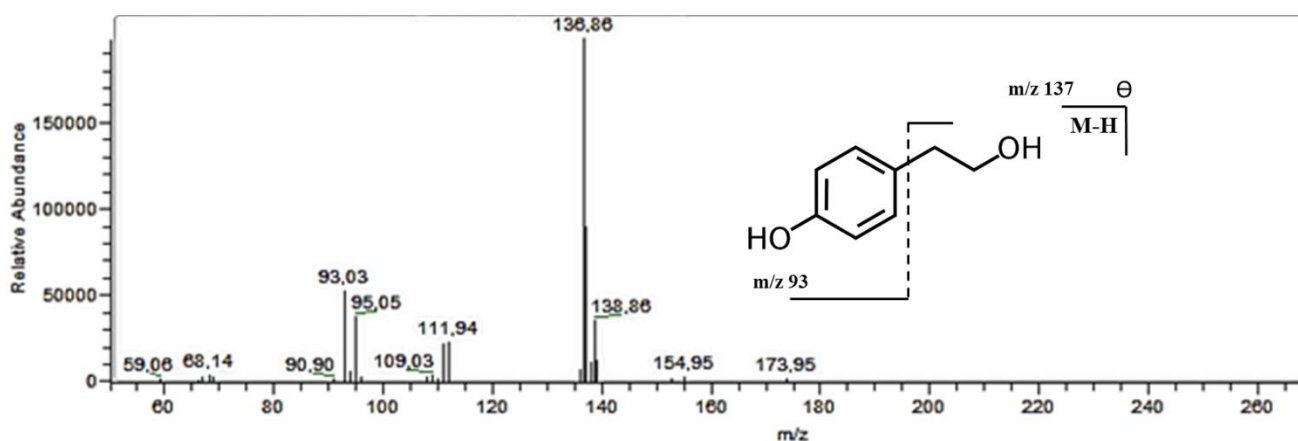


Figure 29 : spectre MS^2 et schéma de fragmentation du composé 7



- Identification du composé n°8 :

Le composé 8 (Tr = 3,87 min), a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 299,11$ et une formule moléculaire ($C_{14}H_{20}O_7$). Selon son spectre MS^2 (fig. 30), la perte d'un fragment hexose $[M-162]$ a donné un ion fragment à $m/z 137,06$, qui correspond au tyrosol. De ce fait, ce composé a été identifié comme étant le **tyrosol glucoside**.

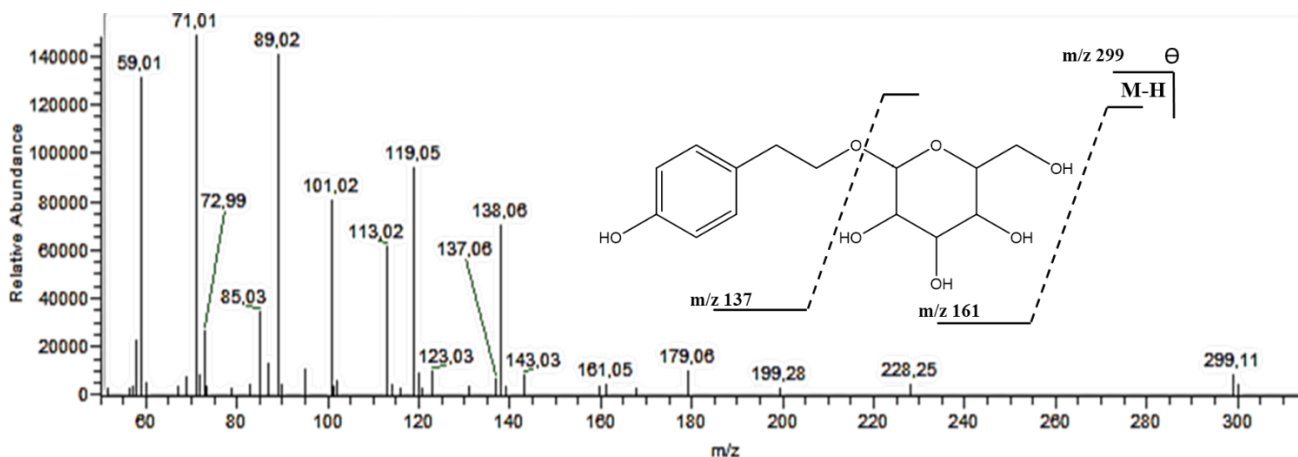


Figure 30 : spectre MS^2 et schéma de fragmentation du composé 8

- Identification du composé n°9, 10 et 11 :

Le composé 9 (Tr = 6,93 min), a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 539,17$ et une formule moléculaire ($C_{25}H_{32}O_{13}$). Son spectre MS^2 (fig. 31), a donné un ion fragment à $m/z = 377,12$ attribué à la perte d'un hexose (-162), qui forme ensuite un fragment à $m/z = 153,06$ puis un autre fragment à $m/z = 123,04$. Ce composé a été identifié comme étant l'**oleuropéine** [Liorent-Martinez *et al.*, 2015]. Deux autres composés dérivés de l'oleuropéine ont été détectés et identifiés à partir de ce spectre.

Le composé 10 (Tr = 5,89 min) avec un ion moléculaire $m/z = 701,22$ d'une formule moléculaire $C_{31}H_{41}O_{18}$ qui a donné presque les mêmes ions fragments que celui de l'oleuropéine et un fragment identique à son ion pseudo-moléculaire suite à l'élimination d'un fragment hexose $[M-162-H]$. Ce composé a été identifié à l'**oleuropéine glucoside** [Michel *et al.*, 2015].

L'ion moléculaire $m/z = 377,14$ généré par le composé 11 qui a été détecté à Tr = 4,69 min a été déjà identifié comme un ion fragment dans le spectre MS^2 de l'oleuropéine suite à la perte d'un hexose (-162). De ce fait ce composé peut être attribué à l'**oleuropéine aglycone** de formule moléculaire $C_{22}H_{32}O_{16}$ [Liorent-Martinez *et al.*, 2015].

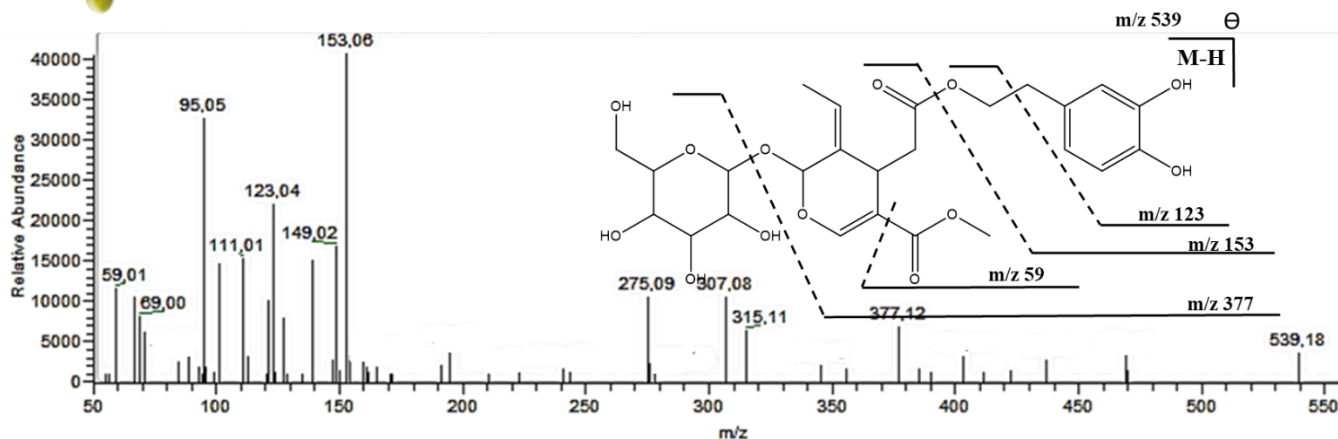


Figure 31 : spectre MS² et schéma de fragmentation du composé 9

- Identification du composé n°13, 14, 15 et 16 :

L'ion précurseur $m/z = 389,11$ correspondant au composé 13 de formule $C_{16}H_{22}O_{11}$, a été détecté à $Tr = 4,11$ min. Sa fragmentation en MS² (fig. 32) a produit un ion à $m/z 345$ dû à la perte du groupement carboxyle (COOH), un ion fragment à $m/z 59,01$ correspond au fragment d'acide éthanoïque CH_2COOH et un autre fragment à $m/z 121,07$ correspondant à l'ion moléculaire C_8H_9O . En se basant sur la littérature, ce composé a été identifié comme l'**Oléoside** [Liorent-Martinez *et al.*, 2015 ; Ghorbel *et al.*, 2021]. Trois autres composés dérivés de l'Oléoside ont été détectés et identifiés à partir du spectre LC-MS de ce fragment.

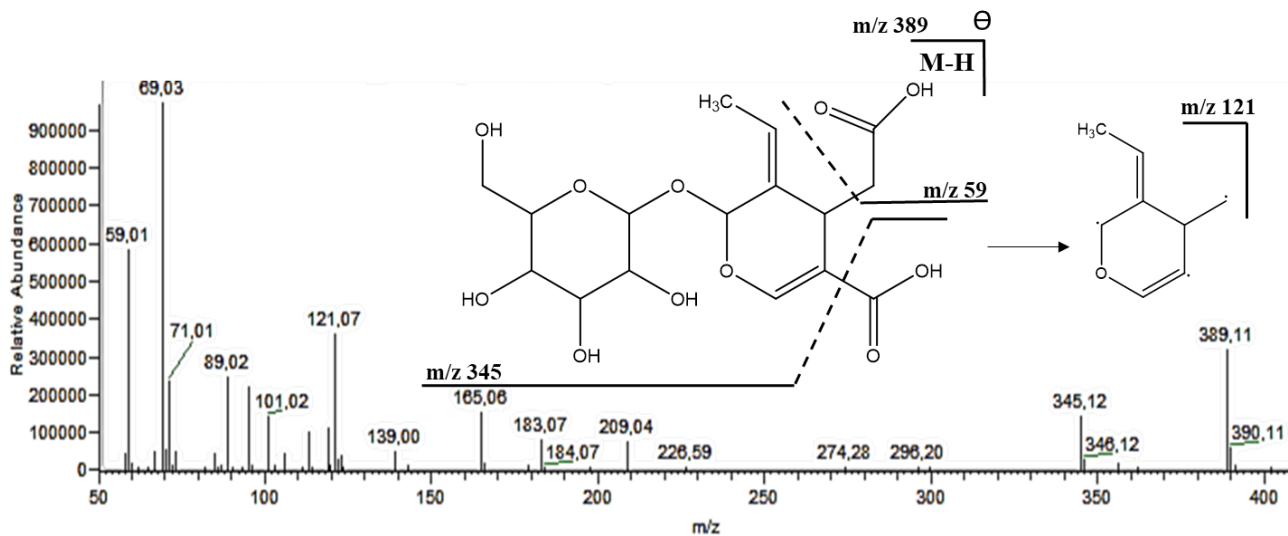


Figure 32 : spectre MS² et schéma de fragmentation du composé 13

Les deux composés 14 ($Tr = 5,98$ min) et 15 ($Tr = 5,48$ min) ont présenté des molécules déprotonées $[M-H]^-$ $m/z = 551,14$ et $m/z = 713,2$ et des formules moléculaires $C_{22}H_{32}O_{16}$ et $C_{28}H_{42}O_{21}$ respectivement. Leur fragmentation en MS² a produit le même ion à $m/z 161,02$ relative à la perte du fragment $C_6H_{10}O_5$. La perte d'un hexose (M-162) pour les deux produits se traduit par la détection d'un ion $m/z = 389,11$ sur le Spectre MS² du composé



14 et un ion $m/z = 551,14$ sur celui du composé 15. D'après ces données le composé 14 a été identifié comme étant l'**Oléoside glucoside** et le composé 15 comme étant l'**Oléoside diglucoside**.

Le composé 16 (Tr = 5,01) a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ $m/z = 403,12$ et une formule moléculaire $C_{17}H_{23}O_{11}$. Son spectre MS^2 (Fig. 33) a montré plusieurs fragmentations comme la perte d'un ion fragment $m/z = 123,03$ correspondant à $C_7H_7O_2$ et un autre ion fragment $m/z = 59,01$ correspondant à l'ion ethanoate CH_3COO^- . En se basant sur la littérature, [Michel *et al.*, 2015 ; Kabbash *et al.*, 2023] ce composé a été identifié à **Oléoside méthyle ester**.

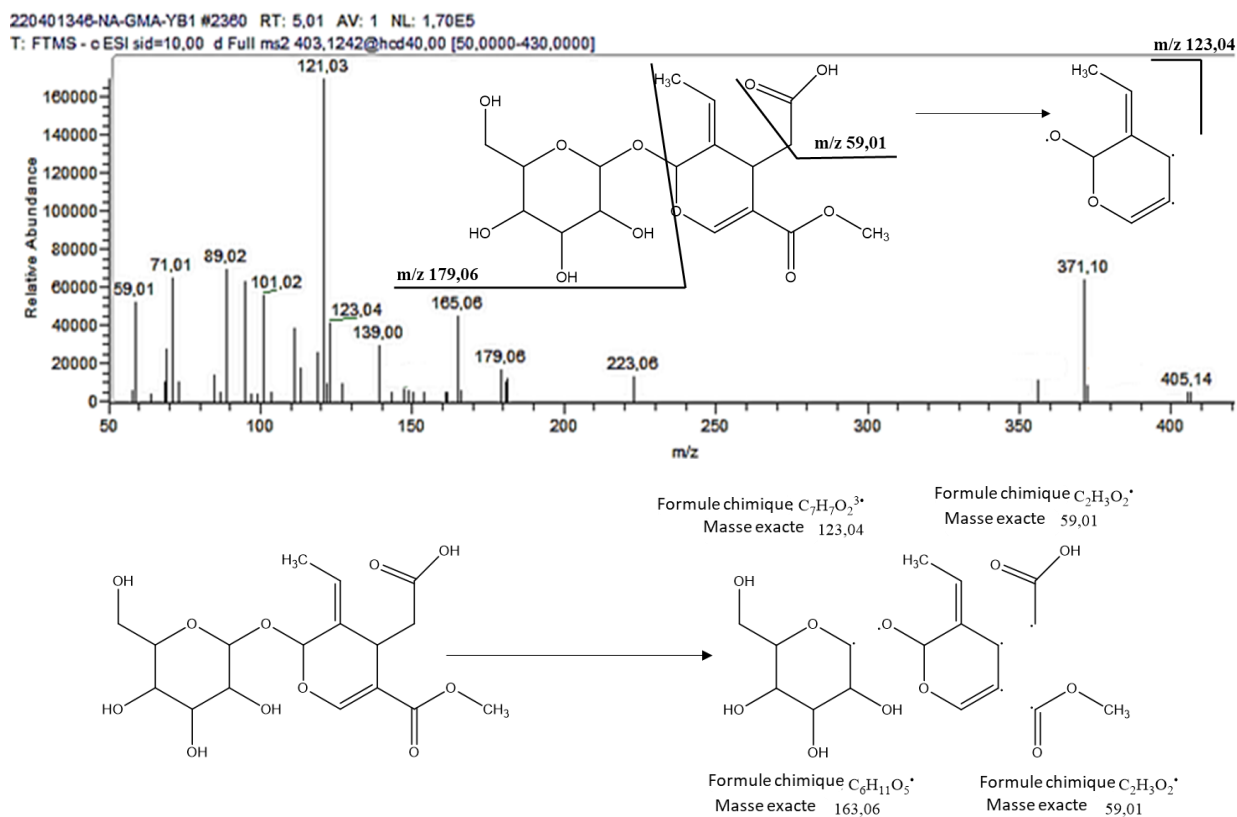


Figure 33 : spectre MS^2 et schéma de fragmentation du composé 16

- Identification du composé n°17, 18 et 19 :

Le composé 17 (Tr = 7,47 min), a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 285,04$ et une formule brute ($C_{15}H_{10}O_6$). Son spectre MS^2 (fig. 34), a donné deux ions fragments à $m/z = 133,03$ et $m/z = 151,01$. La littérature et la fragmentation nous ont permis d'identifier ce composé comme étant la **Lutéoline** [Kabbash *et al.*, 2023] [Michel *et al.*, 2015]. La lutéoline appelée aussi lutéolol est un composé chimique de la famille des flavonoïdes de type flavone.

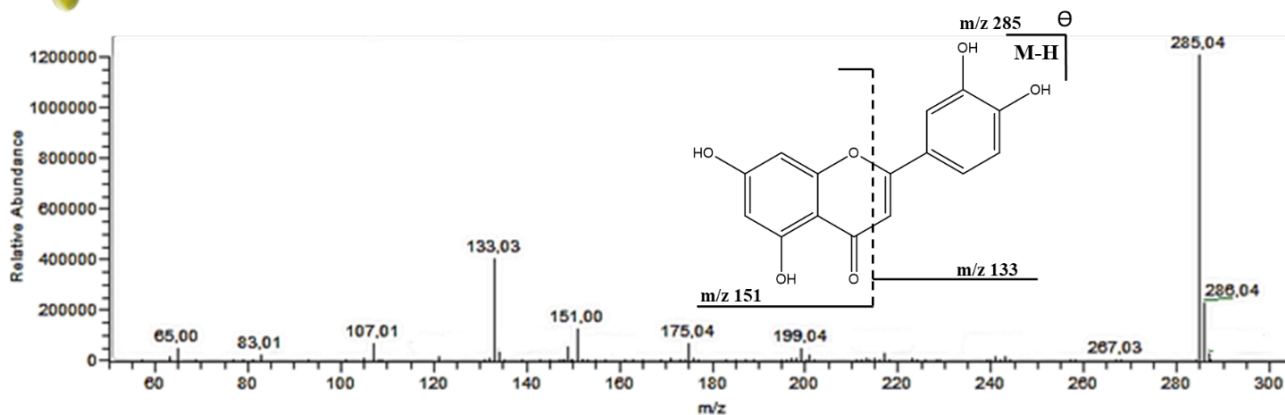


Figure 34 : spectre MS² et schéma de fragmentation du composé 17

Les données LC-MS des composés 18 et 19 à Tr = 5,8 min et 5,61 min ont montré des ions pseudo-moléculaires [M-H]⁻ m/z = 447,09 et m/z 593,15 respectivement. Leurs spectres MS² ont montré le même pic de base à m/z 285,04 correspondant à l'ion moléculaire lutéoline. Le composé 18 a été proposé comme étant la **lutéoline glucoside** de formule moléculaire C₂₁H₂₀O₁₁ [Liorent-Martinez *et al.*, 2015] ; Le composé 19 a été identifié à la **lutéoline rutinoside** de formule C₂₇H₂₉O₁₅ [Michel *et al.*, 2015].

- Identification du composé n°20, 21 et 22 :

Le composé 20 (Tr = 8,23), a présenté un ion pseudo-moléculaire [M-H]⁻ à m/z = 270,05 d'une formule moléculaire (C₁₅H₁₀O₅). Son spectre MS² (fig. 35), a donné deux ions fragments à m/z = 117,03 et m/z = 151,01 qui résultent de la division de la molécule en deux fragments de formules C₈H₅OH et C₇H₄O₄. En se basant sur la littérature ce composé a été identifié comme étant l'**Apigénine** [Jinguo *et al.*, 2016]. C'est un flavonoïde de type flavone.

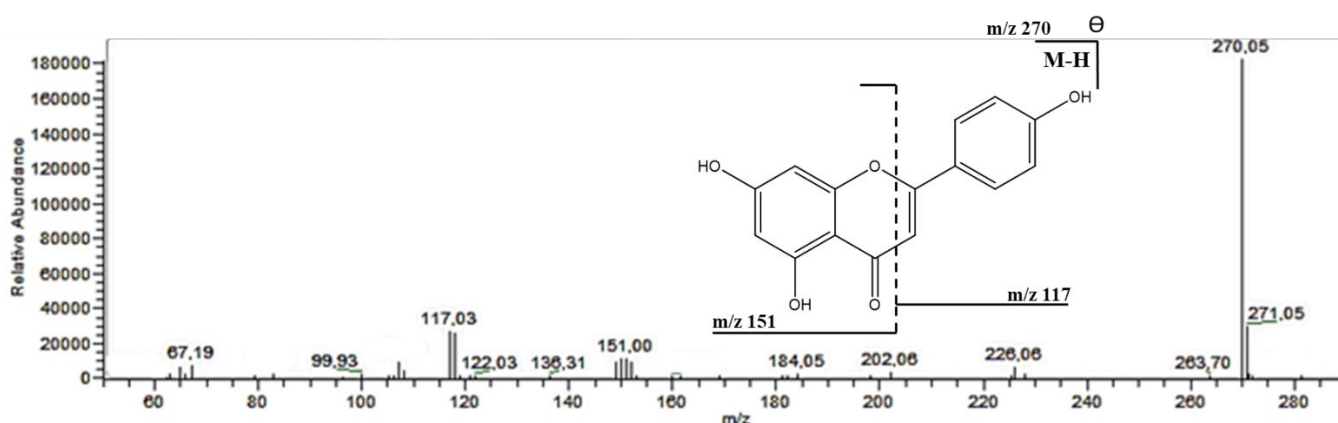


Figure 35 : spectre MS² et schéma de fragmentation du composé 20

Les composés 21 (Tr = 4,47) et 22 (Tr = 6,04) ont présenté des molécules déprotonnées [M-H]⁻ m/z = 431,06 et m/z = 517,15 de formules C₂₁H₁₉O₁₀ et C₂₇H₂₉O₁₄ respectivement. Leur fragmentation en MS² a produit un ion à m/z 269,05 correspondant à



l'ion moléculaire déprotoné de l'apigénine. Le composé 21 a été attribué à l'**Apigénine-7-O-glucoside** [Michel *et al.*, 2015] et le composé 22 a été identifié à l'**Apigénine-7-O-rutinoside** [Michel *et al.*, 2015].

- Identification des composés n°23, 24 et 25 :

Le composé 23 (Tr = 5,57 min), a été détecté avec un ion $[M-H]^-$ à $m/z = 609,15$ et une formule brute ($C_{27}H_{30}O_{16}$). Son spectre MS^2 (fig. 36), a donné un ion de base à $m/z = 300,03$ qui correspond à l'ion moléculaire de la quercétine et d'autres fragments comme l'ion $m/z = 151,01$ qui correspond au fragment $C_7H_3O_4$, et l'ion $m/z = 447,16$ qui résulte de l'élimination du fragment $m/z = 163$. Ce composé a été identifié comme étant la **Rutine** [Liorent-Martinez *et al.*, 2015].

La rutine appelée aussi rutoside ou sophorine est un diglucoside de la quercétine. C'est un flavonoïde naturel de type flavonol. Le quercétol 3-O-rutinoside est relativement fréquent dans la nature, il résulte de l'association de la molécule de la quercétine et celle de la rutinosé. Ces deux molécules ont été détectées dans notre échantillon.

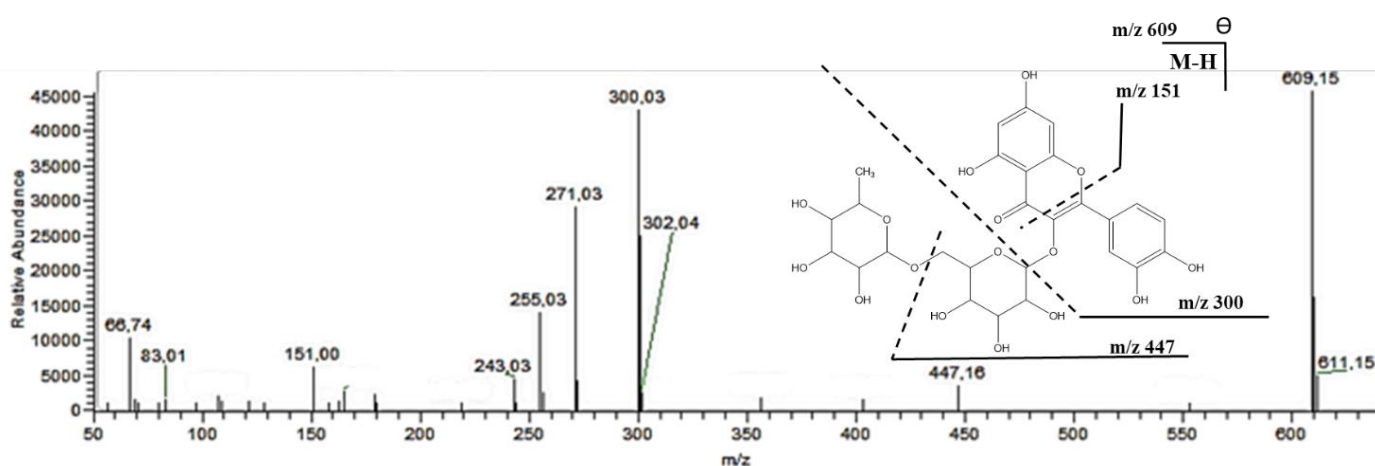
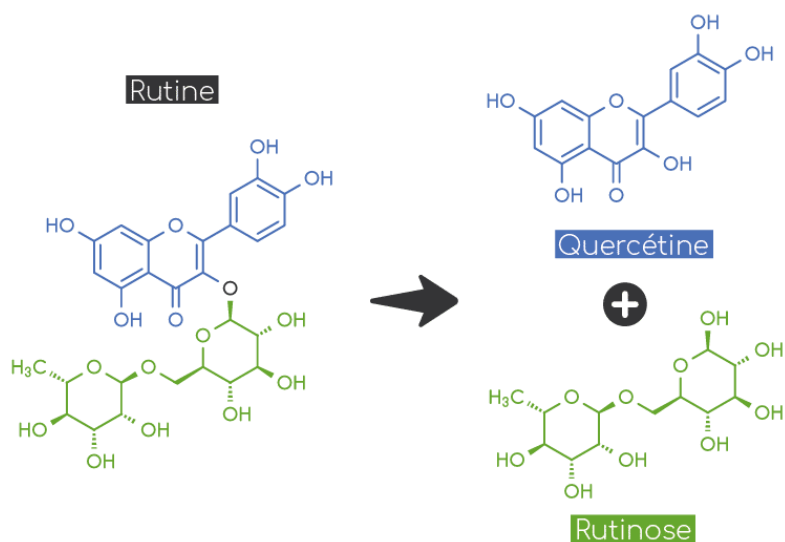


Figure 36 : spectre MS^2 et schéma de fragmentation du composé 23

Le composé 24 (Tr = 7,56 min), a été identifié comme étant la **quercétine** [Jinguo *et al.*, 2016] ; [Chernonosov *et al.*, 2017] avec un ion moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 301,04$ et une formule brute ($C_{15}H_{10}O_7$). Le composé 25 (Tr = 4,29 min), a été identifié comme étant la



rutinose avec un ion moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 325,09$ et une formule moléculaire ($C_{12}H_{22}O_{10}$).

- Identification des composés n°30, 31 et 32 :

Le composé 30 ($Tr = 5,57$ min), ayant un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 179,03$ et une formule brute ($C_9H_8O_4$) a été détecté et identifié comme étant **l'acide caféique** [Jinguo *et al.*, 2016]. Son spectre MS^2 (fig. 37), a donné un ion de base à $m/z = 135,04$ qui résulte de l'élimination d'un fragment $COOH$. Trois autres composés dérivés de l'acide caféique ont été détectés à partir du spectre LC-MS de cette fraction, uniquement deux parmi eux ont pu être identifiés.

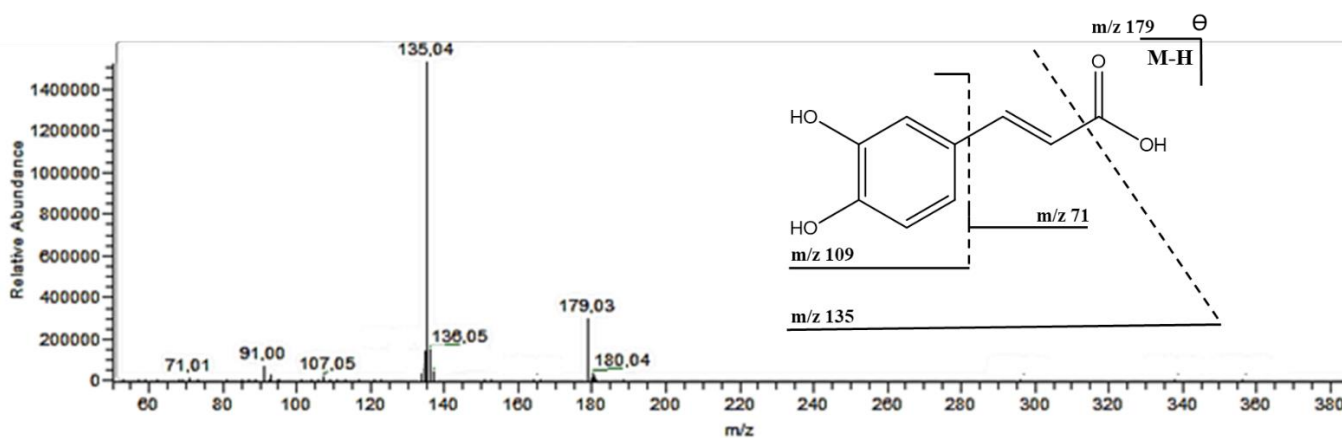


Figure 37 : spectre MS^2 et schéma de fragmentation du composé 30

Le composé 31 ($Tr = 3,92$ min) a présenté une molécule déprotonée $[M-H]^-$ à $m/z = 341,01$ et une formule moléculaire $C_{15}H_{18}O_9$. Sa fragmentation en MS^2 a produit un ion majoritaire à $m/z 179,03$ relatif à l'ion moléculaire de l'acide caféique et qui résulte de la perte d'une molécule d'hexose ($M-162-H$) et un autre ion fragment à $m/z 135,04$ identique à celui détecté dans le spectre de l'acide caféique. Ce composé a été identifié comme étant **l'hexose d'acide caféique** [Jinguo *et al.*, 2016].

Le composé 32 avec un temps de rétention $Tr = 6,11$ min possède un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 489,30$. Sa fragmentation en MS^2 a produit les mêmes ions fragments produits par le composé 31. Dans une étude précédente, Michel *et al.*, (2015) ont pu identifier ce composé à **l'acide caféique di-glucoside**.



- Identification du composé n°34 :

Le composé 34 a présenté un ion $[M-H]^-$ à m/z 193,05 à $Tr = 4,30$ min avec une formule moléculaire ($C_{10}H_{10}O_4$). Son spectre MS^2 (fig. 38), a donné un ion fragment à $m/z = 178,03$ qui résulte de l'élimination d'un groupement méthyle CH_3 . L'élimination d'un groupement $COOH$ du reste du fragment précédent a donné un nouveau ion fragment $m/z = 134,04$. Ce composé a été attribué à l'**acide férulique** [Jinguo *et al.*, 2016; Chernonosov *et al.*, 2017].

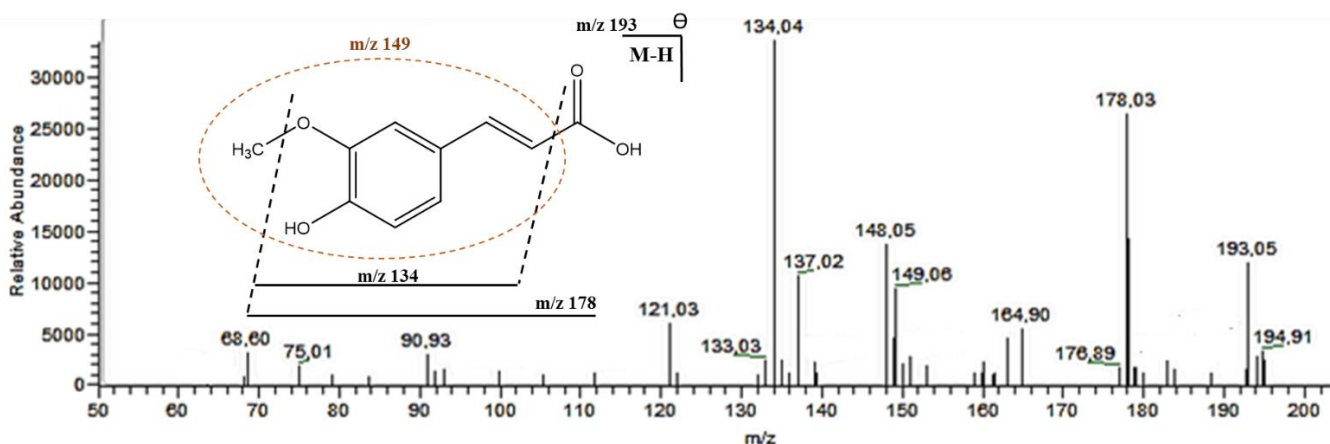


Figure 38 : spectre MS^2 et schéma de fragmentation du composé 34

- Identification du composé n°36 :

L'ion moléculaire $m/z = 167,03$ correspond au composé 36 de formule moléculaire $C_8H_8O_4$, a été détecté à $Tr = 3,37$ min. Sa fragmentation en MS^2 (fig. 39) a produit un ion majeur à m/z 121,07 dû à la perte du groupement carboxyle ($COOH$). En se basant sur la littérature, ce composé a été identifié comme étant l'**acide vanilique** [Irakli *et al.*, 2016].

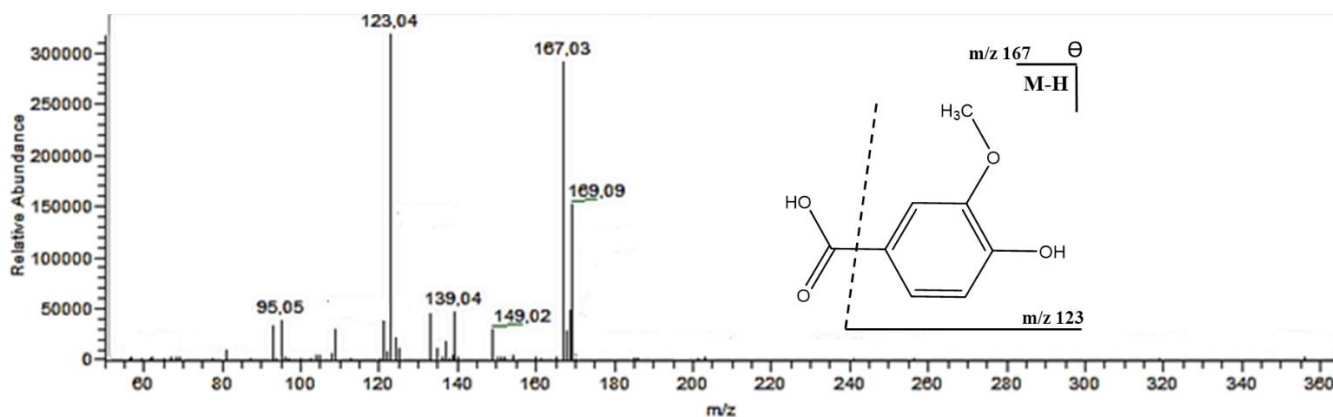


Figure 39 : spectre MS^2 et schéma de fragmentation du composé 36



- Identification du composé n°37 :

Le composé 37 à Tr = 3,37 min a présenté un ion moléculaire déprotoné m/z 163,04 de formule moléculaire C₉H₈O₃. Son spectre MS² (fig. 40) a montré un seul pic de base à m/z 119,05 dû à la perte du groupement carboxyle (COOH). Ce composé a été identifié comme étant l'**acide p-coumarique**. Cet acide phénolique est l'un des composés majoritaires de notre extrait.

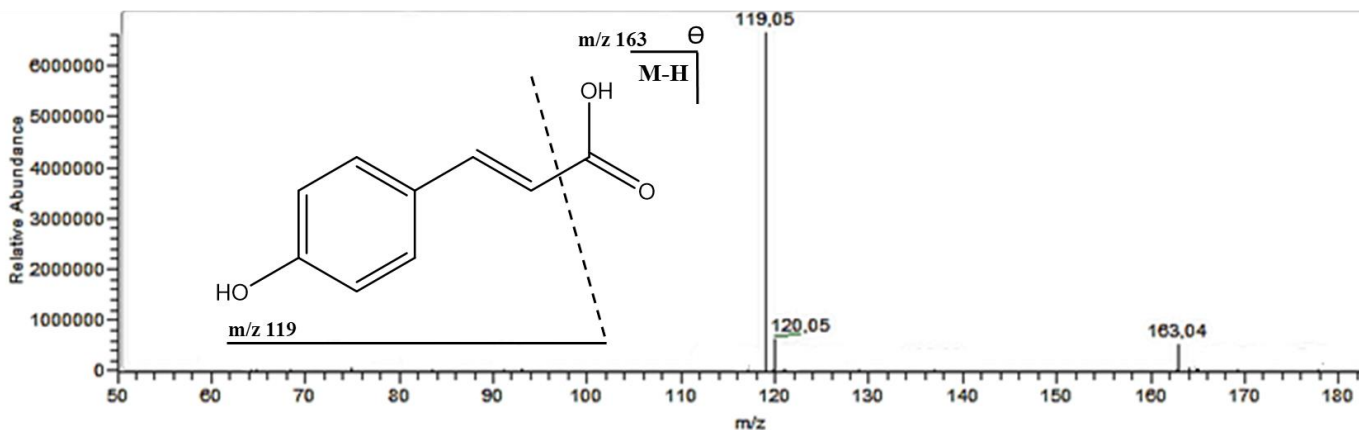


Figure 40 : spectre MS² et schéma de fragmentation du composé 37

- Identification du composé n°44 :

Le composé 44 (Tr = 5,71 min), a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire [M-H]⁻ à m/z = 623,2 et une formule moléculaire (C₂₉H₃₆O₁₅). Son spectre HRMS/MS (fig. 41) contient un pic de base à m/z = 161,02 correspondant à l'ion fragment d'acide caféique déshydraté. En se basant sur des données LC-MS trouvées dans la littérature et du schéma de fragmentation, ce composé a été identifié au **verbascoside** [Liorent-Martinez *et al.*, 2015 ; Katsina *et al.*, 2021]. Le verbascoside appelé aussi actéoside, appartient à la famille extensive des phénylpropanoïdes.

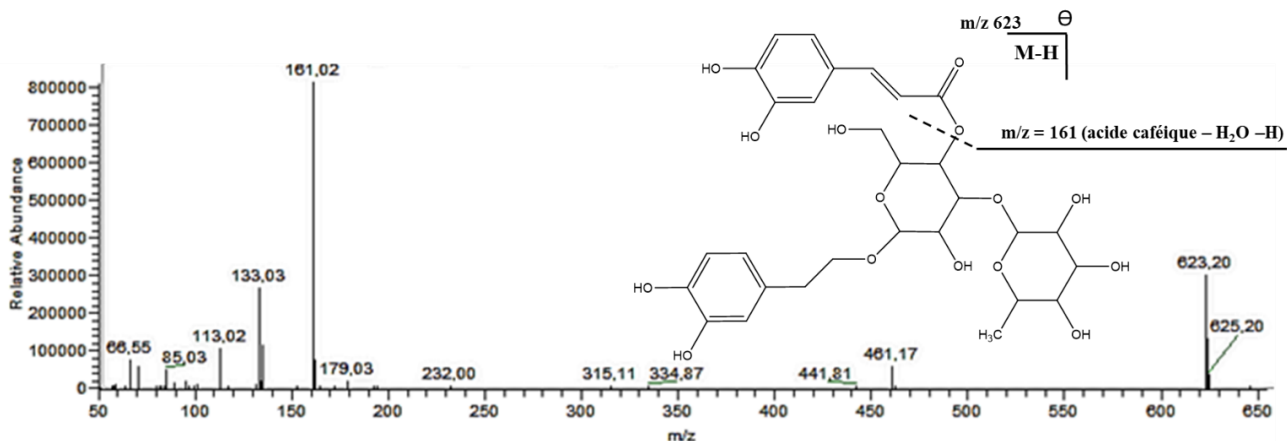


Figure 41: spectre MS² et schéma de fragmentation du composé 44



- Identification du composé n°50 :

Le composé 50 (Tr = 6,14 min), a été détecté avec un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 685,24$ et une formule moléculaire ($C_{31}H_{41}O_{17}$). Son spectre MS^2 (fig. 42), a donné un pic à $m/z = 121,03$ correspondant à l'ion fragment de tyrosol $-OH$. Un autre pic à $m/z = 299,11$ attribué à l'ion fragment de tyrosol glucoside et un ion fragment à $m/z = 523,18$ attribué à la perte d'un hexose (-162). Ce composé a été identifié comme étant **le Nuzhénide** de la famille des secoiridoïdes [Katsina *et al.*, 2021].

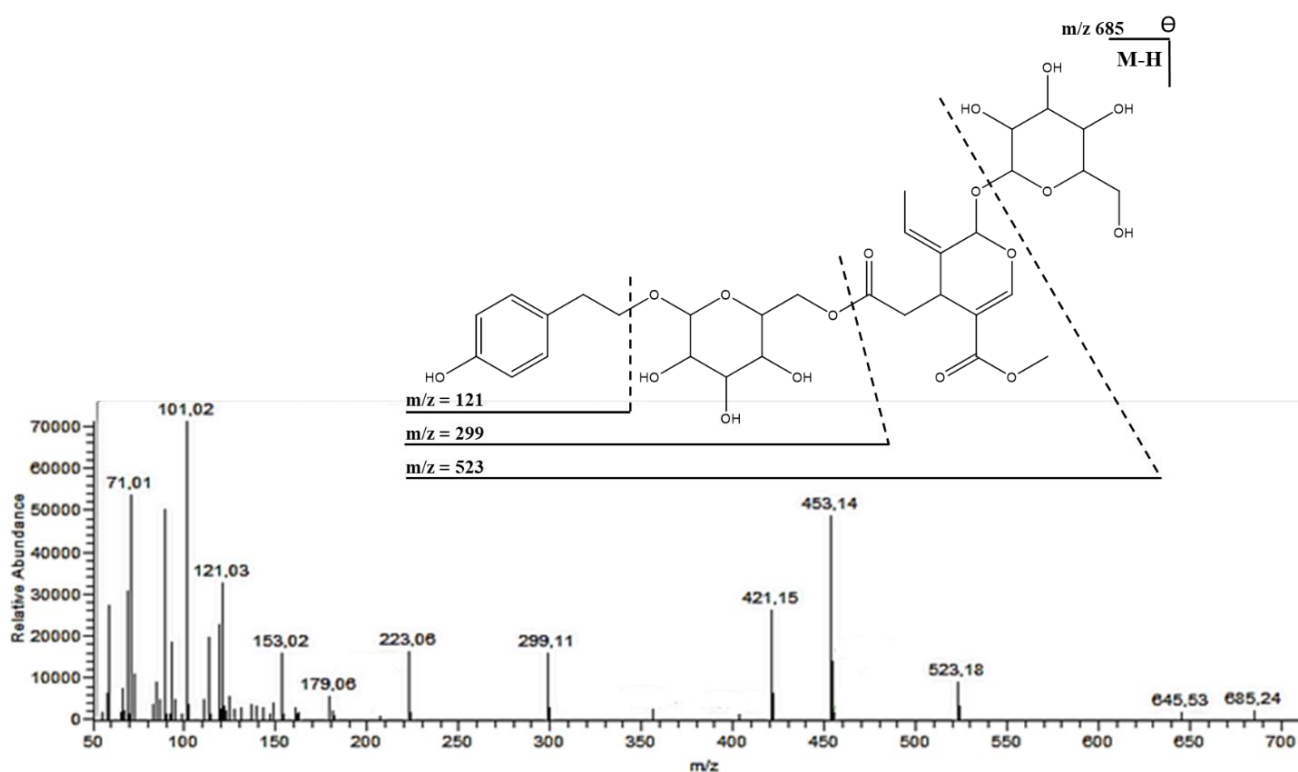


Figure 42 : spectre MS^2 et schéma de fragmentation du composé 50

- Identification du composé n°55 :

Le composé 50 à Tr = 7,13 min a présenté un ion moléculaire déprotoné à $m/z = 523,18$ et d'une formule moléculaire ($C_{25}H_{31}O_{12}$). Son spectre MS^2 (fig. 43), a donné un pic à $m/z = 121,03$ correspondant à l'ion fragment de tyrosol $-OH$. Un ion fragment à $m/z = 361,13$ attribué à la perte d'un hexose (-162). Ce composé a été identifié comme étant **le ligstroside** de la famille des iridoïdes [Michel *et al.*, 2015].

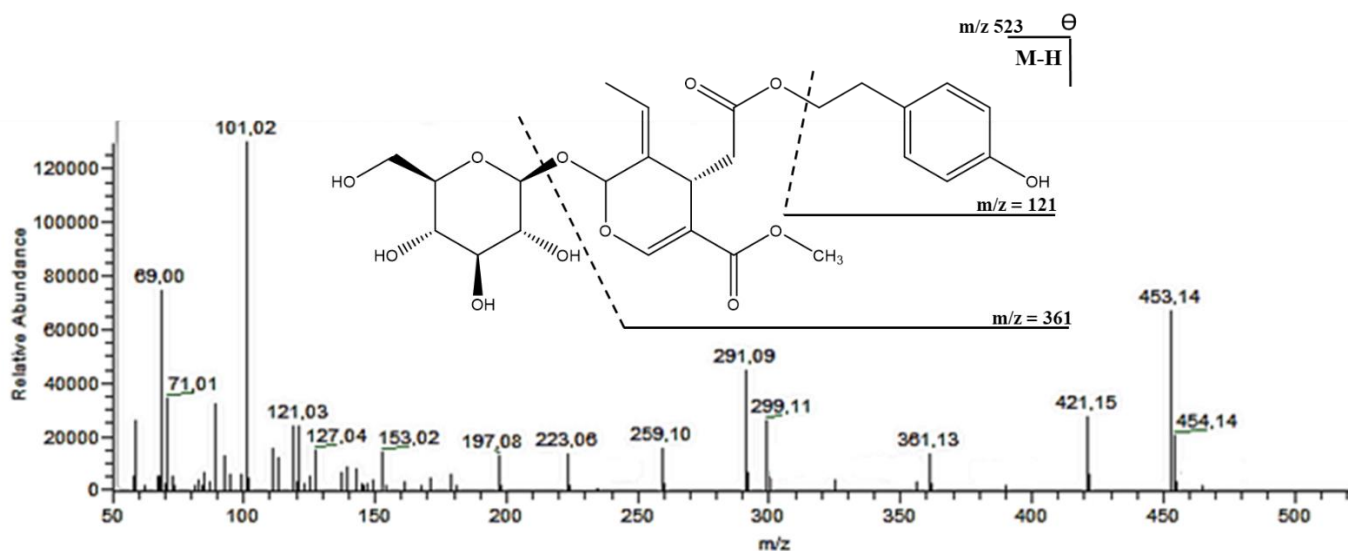


Figure 43 : spectre MS² et schéma de fragmentation du composé 55

IV. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique

Dans le but de caractériser les propriétés antioxydantes de l'extrait de grignons d'olive, l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de la poudre de grignons d'olive a été déterminée en utilisant l'activité antiradicalaire sur DPPH^{*}, la capacité antioxydante totale (CAT) et le pouvoir réducteur (FRAP).

1. Activité antiradicalaire (test de DPPH^{*})

L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de la poudre de grignons d'olive a été évaluée par la méthode de piégeage des radicaux DPPH^{*} (Beara et *al.*, 2014). Le diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) est largement utilisé pour évaluer rapidement la capacité des polyphénols à transférer des atomes d'hydrogène labiles vers des radicaux. La capacité totale de donneur d'atomes d'H (stœchiométrie, IC₅₀) a été déterminée. Cette valeur est relative à la concentration nécessaire de l'extrait pour inhiber 50% du radical libre DPPH (La faible valeur reflète l'importance de l'activité antiradicalaire). Cette valeur est déterminée à partir du graphe donnant la variation du pourcentage d'inhibition PI (%) en fonction de la concentration C (µg/mL) de la fraction brute.

L'activité de l'extrait a été comparée à celle de la vitamine C qui a été utilisée comme antioxydant de référence. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau 5** : l'activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique

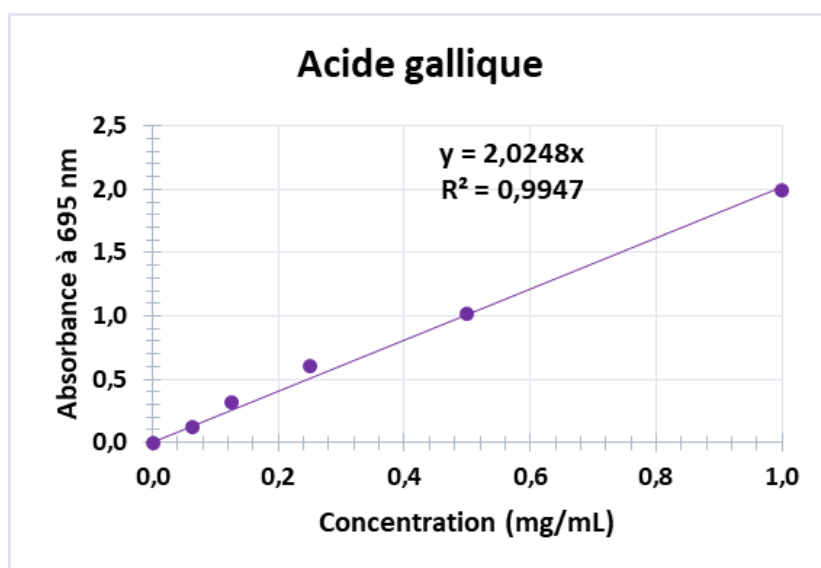
DPPH CI_{50} (mg/mL)	
Echantillon	CI_{50}
Extrait éthanolique	$0,022 \pm 0,002$
Vit C	$0,020 \pm 0,003$

Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique de grignons d'olive est doté d'une capacité inhibitrice comparable à celle de la vitamine C. Selon des travaux antérieurs, les composés chimiques qui sont généralement responsables de la réduction du radical DPPH sont des composés phénoliques [Yang *et al.*, 2018] ; ils ont la capacité de libérer un H[•] selon la nature, le nombre et la position des groupements hydroxyles du noyau aromatique [Shahat *et al.*, 2011].

2. La capacité anti-oxydante totale (CAT)

L'activité antioxydante totale de l'extrait éthanolique de grignons d'olive a été évaluée par la méthode spectrophotométrique qui est basée sur la détermination quantitative de la capacité antioxydante par la formation d'un complexe phosphomolybdique. Cette technique est basée sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) pour former un complexe vert de phosphate/Mo (V).

Les résultats sont obtenus à l'aide de la droite d'étalonnage de l'acide gallique ($y = 1,5438x$; $R^2 = 0,991$) et exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

**Figure 44** : droite de calibration de l'acide gallique

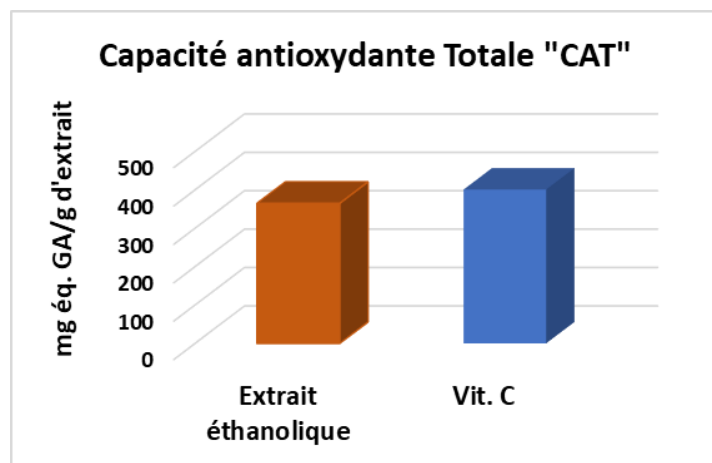


Figure 45 : diagramme de la capacité antioxydante totale de l'extrait éthanolique

Les résultats de l'activité antioxydante montrent que l'extrait éthanolique a une capacité antioxydante de 364,64 mg EAG/g ce qui est proche de celui de la vitamine C (400,75 mg EAG/g). Cette forte activité est expliquée par la richesse de l'extrait en composés bioactifs comme les flavonoïdes, les acides phénoliques, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et leurs dérivés [Hamden *et al.*, 2009].

3. Pouvoir réducteur FRAP

Ce test est basé sur la capacité des molécules présentes dans l'extrait à réduire le fer ferrique en fer ferreux. Les résultats sont présentés dans la figure 46.

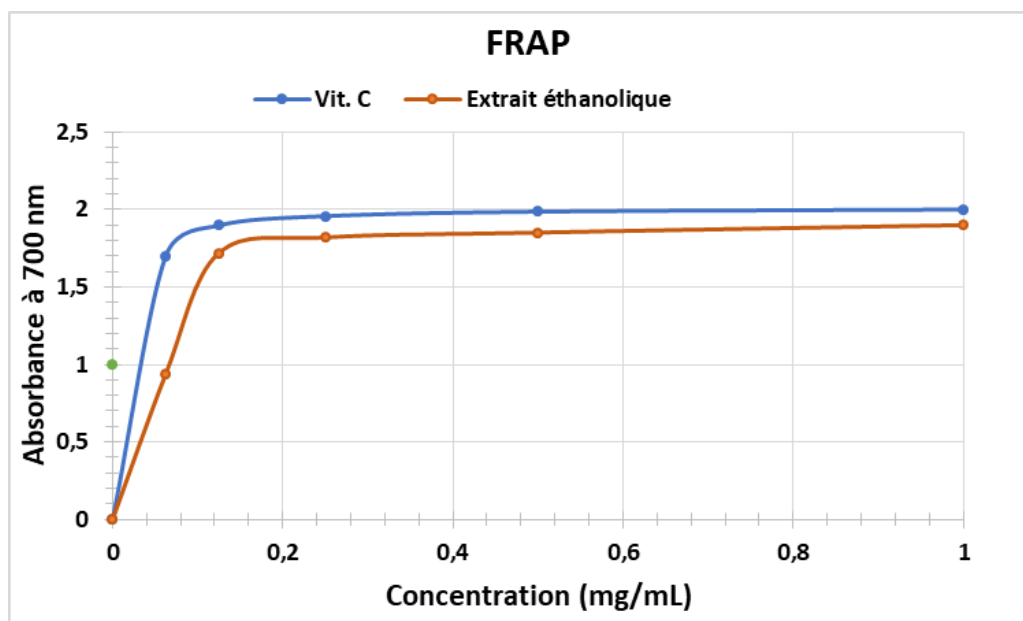


Figure 46 : présentation graphique du pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique

Les résultats obtenus sont en parfaite concordance avec les deux méthodes précédentes. D'après la figure, l'extrait éthanolique a une forte activité qui est proche de celle



de l'acide ascorbique (Vit. C). Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique par les trois méthodes corroborent bien avec l'analyse chimique de cet extrait qui a montré sa richesse en composés phénoliques. Des études antérieures ont montré que l'activité antiradicalaire des flavonoïdes dépend de la présence des structures flavonols ou d'un groupement libre d'hydroxyle à la position C₄' [Burda & Oleszek 2001]. La quercétine, la gallocatéchine, des flavonols identifiés dans notre extrait contribuent certainement à cette activité. Les activités antiradicalaire et antioxydante des acides phénoliques varient d'un composé à un autre en fonction de la position des groupements hydroxyles portés sur le même noyau aromatique [Sroka & Cisowski 2003]. En effet, les composés qui ont deux groupements hydroxyles liés à un noyau aromatique en ortho (noyau catéchol) qui est l'élément déterminant de la réactivité des composés phénoliques. L'hydroxytyrosol est considéré le marqueur des molécules aux propriétés antioxydantes de l'olive. L'acide caféique et ses dérivés avec leurs deux groupements hydroxyles en ortho contribuent aussi à une activité plus importante que d'autres acides phénoliques comme l'acide *p*-coumarique qui a un seul groupement hydroxyle ou les acides férulique et vanilique qui présentent une ramification au niveau du deuxième groupement hydroxyle. Certains composés de la famille des secoiridoïdes présentent aussi un pouvoir antioxydant surtout les secoiridoïdes glucosides [Li *et al.*, 2007].

V. Activité Antidiabétique de l'extrait éthanolique

1. Activité *in-vitro*

Dans cette partie, on s'est intéressé à l'activité inhibitrice des enzymes α -amylase et lipase par l'extrait éthanolique de grignons d'olive. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 6 sous forme de CI₅₀ comparées à celles de témoins positifs : Acarbose (inhibiteur de l' α -amylase) et l'Atorvastatine (inhibiteur de la lipase).

Tableau 6 : activité d'inhibition de la lipase et d' α -amylase par l'extrait éthanolique

	CI ₅₀ (mg/mL)	
	α -amylase	Lipase
Extrait	1,05 ± 0,10	2,97 ± 0,13
Standard acarbose	0,39 ± 0,07	
Standard atorvastatine		1,10 ± 0,10

Le tableau 6 montre que l'extrait éthanolique de grignons d'olive présente une capacité d'inhibition intéressante de l' α -amylase et de la lipase avec CI₅₀ = 1,05 mg/mL et



2,97 mg/mL respectivement. Cette activité d'inhibition de ces deux enzymes est expliquée par la présence d'une variété de composés phénoliques bioactifs dans l'échantillon analysé. Ces résultats corrélerent bien avec ceux décrits dans la littérature sur la capacité inhibitrice du grignon d'olive contre l' α -amylase et la lipase qui est parfaitement liée aux teneurs en composés phénoliques [Sylla *et al.*, 2021 ; Hamden *et al.*, 2009]. Plusieurs composés phénoliques ont été rapportés comme des agents antidiabétiques potentiels grâce à leur pouvoir inhibiteur de l'enzyme α -amylase.

2. Activité *in-vivo*

Cette étude est menée sur des rats diabétiques de type Wistar de poids corporel variant entre 180 à 200 g. Les rats sont répartis en trois groupes : un groupe de rats diabétiques dont la nourriture a été supplémentée avec l'extrait éthanolique, un groupe de rats diabétiques et un groupe de rats non diabétiques nourris sans supplémentation pour évaluer l'effet de l'extrait de grignons sur l'activité de l' α -amylase. Tous les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : activités de l'enzyme α -amylase intestinale, pancréatique et sérique et le taux du glucose sérique chez des rats Wistar traités avec l'extrait éthanolique de grignons d'olive

	Rats non diabétiques	Rats diabétiques	Rats diabétiques + Extrait éthanolique
Activité de l' α -amylase intestinale (U/mg protéine)	5,10 \pm 0,70	13,10 \pm 1,20	7,13 \pm 0,70
Activité de l' α -amylase pancréatique (U/mg protéine)	11,30 \pm 1,30	21,10 \pm 1,60	12,70 \pm 1,10
Activité de l' α -amylase sérique (U/mL)	787 \pm 81	1978 \pm 113	1154 \pm 87
Taux du glucose sérique (g/l)	0,97 \pm 0,12	2,13 \pm 0,18	1,37 \pm 0,17

L'étude *in vivo*, chez les rats diabétiques, a montré que la supplémentation en extrait éthanolique de grignons d'olive à une dose de 100 mg/kg/jour a inhibé l'activité de l' α -amylase intestinale et pancréatique de 45 % et 40 % respectivement (tableau 7) par comparaison aux rats diabétiques non traités. De plus, l'activité de l' α -amylase sérique a montré aussi une diminution de 42 %. Par conséquent, le taux de glucose sérique est diminué de 36 %. Ces résultats confirment bien l'activité inhibitrice de l'extrait éthanolique établie au cours de l'étude *in-vitro*.



Diverses études ont montré que les extraits naturels contenant des polyphénols sont des extraits également dotés d'activités anti-obésité et antidiabétique par leur pouvoir d'inhibition de la lipase et l' α -amylase respectivement [Yajima *et al.*, 2005 ; Lei *et al.*, 2007]. De ce fait, l'effet thérapeutique de l'extrait éthanolique de grignons d'olive contre le diabète est lié à sa forte teneur en composés phénoliques ainsi qu'à la présence de certains composés spécifiques qui ont été approuvés pour leur effet antidiabétique dans plusieurs travaux antérieurs.

Les flavonoïdes sont des composés potentiellement hypoglycémiant de par leur action inhibitrice de la glucosidase (Fontana *et al.*, 2011 et Jakobs *et al.*, 2005). Ils ont été approuvés aussi pour leur pouvoir antidiabétique par Savych *et al.*, 2021. Gorbani (2017) a étudié l'activité anti-hyper-glycémique de la rutine et discuté son effet protecteur contre le développement des complications diabétiques. Il a proposé les mécanismes d'action de ce flavonoïde pour l'inhibition de l'absorption des carbohydrates par l'intestin grêle ainsi que l'inhibition de la gluconéogenèse.

Des études antérieures réalisées par Jemai *et al.*, (2009) indiquent également que l'oleuropéine a le pouvoir de diminuer les taux de cholestérol total chez les rats diabétiques et d'aider le corps à sécréter plus d'insuline et ainsi contribuer à prévenir l'apparition du diabète de type 2.

L'hydroxytyrosol, qui est un produit de l'hydrolyse de l'oleuropéine, est un composé phénolique en quantité remarquable dans le grignon d'olive. Il a été approuvé par plusieurs études pour ses activités biologiques à savoir l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, anti-cancérogène et bien évidemment antidiabétique [Hamden *et al.*, 2010 ; Vlavycheski *et al.*, 2019]. Les résultats de Jemai *et al.*, 2009, ont suggéré que l'effet antidiabétique de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol pourrait être dû à leur activités antioxydantes limitant le stress oxydatif qui est largement associé à la pathologie du diabète et d'autres complications.

VI. **Activité Analgésique de l'extrait éthanolique**

Les résultats de l'activité analgésique de l'extrait éthanolique de grignons d'olive sont présentés dans le tableau 8.

**Tableau 8** : activité analgésique de l'extrait éthanolique chez les souris albinos suisses

Groupes	Concentrations (mg/kg)	Nombre Des crampes	% d'inhibition des crampes
Control négatif	-	75 ± 7,1	-
Extrait éthanolique	50	35,7 ± 2,1	52,40 %
Standard (Aspégic)	50	37,7 ± 3,1	49,73 %

Par comparaison au standard « Aspégic », les résultats de l'administration de l'extrait éthanolique aux souris testés montrent que l'extrait de grignons d'olive à une concentration de 50 mg/kg inhibe un nombre de crampes de 35 à 75 avec un pourcentage d'inhibition de 52,4%, qui est plus grand que celui du standard avec un taux d'inhibition de 49,7% et par suite une meilleure activité anti-inflammatoire.

Plusieurs études menées sur l'activité analgésique des flavonoïdes ont montré l'efficacité de certains composés de cette famille pour leur effet calmant et apaisant [Xiao *et al.*, 2016]. Certains de ces composés ont été identifiés dans notre extrait éthanolique comme la quercétine [Rylski *et al.*, 1979], la rutine [Lapa *et al.*, 2009], la lutéoline [Liu *et al.*, 2010] et l'apigénine [Kumar *et al.*, 2008]. Ces composés ont été approuvés pour leur efficacité en tant qu'analgésiques périphériques. Dans une autre étude portée par Picq *et al.*, 1991, la quercétine a montré un effet sédatif sur le système nerveux central chez les souris.

Certains acides phénoliques ont montré aussi un pouvoir analgésique, parmi eux on peut citer par exemple l'acide vanilique qui a montré dans une étude portée par Yao *et al.*, 2016 une capacité à inhiber l'activité des canaux de sodium résistants et ceux sensibles à la tétradotoxine.

VII. Conclusion

L'analyse par LC-MS de l'extrait éthanolique de grignons d'olive a permis l'identification de composés phénoliques de différentes classes dont, des phénols simples, des flavonoïdes, des acides phénoliques et des sécoiridoïdes. Les résultats ont montré que les composés majoritaires dans cet extrait sont l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique, l'oléoside, la lutéoline, l'oleuropéine aglycone et l'acide quinique.

L'évaluation de certaines activités biologiques de l'extrait éthanolique a montré qu'il est doté d'une forte activité antioxydante comparable à celle de la vitamine C, un pouvoir antidiabétique intéressant qui a été évalué par la capacité de l'extrait à inhiber les enzymes α -



amylase et lipase *in-vitro* puis *in-vivo*. L'extrait a montré aussi une capacité analgésique remarquable par son aptitude à inhiber 52% du nombre total de crampes chez les souris.

Ces activités sont fortement liées à la richesse de l'extrait éthanolique en composés phénoliques, dont certains composés sont responsables de l'activité antidiabétique comme l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine et la rutine ; et d'autres qui confèrent le pouvoir analgésique citons la quercétine, la lutéoline, l'apigénine et l'acide vanilique.

La richesse des grignons d'olive en composés phénoliques dotés d'activités biologiques intéressantes nous a encouragé à la recherche d'une procédure adéquate pour optimiser l'extraction de ces biomolécules d'origine naturelle qui pourraient être utilisées par la suite dans des préparations alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Le développement de cette perspective est détaillé dans la partie B de ce manuscrit.



B. OPTIMISATION DE L'ECO-EXTRACTION DE BIOMOLECULES A HAUTE VALEUR AJOUTEE A PARTIR DE GRIGNONS

La valorisation des déchets de l'industrie oléicole devient de plus en plus investiguée dans les différents pays producteurs d'huile d'olive pour deux raisons majeures, l'une est basée sur l'intérêt de protéger l'environnement des impacts néfastes causés par les déchets oléicoles et l'autre est basée sur la richesse de ces coproduits en composés phénoliques d'un grand intérêt dans les industries alimentaires et cosmétiques. Au vue la forte demande portée par les industries sur l'extraction de ces composés à partir des grignons d'olive et dans le but de présenter une méthode d'extraction eco-responsable, cette partie de thèse a été focalisée sur l'optimisation de l'extraction à l'aide d'un solvant vert « l'éthanol » et sur l'intensification du procédé par des techniques innovantes et en accord avec l'environnement. Le protocole global de ce chapitre est présenté dans la figure 47.

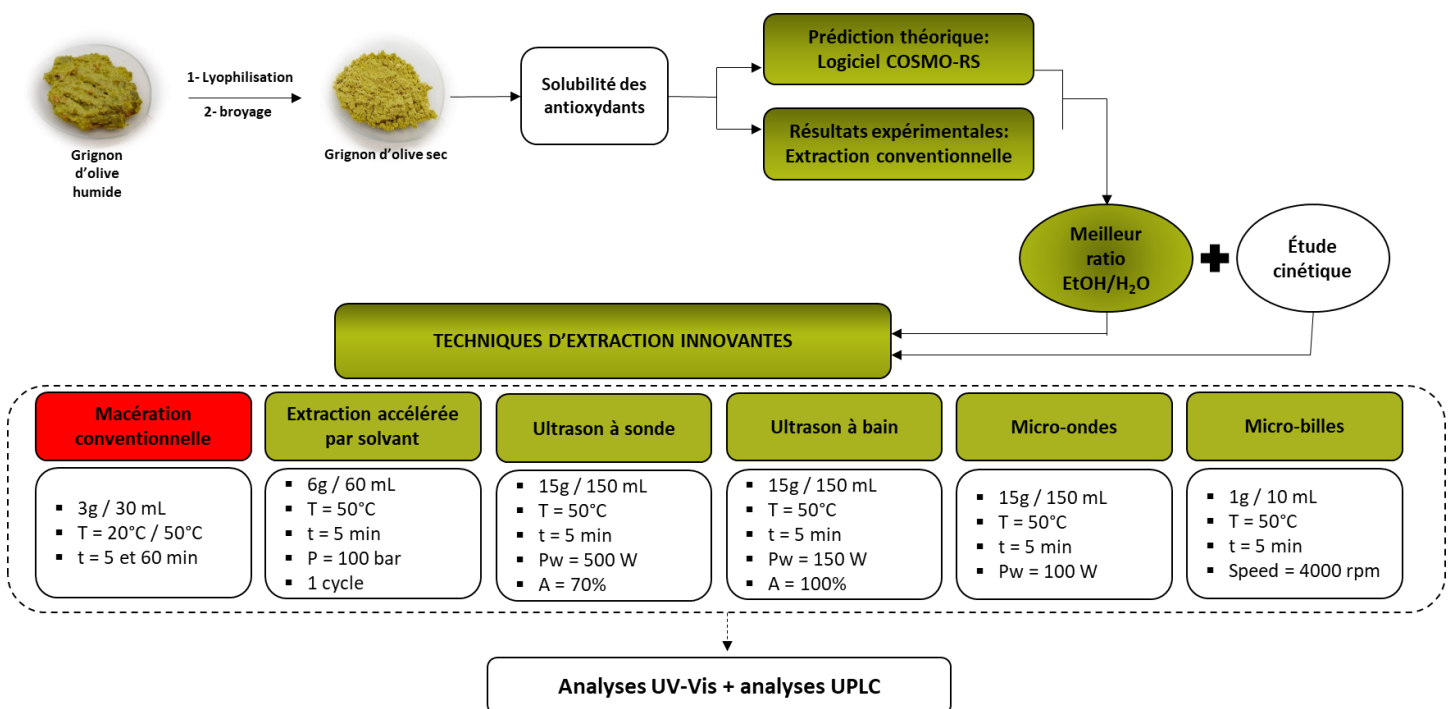


Figure 47 : protocole global d'optimisation de l'éco-extraction de grignons d'olive



I. Prédiction théorique du meilleur ratio éthanol-eau pour l'extraction des polyphénols

1. Etape de pré-prédiction

La prédiction théorique de la solubilité des composés phénoliques dans le mélange de solvant est assurée par le logiciel COSMO-RS par deux types de calculs consécutifs qui sont : le calcul quantique et le calcul thermodynamique. L'étape de calcul quantique nécessite une durée de temps plus ou moins importante pour cibler les molécules insérées dans le logiciel. Cette durée de temps est proportionnelle à la taille de ces molécules. Plus la molécule est de masse moléculaire importante, plus le calcul dure longtemps (de quelques minutes jusqu'à quelques heures).

Pour être efficace il est nécessaire de bien choisir les solutés à étudier en se focalisant sur les composés phénoliques majoritaires du grignon d'olive. Après avoir défini une liste de composés phénoliques, on doit chercher le « code smiles » de chaque composé dans la base de données ChemSpider (propriété de la Royal Society of Chemistry (RSC)). Chaque soluté ou solvant est inséré dans le logiciel COSMO-RS par son code smiles.

Exemples :

- **code smiles de tyrosol** : c1cc(ccc1CCO)O
- **code smiles de l'hydroxytyrosol** : c1cc(c(cc1CCO)O)O
- **code smiles de l'acide caféique** : c1cc(c(cc1/C=C/C(=O)O)O)O
- **code smiles de l'acide *p*-coumarique** : c1cc(ccc1/C=C/C(=O)O)O

2. Etape de prédiction

Le calcul quantique est une étape primordiale et essentielle pour créer la base de données des fichiers COSMO. Cette base de données est formée par les molécules ciblées c.à.d. des molécules qui représentent la répartition de charge de criblage sur leurs surfaces moléculaires appelées σ -surfaces (fig. 48).

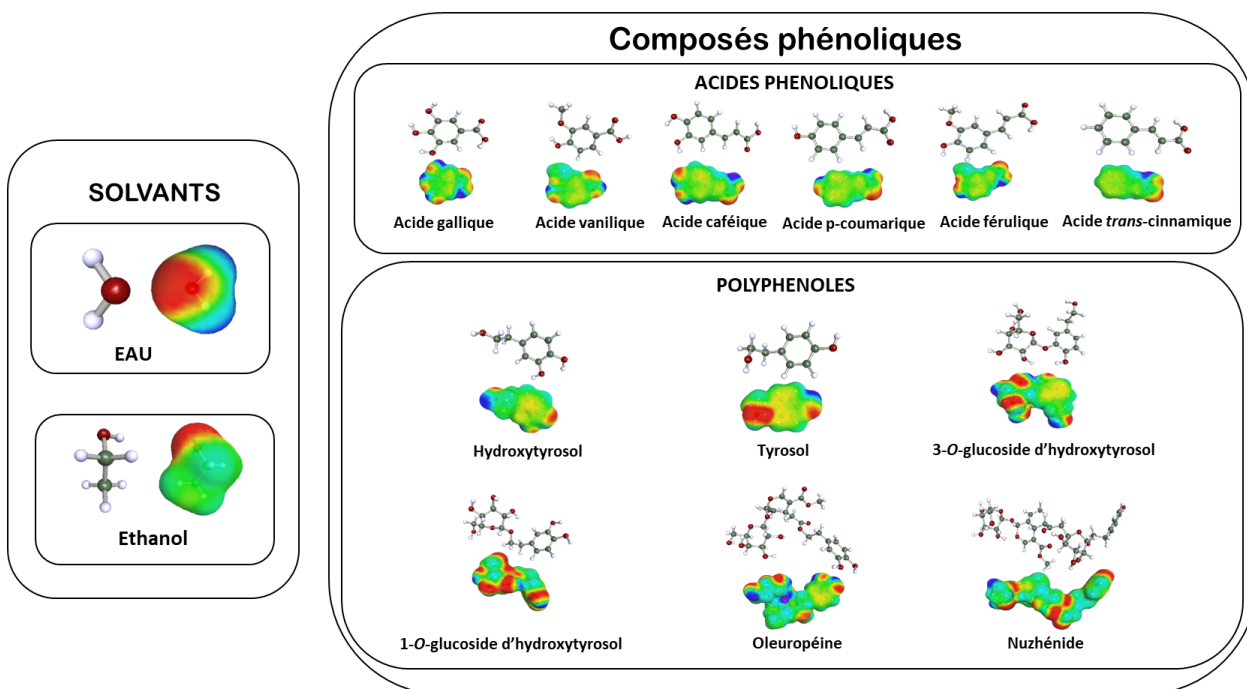


Figure 48 : structures moléculaires et σ -surfaces des solvants et différents solutés étudiés

A partir de ces σ -surfaces, on peut avoir le σ -profil des solutés en solution. Le σ -profil est le premier résultat fourni par le logiciel concernant la polarité de chaque composé et son affinité vis-à-vis du solvant. En effet, à partir de graphe de σ -profil on peut distinguer les molécules polaires et les molécules de caractère hydrophobe, ainsi, on peut différencier le caractère donneur ou accepteur d'hydrogène de chaque molécule.

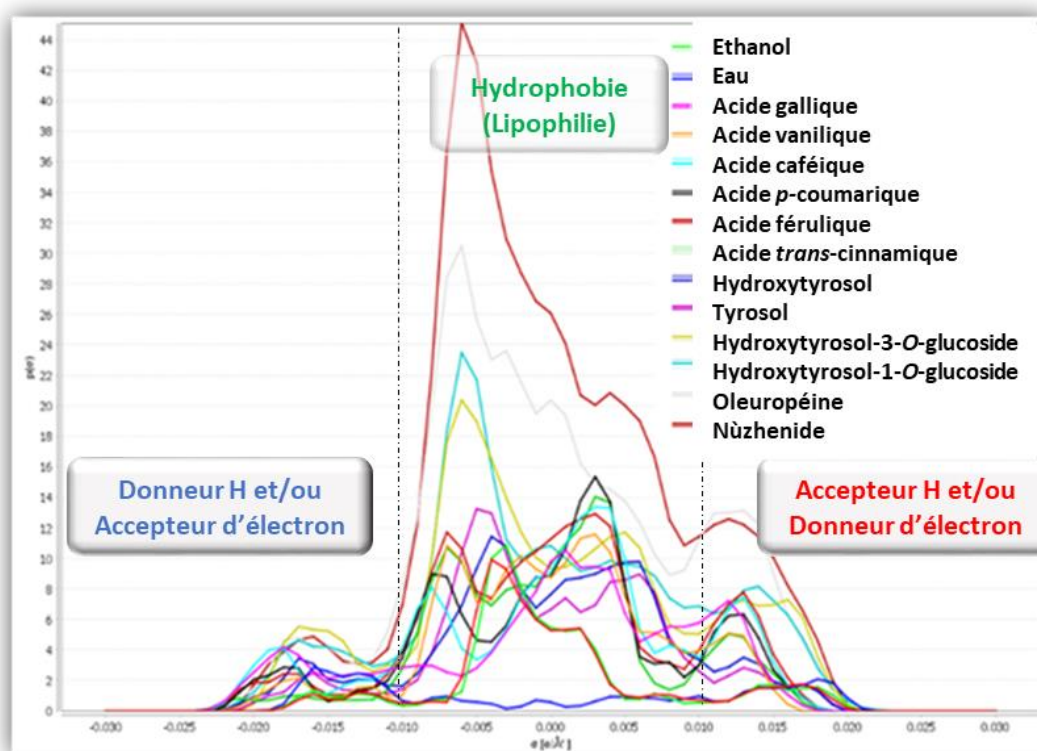


Figure 49 : représentation graphique du σ -profil des solutés et du solvant étudiés



La partie qui est entre $-0,01$ et $0,01$ ($e.\text{\AA}^{-2}$) est la partie qui représente le segment hydrophobe de chaque molécule. On remarque que plus la chaîne ou la structure moléculaire d'une molécule est importante plus le pic de son graphe σ -profile est intense. Dans notre étude les molécules les plus volumineuses sont celles de nùzhenide suivie par l'oleuropéine qui présentent les pics les plus intenses dans le graphe de σ -profile. La seule molécule qui n'a pas de pic dans cette partie est la molécule d'eau.

Un zoom sur le σ -profile de l'eau présente un pic dans la partie donneur d'hydrogène et un autre pic dans la partie accepteur. Il en est de même pour l'éthanol qui présente deux pics l'un vers la partie « donneur » et l'autre vers la partie « accepteur » d'H ce qui rend ces deux solvants miscibles, sauf que l'éthanol a un pic vers le milieu du σ -profile qui représente la partie hydrophobe de la molécule.

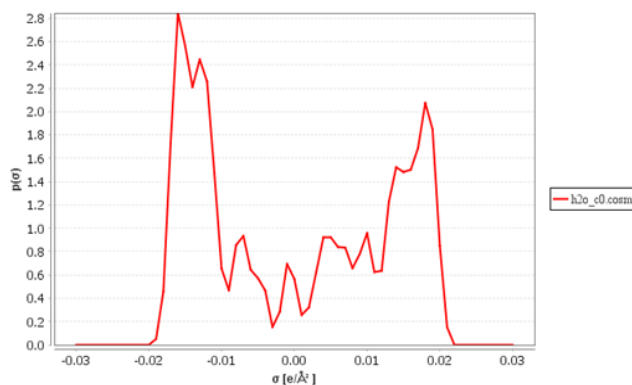


Figure 50 : σ -profile de la molécule H₂O

A partir de la figure 49 on peut remarquer que presque tous les composés ont des pics vers les trois parties du graphe de σ -profile mais de façon différente et inégale.

En deuxième étape, et après la formation de la base de données du fichier COSMO, le logiciel peut faire les calculs statistiques thermodynamiques afin de créer le σ -potentiel du mélange pour prédire finalement les données d'équilibre. Le potentiel chimique est une estimation de l'affinité d'une molécule dans un solvant. Il décrit aussi le caractère donneur /accepteur d'électrons et le caractère donneur d'hydrogène de chaque molécule.

On peut considérer que les deux graphes σ -profile et σ -potentiel sont complémentaires. En effet, les résultats fournis par le graphe σ -potentiel confirment bien les résultats de σ -profile. Comme il est montré dans le σ -profile, la molécule d'eau n'est pas dotée d'un caractère lipophile alors que toutes les autres molécules présentent une certaine hydrophobie. La différence créée entre la courbe de l'eau et celles des autres molécules, confirme la présence du caractère hydrophobe des composés phénoliques. Le graphe de σ -potentiel montre aussi que tous les composés étudiés sont des donneurs d'électrons et d'hydrogène.

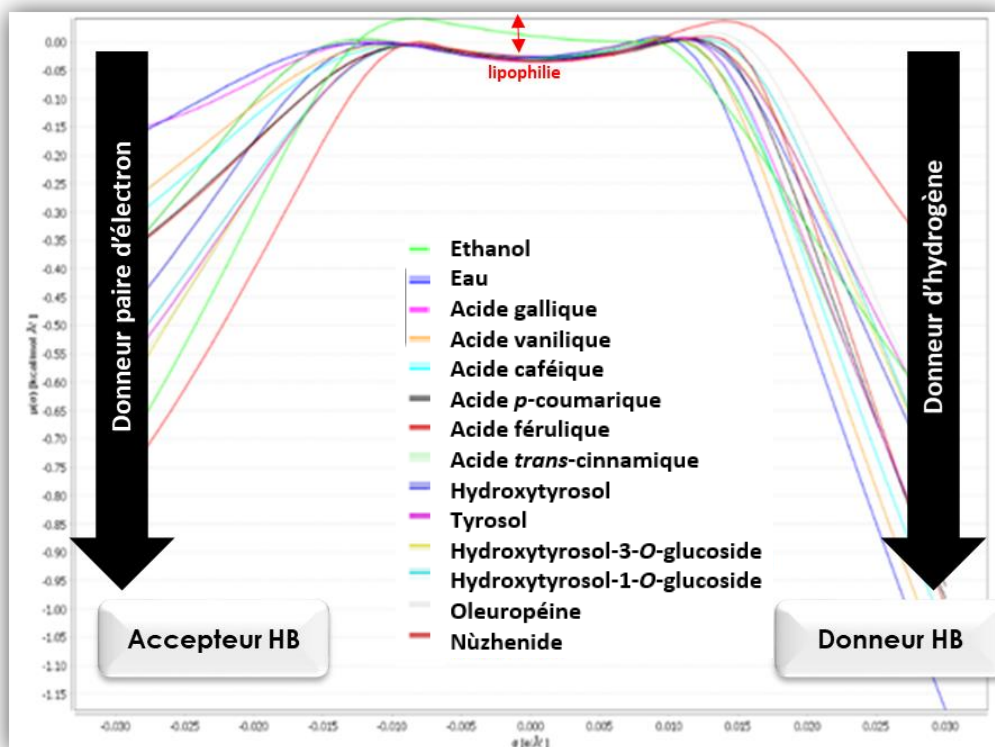


Figure 51 : représentation graphique du σ -potentiel des solutés et des solvants étudiés

Par la suite, on doit fixer dans le logiciel COSMO-RS les différents paramètres expérimentaux à savoir : (masse, température, type de soluté « solides »...) et préciser le mélange de solvant et le ratio envisagé, ainsi que les solutés. De cette façon, la solubilité relative de chaque composé d'intérêt dans le solvant est calculée. La solubilité relative de chaque soluté en solution est donnée sous forme d'un tableau des valeurs logarithmiques ($\log_{10}(x_{RS})$) allant de 0 jusqu'à -10.

Les figures 52a (à 20°C) et 52b (à 50°C) présentent les valeurs de la solubilité relative des composés phénoliques étudiés dans les différents ratios d'éthanol/eau. Les différentes couleurs présentées dans la figure 52 donnent une idée sur les résultats de la solubilité relative de chaque soluté en solution. En effet, la couleur verte représente un indice de solubilité relativement élevé (entre 0 et -1), la couleur jaune est relative à un indice de solubilité moyen (entre -1 et -4), et la couleur rouge signifie une solubilité médiocre même absente du soluté étudié dans le solvant (> -4).

En comparant les deux figures a et b, on peut remarquer que l'indice de solubilité de tous les composés phénoliques étudiés est influencé par l'augmentation de la température d'une façon positive. En effet, la plage des valeurs en vert comprend la plage de valeurs de 40:60 EtOH/H₂O (fig. 52a) à 20°C, à 30:70 EtOH/H₂O à 50°C (fig. 52b). D'après la figure 52, le meilleur solvant d'extraction pour la majorité des composés phénoliques semble être 100% EtOH. Ce solvant est pris par le logiciel COSMO comme une référence, sur laquelle se



base toutes les autres prédictions de solubilité. Par conséquent, on peut prendre le seuil de ce modèle de prédiction entre 50:50 et 70:30 EtOH/H₂O.

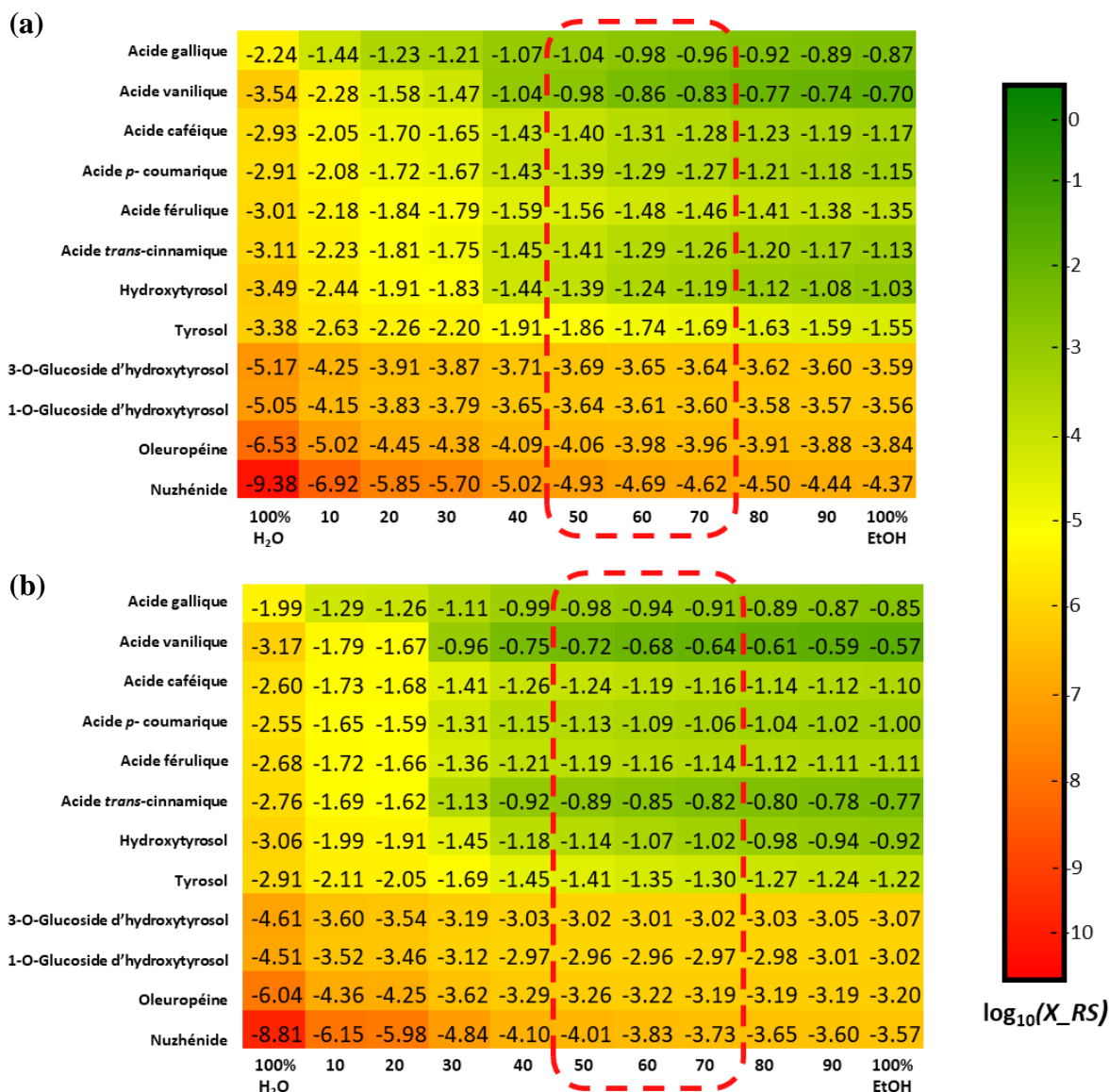


Figure 52 : prédiction de la solubilité par le COSMO-RS à 20°C (a) et à 50°C (b) avec les différents ratios EtOH/H₂O.

Couleur verte : forte probabilité de solubilité ($\geq 60\%$). Couleur jaune : moyenne probabilité de solubilité (20%-60%). Couleur rouge : faible probabilité de solubilité ($< 20\%$).

On peut remarquer que les 6 acides phénoliques ainsi que le 3-hydroxytyrosol et le tyrosol ont un indice de solubilité élevé pour le ratio 50:50 EtOH/H₂O pour les deux températures. L'indice de solubilité est aussi élevé pour l'acide gallique à des ratios de 40:60, 30:70 et 20:80 EtOH/H₂O, l'acide vanilique et l'acide *trans*-cinnamique à des ratios de 40:60 et 30:70 EtOH/H₂O. Par contre, les deux formes glycosidiques de l'hydroxytyrosol présentent un indice de solubilité moyen dans le solvant de référence et il décroît dans le système pour



avoir une faible solubilité à 100% H₂O. Les plus faibles indices de solubilité sont observés pour le nuzhénide suivie par l'oleuropéine qui présente une solubilité moyenne même à 100% EtOH et presque nulle vers 100% H₂O.

Pour conclure, la prédiction théorique est une étape importante pour bien clarifier et mettre au point l'étape de l'extraction, ainsi que pour réduire le nombre des manipulations et par conséquent limiter le volume de solvant, la quantité d'énergie et la durée de cette étape. D'après les résultats obtenus, on peut retenir que les meilleurs ratios sont ceux de 50:50 à 70:30 EtOH/H₂O à une température de 50°C. Pour confirmer et valider cette prédiction, les extractions ont été menées.

II. Optimisation du temps d'extraction : Etude cinétique

Le temps d'extraction est un facteur très important pour avoir un rendement optimal sans altération des molécules sensibles avec une utilisation de l'énergie consommée optimisée. Pour ce faire, dans un premier temps une étude cinétique de l'extraction des composés phénoliques de grignons par une méthode conventionnelle, la macération a été menée.

Des extractions par macération de 3 heures ont été mises en œuvre à l'aide d'un solvant hydro alcoolique EtOH/H₂O 60:40 à deux températures différentes 20°C et 50°C, 7 prélèvements ont été effectués au cours du temps. L'étude est portée sur la comparaison entre la teneur en phénols totaux des différentes prises d'essais au cours du temps par la méthode de Folin Ciocalteu. Les résultats sont donnés en mg équivalent tyrosol par g de grignons d'olive secs. Le suivi a également été réalisé par UPLC/DAD pour les quatre composés phénoliques quantitativement majoritaires.

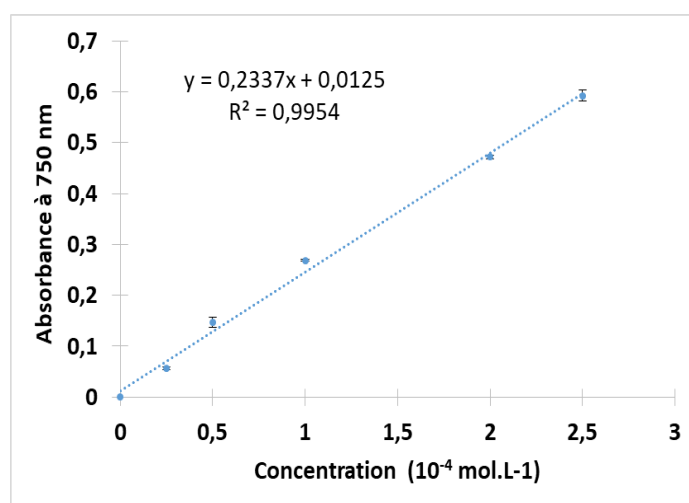


Figure 53 : droite d'étalonnage de tyrosol



Tableau 9 : suivi cinétique de l'extraction des phénols totaux à 20°C et à 50°C par la méthode de Folin Ciocalteu

Température	20°C	50°C
Temps (min)	R (mg/g)	R (mg/g)
10	3,36 ± 0,14	4,37 ± 0,17
20	3,68 ± 0,06	4,90 ± 0,31
30	3,69 ± 0,07	5,18 ± 0,15
60	3,70 ± 0,07	5,17 ± 0,07
120	3,73 ± 0,06	5,12 ± 0,31
180	3,87 ± 0,07	5,26 ± 0,13

La figure 54 montre que l'augmentation de la température améliore les rendements d'extraction ce qui confirme la prédiction théorique du COSMO-RS. En effet, les rendements optimaux obtenus sont de $3,75 \pm 0,07$ mg TE/g DOP à 20°C et de $4,76 \pm 0,13$ mg TE/g DOP à 50°C après 20 minutes de macération.

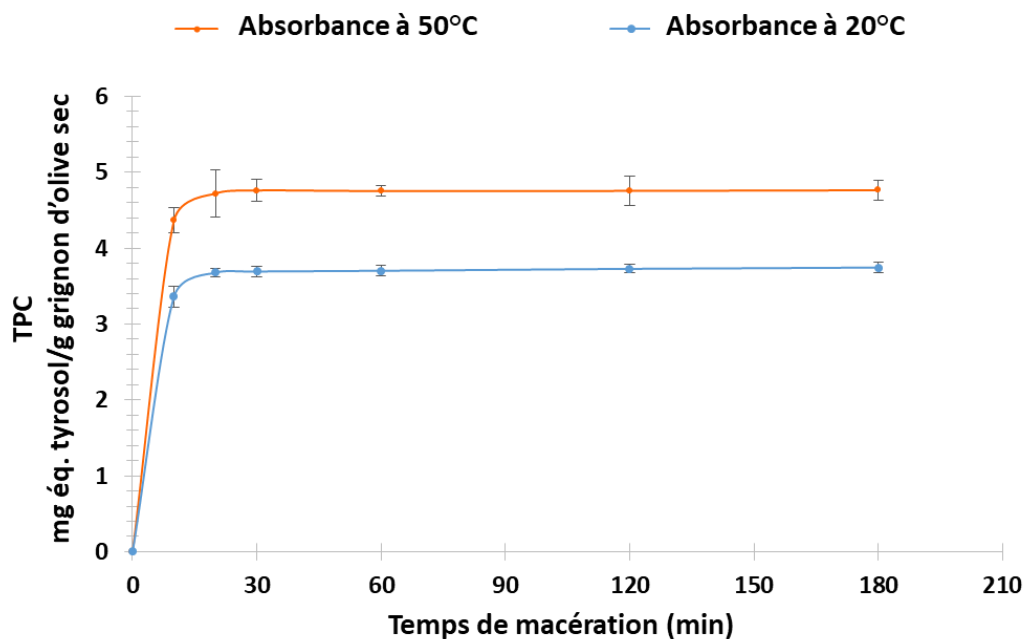


Figure 54 : cinétique d'extraction des grignons d'olive secs à 20°C et à 50°C

Les résultats obtenus par les analyses UPLC sont en corrélation avec ceux obtenus par le test de Folin Ciocalteu pour les 4 composés phénoliques quantifiés : les rendements les plus élevés sont obtenus à 50°C. Les figures 56a et 56b montrent que la concentration la plus élevée est obtenue pour le 3-hydroxytyrosol avec $(39,0 \pm 1,9) \cdot 10^{-2}$ et $(57,6 \pm 1,2) \cdot 10^{-2}$ mg HT/g DOP à 20°C et à 50°C respectivement, suivi par le tyrosol avec $(23,4 \pm 1,0) \cdot 10^{-2}$ et $(27,9 \pm 0,7) \cdot 10^{-2}$ mg TY/g DOP à 20°C et à 50°C respectivement. On trouve par la suite l'acide *p*-coumarique avec $(20,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-2}$ et $(23,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-2}$ mg *p*-CA/g DOP à 20°C et à 50°C



respectivement et finalement l'acide caféique avec $(16,3 \pm 0,5) 10^{-2}$ mg CA/g DOP aux deux températures (fig. 56).

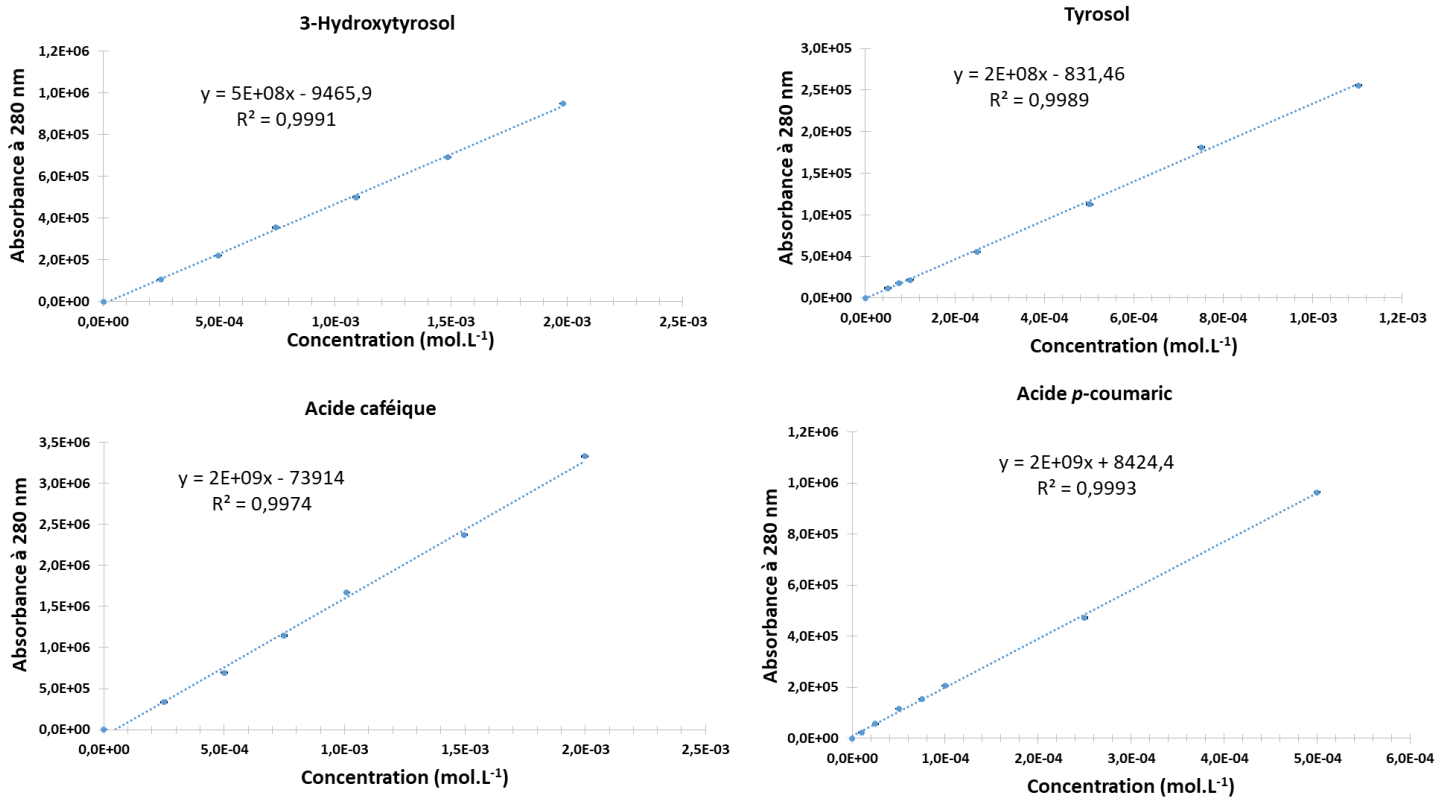


Figure 55 : les droites d'étalonnage des 4 étalons utilisés en UPLC

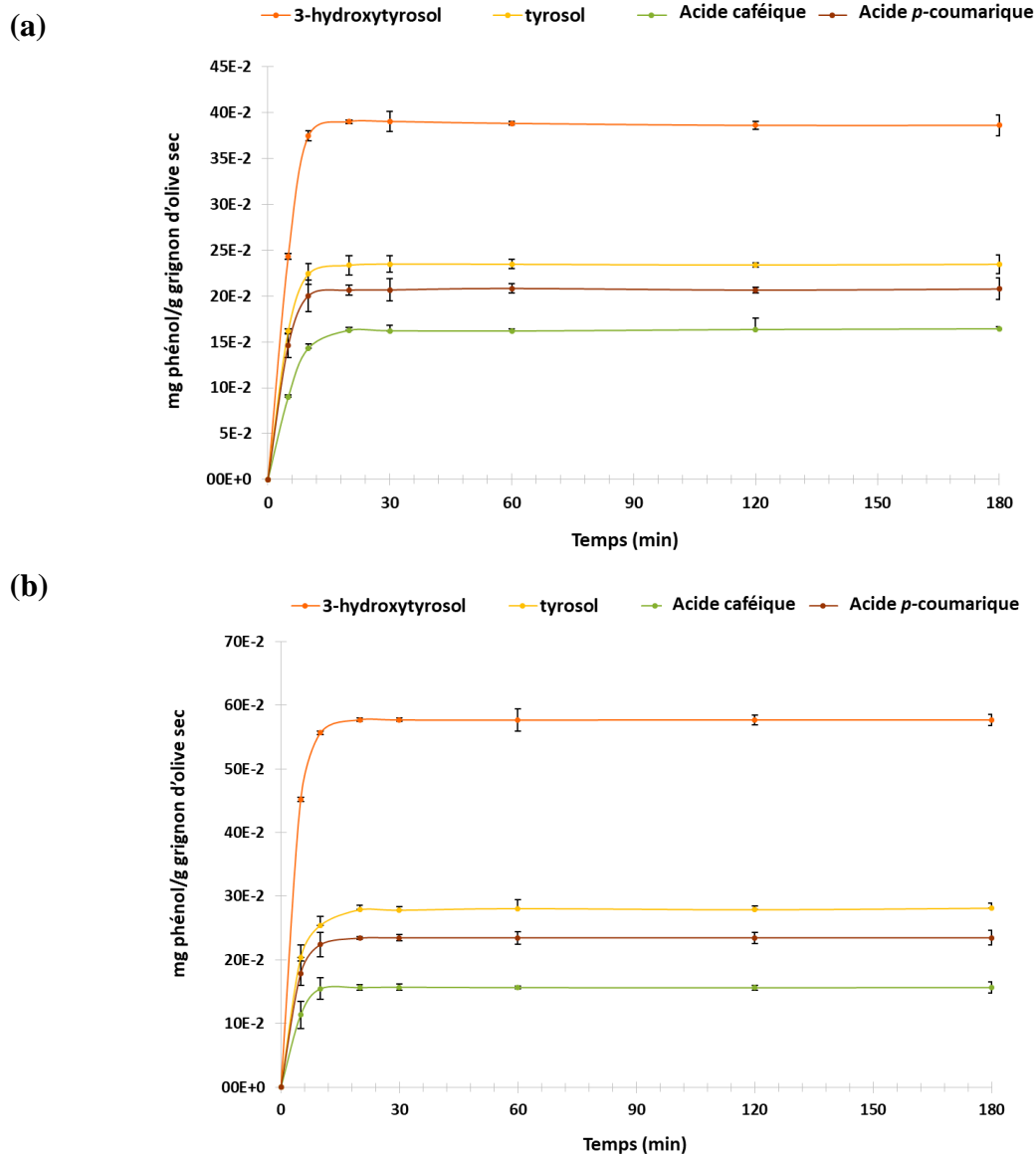
Tableau 10 : suivi cinétique de l'extraction des phénols totaux à 20°C par la méthode d'UPLC

Temps (min)	3-hydroxytyrosol (10^{-2} mg/g DOP*)	Tyrosol (10^{-2} mg/g DOP*)	acide caféique (10^{-2} mg/g DOP*)	acide p-coumarique (10^{-2} mg/g DOP*)
5	$24,3 \pm 0,3$	$16,2 \pm 0,3$	$09,0 \pm 0,2$	$14,6 \pm 1,3$
10	$37,5 \pm 0,5$	$22,4 \pm 1,1$	$14,3 \pm 0,4$	$20,1 \pm 1,7$
20	$39,0 \pm 1,9$	$23,4 \pm 1,0$	$16,3 \pm 0,3$	$20,6 \pm 0,5$
30	$39,0 \pm 1,1$	$23,5 \pm 0,9$	$16,2 \pm 0,5$	$20,7 \pm 1,2$
60	$38,8 \pm 1,9$	$23,5 \pm 0,5$	$16,2 \pm 0,3$	$20,8 \pm 0,5$
120	$38,6 \pm 0,5$	$23,4 \pm 0,2$	$16,4 \pm 1,2$	$20,7 \pm 0,3$
180	$38,6 \pm 1,1$	$23,5 \pm 1,0$	$16,4 \pm 1,8$	$20,8 \pm 1,2$

DOP: Grignons d'olive secs (Dried Olive Pomace)

**Tableau 11** : suivi cinétique de l'extraction des phénols totaux à 50°C par la méthode d'UPLC

Temps (min)	3-hydroxytyrosol (10 ⁻² mg/g DOP*)	Tyrosol (10 ⁻² mg/g DOP*)	acide caféique (10 ⁻² mg/g DOP*)	acide <i>p</i> -coumarique (10 ⁻² mg/g DOP*)
5	45,2 ± 0,3	20,3 ± 1,9	11,4 ± 2,1	17,9 ± 2,0
10	55,7 ± 0,3	25,4 ± 1,4	15,5 ± 1,7	22,4 ± 1,9
20	57,7 ± 0,3	27,9 ± 0,7	15,6 ± 0,4	23,5 ± 0,3
30	57,8 ± 0,2	27,8 ± 0,6	15,7 ± 0,5	23,5 ± 0,5
60	57,6 ± 1,2	28,0 ± 1,4	15,6 ± 0,3	23,5 ± 1,0
120	57,7 ± 0,8	27,9 ± 0,5	15,6 ± 0,4	23,6 ± 0,9
180	57,6 ± 0,9	28,1 ± 0,8	15,7 ± 0,8	23,5 ± 1,1

**Figure 56** : cinétique d'extraction des grignons d'olive secs à 20°C et à 50°C : UPLC 20°C (a), UPLC 50°C (b)



L'analyse comparative par le test *Student* des vitesses moyennes d'extraction des composés phénoliques à deux températures (20°C et 50°C après 20 min de macération) montre une différence statistique pour le 3-hydroxytyrosol, le tyrosol et l'acide *p*-coumarique. Cependant, concernant l'acide caféique, il n'y a pas de différence significative du taux moyen entre 20°C et 50°C (valeur $p = 0,11$). Ces résultats sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : tableau comparatif des valeurs moyennes des composés phénoliques quantifiés à 20 min de macération à 20°C et à 50°C

Composés phénoliques quantifiés	Moyenne \pm SD à 20°C	Moyenne \pm SD à 50°C	Valeur p
3-hydroxytyrosol (10 ⁻² mg/g DOP*)	39,0 \pm 1,9	57,7 \pm 0,3	$P_s \leq 0,001$
Tyrosol (10 ⁻² mg/g DOP*)	23,4 \pm 1,0	27,9 \pm 0,7	$P_s = 0,003$
Acide caféique (10 ⁻² mg/g DOP*)	16,3 \pm 0,3	15,6 \pm 0,4	$P_s = 0,110$
Acide <i>p</i> -coumarique (10 ⁻² mg/g DOP*)	20,6 \pm 0,5	23,5 \pm 0,3	$P_s = 0,001$

*DOP: Grignons d'olive secs (Dried Olive Pomace)

Ces résultats statistiques nous ont permis de montrer l'effet du taux d'extraction lié au 3-hydroxytyrosol, au tyrosol et à l'acide *p*-coumarique à 50°C. On peut conclure que la cinétique d'extraction de la majorité des composés phénoliques est améliorée par l'augmentation de la température, à l'exception de celle de l'acide caféique qui n'a pas été influencée par ce facteur. La durée optimale d'extraction est atteinte à 20 min, au-delà de cette durée on est sur un plateau, c'est à dire, qu'il est inutile de dépasser cette durée d'extraction.

III. Optimisation du meilleur ratio EtOH-H₂O pour l'extraction des polyphénols

Pour confirmer les résultats obtenus par la prédiction théorique à l'aide du logiciel COSMO-RS, une série d'extractions a été mise en œuvre aux différents ratios EtOH/H₂O à deux températures différentes : 20°C et 50°C pour une durée de 20 min. L'étude est faite en se basant sur les analyses spectrophotométriques et chromatographiques. Le tableau 13 et la figure 54 présentent les teneurs des phénols totaux TPC obtenues pour chaque ratio.

**Tableau 13** : TPC des extraits de grignons d'olive obtenus par macération dans les différents ratios EtOH/H₂O à 20°C et à 50°C

Températures	20°C	50°C
% Solvant	R (mg/g)* ± SD	R (mg/g)* ± SD
100 % H ₂ O	1,92 ± 0,08	2,33 ± 0,09
10 % EtOH	2,21 ± 0,10	2,81 ± 0,07
20 % EtOH	2,56 ± 0,15	3,09 ± 0,11
30 % EtOH	3,07 ± 0,17	3,50 ± 0,05
40 % EtOH	3,40 ± 0,06	3,70 ± 0,06
50 % EtOH	3,66 ± 0,02	4,30 ± 0,10
60 % EtOH	3,73 ± 0,02	4,59 ± 0,30
70 % EtOH	3,60 ± 0,02	4,29 ± 0,05
80 % EtOH	3,18 ± 0,03	4,06 ± 0,08
90 % EtOH	2,41 ± 0,07	3,36 ± 0,05
100 % EtOH	1,18 ± 0,02	2,32 ± 0,06

Les résultats expérimentaux ont montré que l'extrait optimal a été obtenu pour un ratio de 60:40 EtOH/H₂O avec des meilleurs rendements de TPC de $3,73 \pm 0,02$ à 20°C et $4,59 \pm 0,30$ mg TE/g DOP à 50°C suivi par ceux de (70:40) et de (50:50) d'EtOH/H₂O avec $3,60 \pm 0,02$ et $3,66 \pm 0,02$ à 20°C, et $4,29 \pm 0,05$ et $4,30 \pm 0,10$ mg TE/g DOP à 50°C respectivement.

En outre, les résultats de l'analyse ANOVA pour la comparaison des groupes moyens (de 40:60 à 80:20 EtOH/H₂O) à deux conditions de température d'extraction, montrent la présence de différences statistiques entre chaque groupe de pourcentage (valeur $p_{ANOVA} < 0,05$). De plus, à l'aide d'un test post-hoc, le taux d'extraction du TPC lié au rapport de solvant de 60:40 EtOH/H₂O à 50°C s'est révélé statistiquement différent de tous les autres taux aux deux températures (valeur $p_{Tukey} < 0,05$). Au contraire, le taux d'extraction obtenu avec le même rapport de solvant à 20°C n'était pas statistiquement différent de ceux déterminés en utilisant 50:50 et 70:30 EtOH/H₂O à 20°C, ainsi qu'en utilisant 40:60 EtOH/H₂O à 50°C. De plus, les taux d'extraction du TPC correspondant à 50:60 et 70:30 EtOH/H₂O ne sont pas statistiquement différents à 50°C. Cela conduit à la conclusion que le



rapport 60:40 EtOH/H₂O à 50°C pourrait être le solvant le plus efficace pour extraire la majorité des composés phénoliques des grignons d'olive (figure 57).

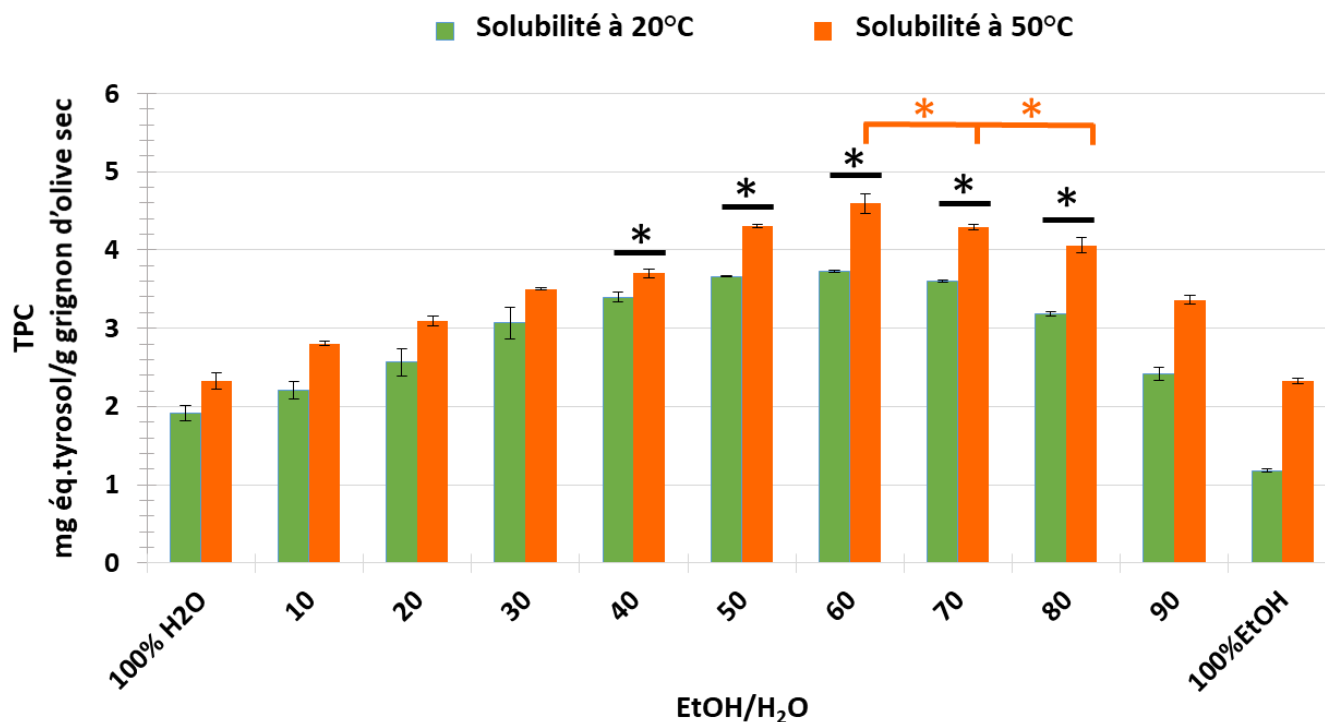


Figure 57 : les TPC des extraits de grignons d'olive obtenus par macération dans les différents ratios EtOH/H₂O à 20°C et à 50°C

Les rendements les plus faibles sont relatifs aux extraits obtenus par des solvants de 100% EtOH et 100% H₂O aux deux températures, ce qui n'a pas été établi par la prédiction COSMO. Cette contradiction de la prédiction de solubilité pour les forts pourcentages d'éthanol peut être expliquée par le fait que le calcul COSMO-RS des indices de solubilité des solutés dans le système de solvant suit une tendance linéaire, c.à.d. l'augmentation des valeurs de la solubilité résulte de l'augmentation de la proportion d'EtOH. Donc, on peut conclure que le seuil d'un modèle de prédiction COSMO-RS valide a été considéré dans un système de solvant avec moitié eau et moitié éthanol ou 60% d'éthanol. Par conséquent, ce modèle de prédiction ne peut être validé que par les résultats expérimentaux jusqu'à un taux d'éthanol de 60%. A partir de 70% d'éthanol, la diminution de la solubilité des solutés peut s'expliquer par le changement de polarité du système solvant, qui n'est pas favorable pour une solubilisation efficace [Vernes et *al.* 2019 ; Mnafigui et *al.* 2016].

Ces résultats ont pu être corroborés par UPLC/DAD sur les extraits obtenus à 50°C, seuls extraits analysés par chromatographie. La figure 58(b), montre que le 3-hydroxytyrosol et l'acide *p*-coumarique suivent la même tendance des résultats de TPC alors que le tyrosol et l'acide caféique présentent un comportement différent selon les ratios de solvant. Par contre,

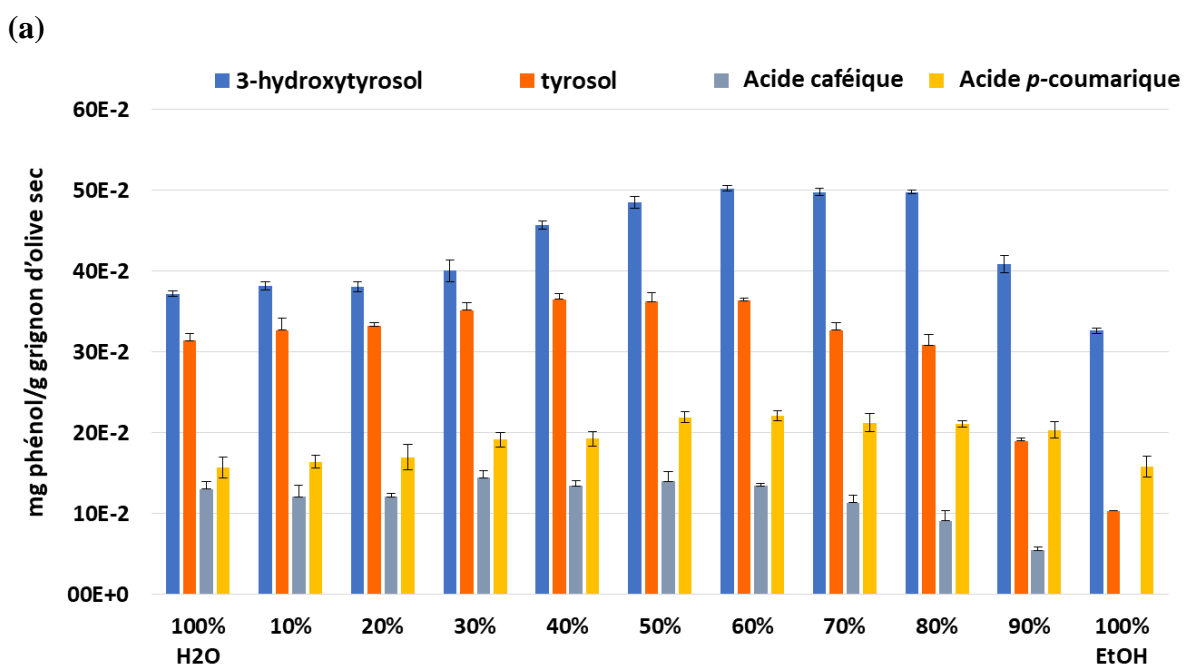


la somme de ces 4 composés phénoliques quantifiés illustrée par la figure 58(b) présente la même tendance que celle des résultats de TPC. Ces résultats confirment bien que le ratio 60:40 EtOH/H₂O est le ratio optimal suivi de 50:50 EtOH/H₂O.

Tableau 14 : rendements d'extraction des phénols quantifiés dans les extraits relatifs aux différents ratios EtOH/H₂O à 50°C par l'UPLC

Solvant	3-hydroxytyrosol (10 ⁻² mg/g DOP*)	Tyrosol (10 ⁻² mg/g DOP*)	a. caféique (10 ⁻² mg/g DOP*)	a. p-coumarique (10 ⁻² mg/g DOP*)	Somme des phénols (10 ⁻² mg/g DOP*)
100 % H ₂ O	37,2 ± 0,5	31,4 ± 0,3	13,1 ± 0,9	15,7 ± 1,3	97,4 ± 3,1
10 % EtOH	38,2 ± 1,6	32,7 ± 0,5	12,1 ± 1,4	16,4 ± 0,8	99,5 ± 4,4
20 % EtOH	38,1 ± 0,5	33,2 ± 0,7	12,1 ± 0,4	17,0 ± 1,5	100 ± 3,1
30 % EtOH	40,1 ± 0,6	35,2 ± 1,3	14,4 ± 0,9	19,2 ± 0,9	109 ± 3,7
40 % EtOH	45,8 ± 1,1	36,5 ± 0,5	13,4 ± 0,7	19,3 ± 0,9	115 ± 3,2
50 % EtOH	48,6 ± 0,3	36,3 ± 0,7	14,0 ± 1,1	21,9 ± 0,7	121 ± 2,9
60 % EtOH	50,3 ± 0,2	36,4 ± 0,3	13,5 ± 0,3	22,1 ± 0,6	122 ± 1,4
70 % EtOH	49,8 ± 0,5	32,7 ± 0,4	11,4 ± 0,9	21,3 ± 1,1	115 ± 2,9
80 % EtOH	49,8 ± 0,3	30,9 ± 0,2	09,1 ± 1,3	21,1 ± 0,4	111 ± 2,2
90 % EtOH	40,9 ± 0,4	19,0 ± 1,0	05,4 ± 0,4	20,4 ± 1,0	85,8 ± 2,8
100 % EtOH	32,6 ± 1,2	10,3 ± 0,3	Nd*_	15,8 ± 1,3	58,8 ± 2,8

Nd* : non détecté / DOP* : grignon d'olive sec (Dried Olive Pomace)



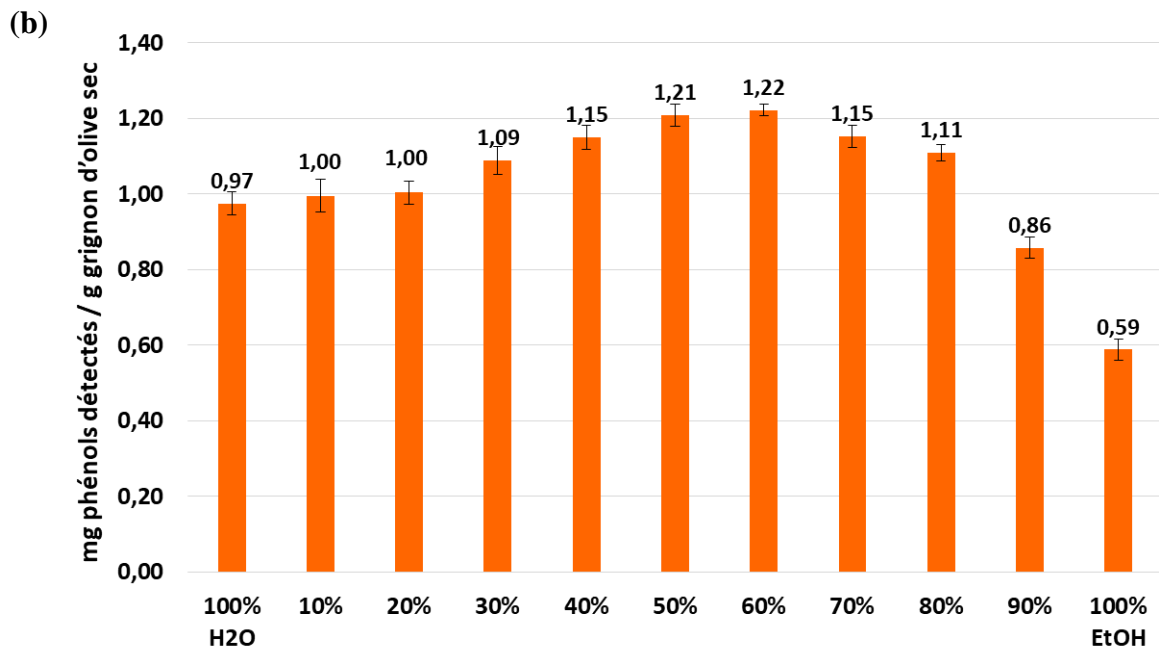


Figure 58 : détermination de la solubilité expérimentale à 50°C des différents ratios EtOH/H₂O par l'UPLC, Phénols quantifiés (a), et la somme des phénols quantifiés (b)

En se basant sur les résultats expérimentaux qui corroborent bien avec ceux obtenus par la prédiction théorique du logiciel COSMO-RS, le solvant optimal pour solubiliser les composés phénoliques étudiés est le ratio 60:40 EtOH/H₂O. Ces résultats sont en cohérence avec ceux de la littérature (Cepo et *al.* 2017).

IV. Intensification du rendement d'extraction moyennant des techniques innovantes et vertes

La macération conventionnelle est une technique traditionnelle lente, qui nécessite une quantité de solvant importante. Pour intensifier le procédé d'extraction, nous avons choisi des techniques innovantes et respectueuses de l'environnement qui ont été mises en œuvre dans les conditions optimales définies précédemment, et comparées à la macération conventionnelle. La poudre de grignons d'olive a été dissoute dans un solvant EtOH/H₂O 60:40 (v/v) avec un ratio soluté/solvant 1:10 (g/mL) et soumise aux différentes méthodes d'extraction (CM, ASE, UAE-P, UAE-B, BM et MAE) pendant 5 min à 50°C.



Tableau 15 : teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits obtenus par les différentes techniques d'extraction en mg d'équivalence de tyrosol par g de grignons d'olive secs

Techniques (5 min)	R (mg/g) \pm écart-type
Macération conventionnelle (CM)	3,80 \pm 0,05
Extraction accélérée par solvant (ASE)	5,31 \pm 0,04
Extraction par ultrason à sonde (USE-P)	5,04 \pm 0,06
Extraction par ultrason à bain (USE-B)	4,80 \pm 0,11
Extraction par micro-billes (BM)	4,32 \pm 0,07
Extraction par micro-ondes (MAE)	4,33 \pm 0,02

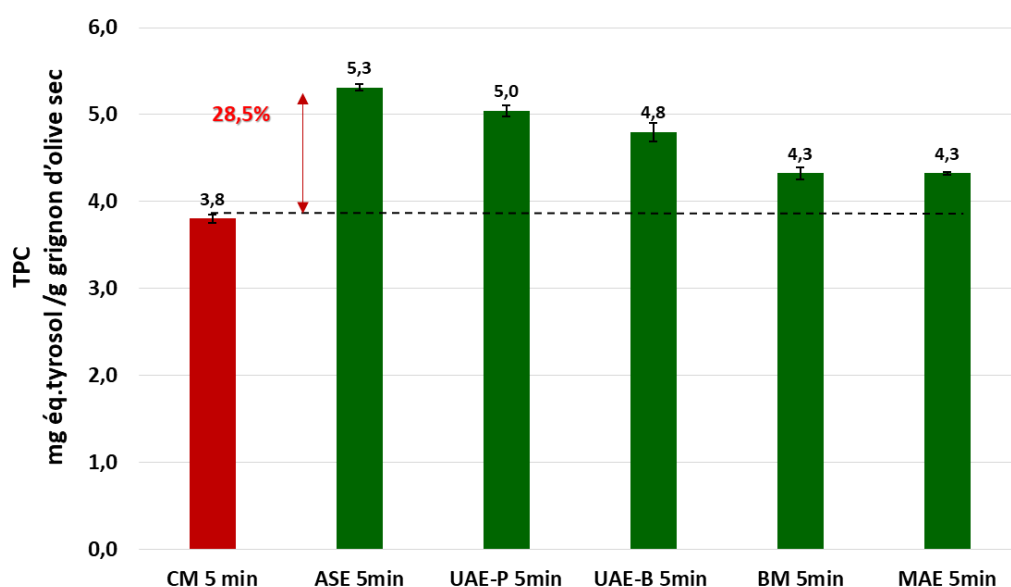


Figure 59 : comparaison des différentes techniques d'extraction en termes de composés phénoliques totaux

D'après la figure 59, l'extrait obtenu par ASE présente la plus grande teneur en TPC avec $5,31 \pm 0,04$ mg TE/g DOP, suivie par l'extrait obtenu par UAE-P ($5,04 \pm 0,06$ mg TE/g DOP) suivi par celui obtenu par UAE-B ($4,80 \pm 0,11$ mg TE/g DOP). Les extraits obtenus BM et MAE présentent les valeurs de TPC les plus faibles ($4,32 \pm 0,07$ mg TE/g DOP et $4,33 \pm 0,02$ mg TE/g DOP respectivement), avec des rendements presque identiques. Les résultats de TPC de tous les extraits sont parfaitement confirmés par les résultats de l'UPLC (figure 60(a) et 60(b)).



Tableau 16 : teneurs en composés phénoliques dans les extraits obtenus par les différentes techniques d'extraction déterminées par UPLC

	3-hydroxytyrosol (mg/g)	tyrosol (mg/g)	acide caféique (mg/g)	acide <i>p</i> -coumarique (mg/g)	Somme des phénols (mg/g)
CM 5 min	0,45 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,95 ± 0,05
ASE 5 min	0,65 ± 0,06	0,33 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,32 ± 0,01	1,54 ± 0,02
UAE-P 5 min	0,54 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,26 ± 0,01	1,32 ± 0,03
UAE-B 5 min	0,54 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,26 ± 0,01	1,30 ± 0,04
BM 5 min	0,46 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,22 ± 0,01	1,10 ± 0,05
MAE 5 min	0,46 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,23 ± 0,01	1,10 ± 0,06

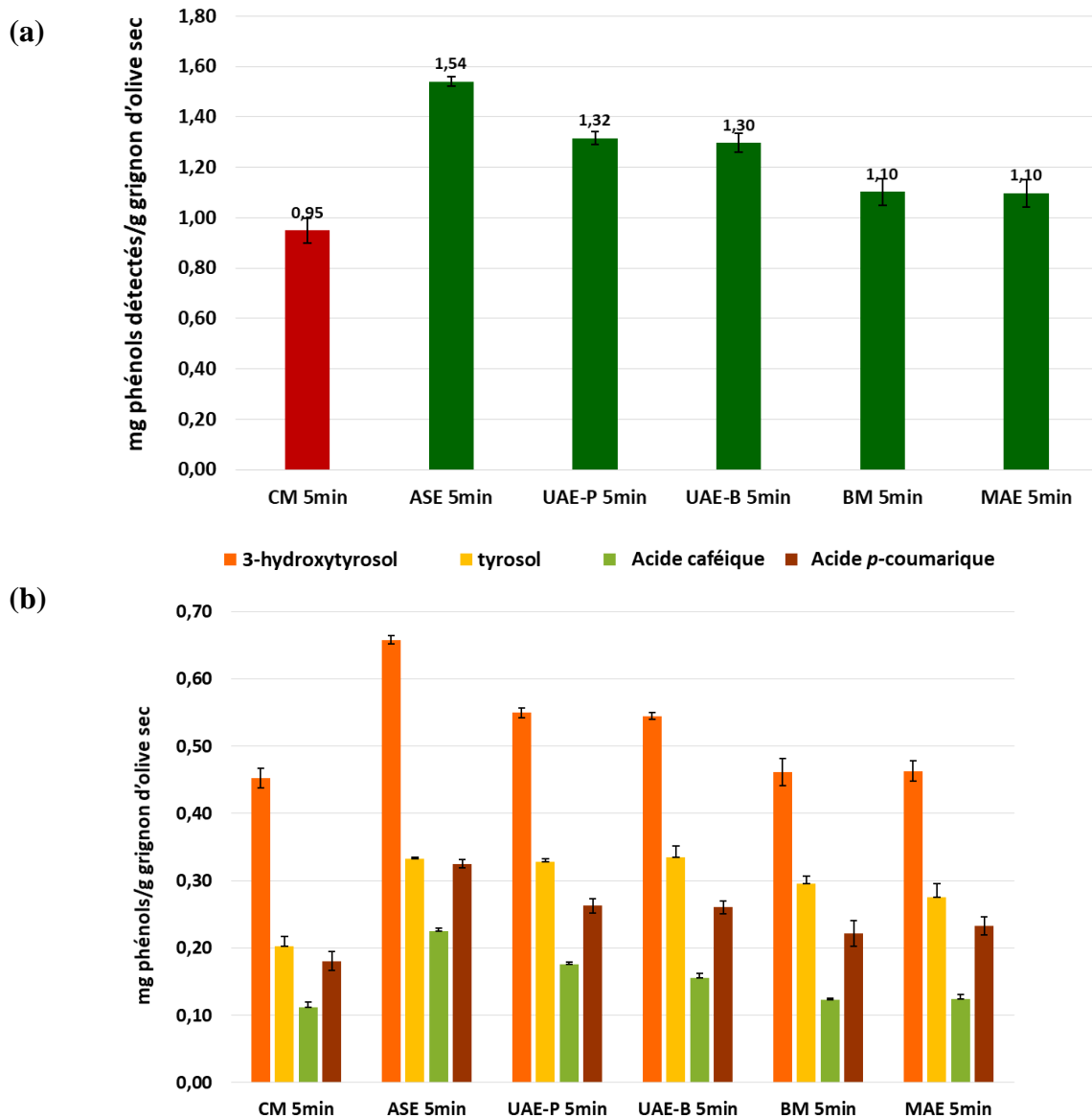


Figure 60 : comparaison des différentes techniques d'extraction par UPLC selon la somme des phénols quantifiés (a) et la teneur des différents phénols quantifiés (b)



La figure 60 présente les quatre composés phénoliques quantifiés par UPLC dans chaque extrait obtenu par les différentes techniques d'extraction. La figure 60(a), montre que la teneur des quatre composés phénoliques quantifiés dans chaque extrait suit la même tendance que les résultats de TPC. D'après la figure 60(b), on peut noter que le 3-hydroxytyrosol présente les concentrations les plus élevées variant entre $(45,2 \pm 1,4) 10^{-2}$ et $(65,7 \pm 0,6) 10^{-2}$ mg HT/g DOP suivie par le tyrosol avec des valeurs allant de $(20,3 \pm 1,4) 10^{-2}$ à $(33,2 \pm 0,2) 10^{-2}$ mg TY/ g DOP et l'acide *p*-coumarique avec des valeurs entre $(18,0 \pm 1,4) 10^{-2}$ et $(32,5 \pm 0,6) 10^{-2}$ mg *p*-CA/g DOP. Les concentrations les plus faibles sont détectées pour l'acide caféique allant de $(12,0 \pm 0,8) 10^{-2}$ à $(22,4 \pm 0,5) 10^{-2}$ mg CA/g DOP.

Par comparaison à la macération conventionnelle, l'ASE permet d'augmenter le rendement d'extraction de 28,5% pour une durée de 5 min. Les extractions assistées par ultrasons ont montré aussi une augmentation significative des rendements d'extraction tout en considérant que le système à sonde est un peu plus efficace que le bain. Par contre, les techniques d'extraction par micro-ondes et microbilles se sont avérées les moins efficaces pour l'extraction des composés phénoliques à partir des grignons sec, avec toujours une amélioration légère du rendement d'extraction par rapport à la macération.

Pour conclure, l'ASE s'est avérée la technique la plus efficace pour intensifier les rendements d'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre de grignons d'olive sèche. Cette efficacité est expliquée par l'effet de la pression qui est appliquée durant l'extraction. En effet, la haute pression favorise la diffusion du solvant EtOH/H₂O entre les pores des particules de grignons d'olive, ce qui augmente la surface de contact soluté/solvant induisant ainsi une augmentation du rendement d'extraction. D'autres études ont montré aussi des résultats significatifs par ASE pour l'extraction des composés phénoliques [Barros et al. 2013 ; Repajic et al. 2020 ; Richter et al. 1996].

V. Compréhension des mécanismes d'extraction

Chaque technique a son mécanisme d'action sur les différentes matrices et solvants. En effet, durant le processus d'extraction, l'effet qui se produit sur la matrice dépend de sa composition physique et chimique. Les composés solides, granulaires ou pulvérulents peuvent différer de manière significative, ce qui génère des différences dans le processus d'extraction. En outre, le grand nombre de composés organiques présents dans la matrice végétale augmente la complexité de la procédure d'extraction. D'autre part, le type et les propriétés du solvant telles que la polarité ou la viscosité ont également un rôle important dans le phénomène d'extraction.



Comme on l'a déjà montré, l'ASE est la technique la plus efficace en termes d'intensification du rendement d'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre de grignons d'olive sèche. En effet, la combinaison de la haute pression et la haute température améliore la performance de cette technique d'extraction grâce à la rupture de l'équilibre de surface qui engendre des effets de transfert de masse et par la suite une augmentation de la solubilité.

Une température de 50°C perturbe l'interaction soluté-matrice et abaisse la tension superficielle de la matrice, du solvant et des solutés, ce qui favorise le phénomène de diffusion. D'autre part, la température élevée diminue la viscosité du solvant, ce qui améliore sa capacité à solubiliser les composés ciblés de la matrice [Richter *et al.* 1996]. L'utilisation de la haute pression facilite l'extraction des composés phénoliques piégés dans les pores de la matrice. En effet, la pression force le solvant à pénétrer dans les zones des matrices qui ne sont normalement pas accessibles par le solvant dans les conditions atmosphériques.

Pour l'ultrason « UAE », La sonde produit des résultats plus intéressants que celui du bain. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Jamalabadi *et al.* 2019, qui ont montré que la sonication par sonde était plus efficace que par bain en termes d'influence sur les propriétés physico-chimiques et microstructurales des matrices. En effet, les ondes de sonication se propagent dans le milieu tout en créant des cavitations au niveau des particules solides favorisant ainsi la libération des composés d'intérêts ce qui conduit à l'intensification des rendements d'extraction. Les ultrasons ont montré leur efficacité pour l'extraction de matrices de tailles assimilées à des grains plutôt qu'à des particules plus fines assimilées à des poudres [Catena *et al.*, 2020].

Le procédé assisté par microbilles conduit probablement à la destruction des grains dans une taille plus petite tout en augmentant la surface de contact entre le soluté et le solvant ce qui permet d'améliorer le rendement d'extraction des composés phénoliques [Montalescot *et al.* 2015].

Dans le cas des micro-ondes, l'absence d'agitation durant le processus d'extraction s'est avérée non favorable pour améliorer la solubilité des composés phénoliques dans le solvant. Cet handicap influence négativement l'irradiation micro-ondes qui stimule normalement les cellules de la matrice tout en conduisant typiquement à leur destruction et par la suite favorise la libération des molécules ciblées [Chemat *et al.*, 2017].

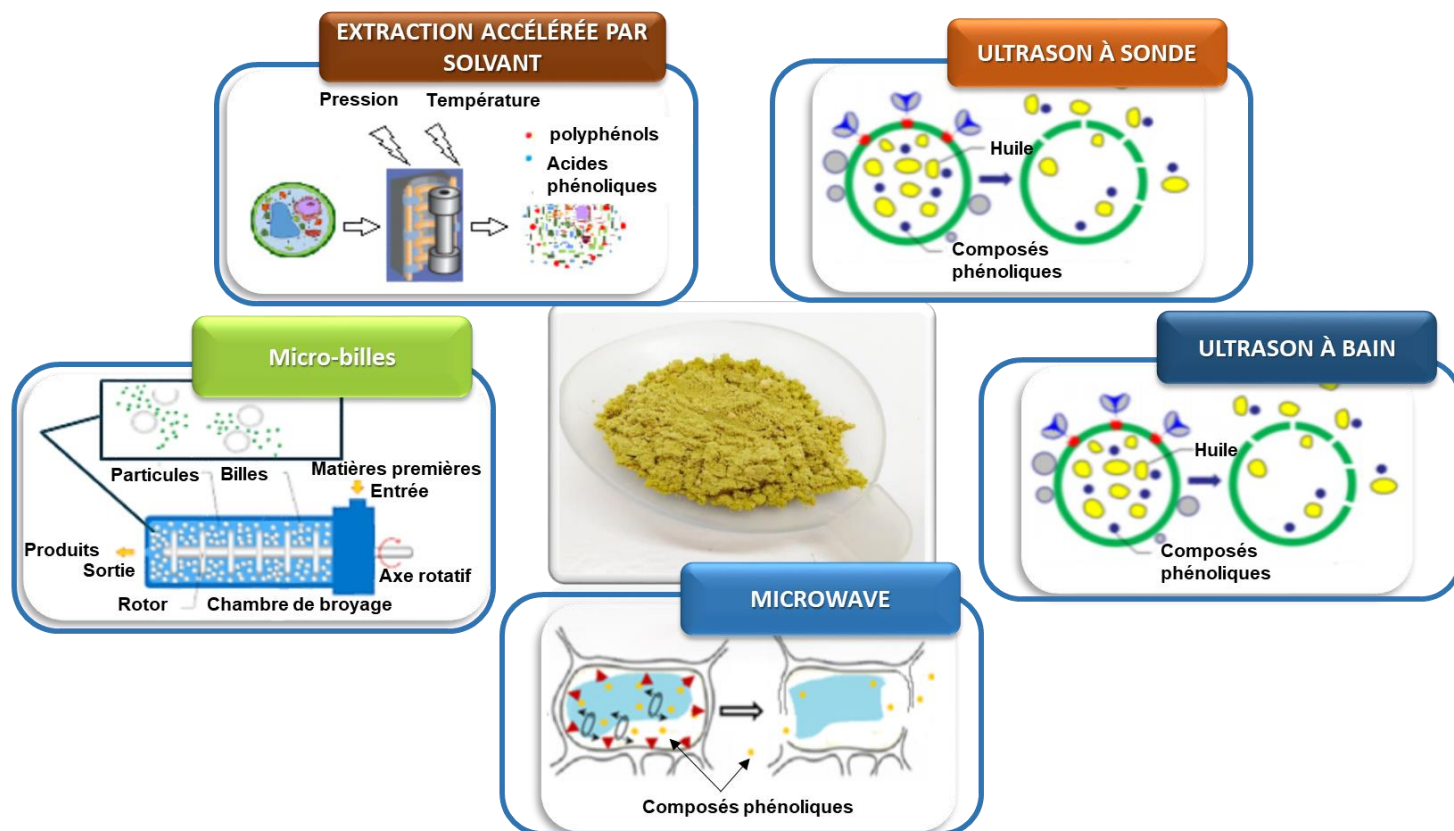


Figure 61 : effet des processus d'extraction sur la structure de la poudre de grignons d'olive sèche

VI. Conclusion

La COSMO-RS est un logiciel visant l'évaluation théorique de la solubilité de certains composés chimiques dans un solvant ou un mélange de solvants en se basant sur la thermodynamique et la chimie quantique.

L'évaluation théorique par COSMO-RS suivie d'une étude expérimentale nous a permis de conclure que le ratio 60:40 EtOH:H₂O est le meilleur mélange de solvants pour l'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olive. Après une étude cinétique à deux températures, nous avons déduit qu'une durée de 20 min d'extraction à 50°C est optimale pour extraire la majorité des composés phénoliques à partir des grignons par macération.

La comparaison du rendement d'extraction de cinq techniques vertes et innovantes (ASE, UAE-P, UAE-B, MAE et BM) avec celui obtenu par macération conventionnelle nous a permis de choisir l'ASE comme la méthode la plus pertinente. Elle permet une d'obtenir des rendements de l'ordre de 5.3 mg éq. tyrosol/g grignons d'olive secs pour une durée de 5 min.



Les actifs d'origine naturelle peuvent être jugés plus chers de par leur faible disponibilité et les procédés d'extraction à mettre en œuvre pour leur obtention par comparaison à la synthèse chimique du même composé. L'optimisation de l'extraction de certains bioactifs à partir d'un coproduit oléicole comme les grignons d'olive peut baisser le coût de la matière première, de la procédure en minimisant le temps d'extraction, de l'énergie ainsi que des quantités de réactifs chimiques. Ces conditions autorisant une grande valeur ajoutée peuvent encourager les industriels à adopter les actifs d'origine naturelle avec des formules innovantes, efficaces et en accord avec l'environnement.



C. OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS DU GRIGNON PAR UNE HUILE VEGETALE

Afin de contribuer à développer des procédés respectueux de l'environnement, nous avons choisi les huiles végétales comme solvant d'extraction. Les huiles végétales et surtout l'huile d'olive sont très utilisées dans plusieurs préparations cosmétiques et alimentaires de par leur richesse en composés bioactifs. En effet, l'utilisation des huiles végétales remonte à des millénaires avec l'invention de la première presse à huile pendant la préhistoire [Pasquet 2019]. L'huile d'olive et l'huile de graine de sésame sont les premières huiles apparues [Pasquet 2019]. Puis la modernisation du procédé a vu naître des huiles de noisette, de colza, de noix et d'autres. Leur utilisation remonte à la plus haute antiquité, les arabes, les berbères, les phéniciens, les romains et les grecs anciens les utilisaient déjà pour leur cuisine et leurs produits cosmétiques. L'utilisation des huiles comme solvants pour les composés apolaires est très répandue dans le monde entier alors que leur utilisation pour l'extraction des composés polaires ou moyennement polaires reste à performer. Certaines équipes de chercheur ont proposé d'utiliser cette source naturelle pour l'extraction des composés d'intérêt comme les polyphénols ou les caroténoïdes à partir de plusieurs matrices végétales. Citons par exemple l'étude réalisée par Li *et al.*, en 2019 qui a été portée sur l'utilisation des huiles alimentaires comme solvant pour une extraction verte des composés bioactifs volatils et non volatils à partir du romarin. Ils ont pu démontrer que l'huile de soja été la meilleure huile, parmi douze huiles étudiées, pour l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de romarin. Ainsi l'ajout des dérivés d'huile comme le mono-oléate et mono-stéarate de glycéryle et le diglycéride à l'huile d'extraction a la capacité d'améliorer le rendement d'extraction des antioxydants non-volatiles par 66,7% et d'augmenter la solvation des composés aromatiques volatiles par 16%. Une autre étude réalisée par Achat *et al.*, 2012, a été portée sur l'enrichissement d'huile d'olive en composés phénoliques et spécifiquement en oleuropéine à partir des feuilles d'olive par extraction assistée par ultrasons. Kehili *et al.*, 2019, ont mené une étude sur l'optimisation de l'extraction du lycopène à partir de la peau de tomate, sous-produits industriels, par macération avec l'huile d'olive raffinée comme solvant. Ils ont pu optimiser les conditions d'extraction en utilisant le model Box-Behnken pour optimiser le rendement et ainsi obtenir des teneurs de 35 mg de lycopène par g d'huile d'olive.

Adoptant le même principe, et visant l'utilisation des solvants verts, biosourcés et renouvelables, nous avons choisi d'envisager une étude comparative de deux huiles végétales



tout en optimisant les conditions d'extraction afin d'extraire des composés phénoliques à partir des grignons d'olive. Un plan d'expérience est mis en œuvre moyennant le modèle factoriel complet, la réponse est donnée sous forme de rendements d'extraction tout en calculant la teneur totale en polyphénols.

I. Optimisation du temps d'extraction

Dans ce chapitre, huit expériences seront mises en œuvre afin d'étudier l'effet de la variation de certains paramètres sur le rendement d'extraction. Afin de fixer le paramètre de la durée, une étude cinétique a été mise en œuvre par macération conventionnelle durant une période de 3 heures avec l'huile d'olive comme solvant d'extraction à température ambiante (25°C). Huit prélèvements ont été effectués au cours du temps. Chaque prise d'huile a subi une deuxième extraction liquide-liquide des composés phénoliques et les composés phénoliques extraits ont été quantifiés par la méthode de Folin Ciocalteu. Les résultats sont présentés en mg d'équivalent d'acide gallique par g de grignons d'olive sec.

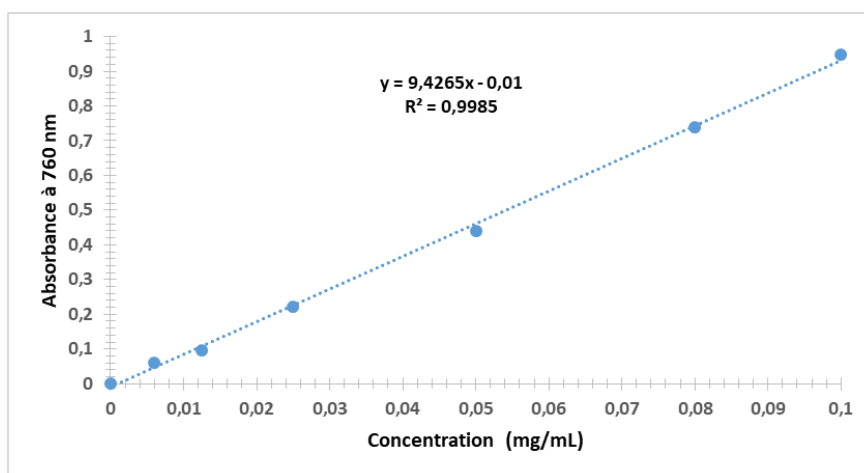


Figure 62 : droite d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau 17 : cinétique d'extraction des phénols totaux par la méthode de Folin Ciocalteu

Temps (min)	R (mg/g)
0	0,0
15	0,44 ± 0,05
30	0,98 ± 0,03
45	1,23 ± 0,04
60	1,23 ± 0,04
90	1,23 ± 0,04
120	1,23 ± 0,06
180	1,23 ± 0,05



Le tableau 16 présente le rendement d'extraction de chaque prise en mg équivalent d'acide gallique par g de grignons d'olive sec. La quantité des composés phénoliques initialement présente dans le solvant (huile d'olive), a été soustraite de tous les extraits.

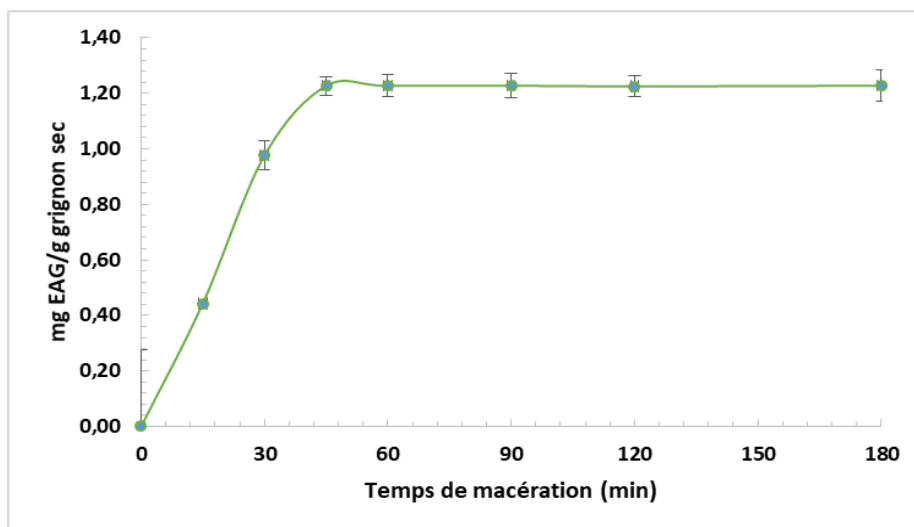


Figure 63 : cinétique d'extraction des grignons par l'huile d'olive

La figure 63 montre que le rendement d'extraction augmente linéairement durant les premières 30 min puis commence à se stabiliser pendant les 15 min suivantes pour atteindre leurs maximums vers 45 min. Après 45 min, un plateau de rendement est observé, c.à.d. l'extraction est dans son maximum ($1,23 \pm 0,04$ mg d'EAG/g grignons). Par conséquent, le temps d'extraction qui va être utilisé pour toutes les autres extractions sera de 45 min.

II. Optimisation des paramètres d'extraction

Trois paramètres à deux variables chacun ont été choisis durant ce travail induisant à la réalisation de huit expériences (2³). La réponse de ces expériences est donnée par le rendement d'extraction et présentée en quantité de phénols totaux par gramme de grignons d'olive sec.

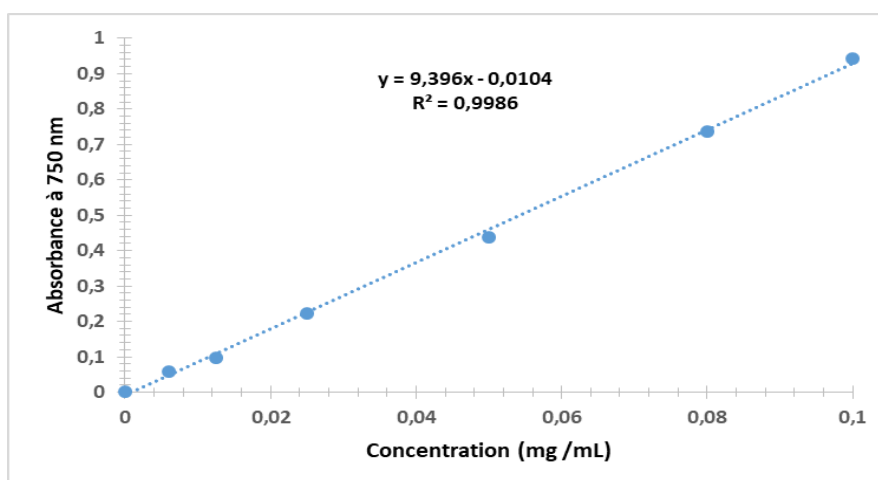


Figure 64 : droite d'étalonnage d'acide gallique



Tableau 18 : suivis de l'extraction des phénols totaux moyennant l'huile d'olive et de maïs par la méthode de *Folin-Ciocalteu*

Matrice	Expérience	Extrait	R(mg EAG/g grignons)
(-1)(-1)(-1)	M/25°C/MC	YB ₁	0,35 ± 0,06
(-1)(+1)(-1)	M/65°C/MC	YB ₂	0,84 ± 0,04
(+1)(-1)(-1)	O/25°C/MC	YB ₃	1,20 ± 0,04
(+1)(+1)(-1)	O/65°C/MC	YB ₄	1,75 ± 0,05
(-1)(-1)(+1)	M/25°C/US	YB ₅	0,61 ± 0,05
(-1)(+1)(+1)	M/65°C/US	YB ₆	1,03 ± 0,04
(+1)(-1)(+1)	O/25°C/US	YB ₇	1,57 ± 0,04
(+1)(+1)(+1)	O/65°C/US	YB ₈	2,08 ± 0,05

M : huile de maïs, O : huile d'olive, MC : macération conventionnelle, US : extraction par ultrason

La comparaison des rendements d'extraction des polyphénols par les différents types d'expériences montre que l'huile d'olive est un solvant plus performant que l'huile de maïs pour les composés phénoliques. L'augmentation de la température améliore les rendements d'extraction et l'extraction assistée par ultrasons est plus efficace que la macération conventionnelle.

La méthode du plan factoriel complet a été envisagée pour étudier l'effet direct de chaque paramètre sur le rendement d'extraction des polyphénols. La variation du type d'huile a montré un effet significatif sur le rendement. En effet, le pouvoir solubilisant de l'huile est directement lié à sa composition et surtout à la quantité et au type des composants mineurs de chaque huile. Plusieurs études antérieures ont pu montrer le pouvoir solubilisant des huiles végétales ainsi que l'amélioration de leur qualité organoleptique et leur stabilité dans leurs formes enrichies. A savoir que, l'utilisation des huiles végétales dans l'extraction directe des caroténoïdes à partir des micro-algues et de sous-produits de crevette a été appliquée avec succès dans plusieurs études [Sachindra *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2007; Pu *et al.*, 2010]. Une autre étude réalisée par Kehili *et al.*, 2019, a montré le pouvoir solubilisant d'huile d'olive raffinée du lycopène à partir des pelures de tomates.

1. 1^{er} paramètre : type d'huile

Le type d'huile utilisé pour l'extraction est le paramètre qui a montré l'effet le plus significatif lors de sa variation. En effet, la composition assez différente d'huile d'olive et



d'huile de maïs, est responsable de cette distinction en termes de pouvoir solubilisant. A côté des composants majeurs des deux huiles « les triglycérides » qui ont un caractère lipophile, les composants mineurs (Les diglycérides, monoglycérides et les phospholipides) sont les responsables de ce pouvoir solubilisant des composés phénoliques.

Les triglycérides sont des associations de trois molécules d'acides gras estérifiées à une molécule de glycérol. Ils représentent le squelette constructif d'une huile végétale qui varie de 95 à 98% d'une huile à une autre. Les caractéristiques de ces molécules varient en fonction du type, de la proportion et de la position des acides gras associés à la molécule de glycérol. La composition des acides gras des triglycérides des huiles végétales diffère en fonction de la variété, des conditions climatiques, du mode et de temps de récolte. Les acides gras eux-mêmes peuvent être classifiés en acides gras saturés, mono-, di- ou poly-insaturés selon le nombre d'insaturation dans la chaîne hydrocarbonée. La position et le nombre d'insaturation assure une variation importante en termes de configuration liées à différentes propriétés physiques (fluidité et viscosité) et chimiques (point de fusion, stabilité oxydative...).

Durant le processus d'extraction, les composés des huiles végétales, comme certains triglycérides peuvent être hydrolysés induisant la formation des glycérides partiels comme les mono- et les diglycérides qui sont des mono- et di-esters de glycérols avec des acides gras. Ces composés sont aussi naturellement présents dans les huiles végétales, du fait de l'action de l'enzyme endogène-lipase dans les fruits et les graines. Cette hydrolyse enzymatique conduit à la formation des glycérides partiels et des acides gras libres. La quantité de glycérides partielle varie entre 1 et 6% selon le type d'huile, mais généralement, la concentration des diglycérides est plus élevée que celle des mono-glycérides. Ces composés sont des molécules amphiphiles grâce à la présence des groupements hydroxyles libres, ce qui leur confèrent une certaine hydrophilie. La variation de la quantité et le type de ces molécules ainsi que d'autres composés mineurs confère à l'huile son pouvoir solubilisant de certains composés phénoliques. Notons que ces composés sont autorisés comme additifs alimentaires (E471).

Les phospholipides sont aussi des composants mineurs des huiles végétales et sont considérés comme des lipides polaires. Ils sont naturellement présents dans les cellules membranaires des plantes, et ils sont co-extraits avec les triglycérides lors du processus d'extraction par solvant. Les phospholipides sont des molécules constituées d'un squelette de glycérol avec deux acides gras et un groupe phosphate polaire. Cette polarité peut être



associée au pouvoir solubilisant des huiles végétales pour des composés polaires ; Mais généralement, la majorité des phospholipides est éliminée pendant l'étape de dégommeage du processus de raffinage de l'huile afin d'éviter le brunissement ou la formation de mousse lors des opérations de traitement pour une utilisation alimentaire.

Dans notre investigation nous avons choisi de travailler avec l'huile d'olive, seule huile contenant des composés phénoliques et de la comparer avec le comportement de l'huile de maïs dont les propriétés de solubilisation de composés polaires ont été montrés par Li *et al.*, 2019.

a. Huile d'olive :

L'huile d'olive est une huile très utilisée dans plusieurs domaines à savoir l'alimentation, la cosmétique et la phytothérapie. Ce multiusage est dû à sa composition unique et ses bienfaits reconnus sur la santé humaine. Sa composition varie en fonction du cultivar, de la région de culture, du climat et de la période de récolte. D'un point de vue chimique, on peut identifier deux fractions dans l'huile d'olive qui sont la fraction saponifiable et la fraction insaponifiable. La fraction saponifiable représente 97-99% de l'huile et contient des triglycérides majoritaires ainsi que ses produits de dégradations comme les di- et les mono-glycérides ainsi que quelques acides gras libres. Les acides gras insaturés sont les constituants les plus abondants formant les triglycérides avec un pourcentage variant entre 75 et 85%. L'acide oléique C18:1 « O » (56 à 84%) et l'acide linoléique C18:2 « L » (3 à 21%) représentent les portions les plus élevées d'acides gras insaturés. Par contre, les acides gras saturés représentent uniquement 15 à 25% de la totalité des acides gras de cette huile. L'acide palmitique « P » C16:0 (5 à 20%) et l'acide stéarique C18:0 « S » (0,5 à 5%) sont les acides gras saturés les plus abondants [Kamvissis *et al.*, 2008]. Le positionnement de ces acides gras sur la molécule de glycérol donne plusieurs types et configurations de ces composés, dont les plus abondants dans l'huile d'olive sont : OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-20%), POL (5,5-7%) et SOO (3-7%). Les diglycérides représentent 1 à 2,8% dans l'huile d'olive vierge abondant sous forme 1,2-diglycérides dans l'huile nouvelle, alors que durant le stockage, une isomérisation progressive se produit donnant naissance à l'isomère le plus stable 1,3-diglycéride. Les mono-glycérides sont présents à des quantités plus faibles qui ne dépassent pas 0,25%, avec une proportion importante de l'isomère 1-monoglycéride que l'isomère 2-monoglycéride.

La fraction insaponifiable représente uniquement 1-3% de l'huile regroupant une large variété de molécules citons par exemple les polyphénols, les stérols, les tocophérols etc. Cette



fraction ne peut pas être négligée de par son importance d'un point de vue nutritionnel et de par sa contribution à la stabilité et aux propriétés organoleptiques de l'huile d'olive.

b. Huile de maïs :

L'huile de maïs est extraite à partir des germes de graines de maïs est très utilisée en cuisine essentiellement comme huile de friture de par sa stabilité à la température. Cette huile a une valeur diététique intéressante grâce à sa composition chimique. Environ 59,6% des acides gras présents dans l'huile de maïs sont des acides gras polyinsaturés dont la majeure teneur est réservée à l'acide linoléique C18:2 « L » (54%) ; 27,4% sont des acides gras monoinsaturés (acide oléique C18:1 « O ») et 12,9% sont saturés. Le triglycéride majoritaire de cette huile est le « OLL ». Les huiles après extraction des germes peuvent subir différents traitements tels que le dégommeage, la décoloration, la neutralisation et la désodorisation. Généralement, les huiles raffinées sont dépourvues des composés minoritaires.

c. Analyse des résultats :

Les résultats de la comparaison de l'huile d'olive et de maïs montrent que l'huile d'olive est le solvant le plus performant pour l'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre de grignons d'olive. Ce résultat est dû à la composition chimique de cette huile qui contient davantage de composés minoritaires comme les mono- et les diglycérides qui sont généralement beaucoup plus faibles dans l'huile de maïs. La présence des diglycérides, des mono-glycérides et de certains composés insaponifiables apportent à l'huile d'olive le caractère solubilisant de certains composés polaires. Une étude portée par Li *et al.*, 2019 a montré que l'addition des diglycérides, mono-stéarate de glycérol et mono-oléate de glycérol aux huiles végétales améliore d'une façon significative l'extraction des antioxydants non-volatils et augmente la solvatation des composés aromatiques.

2. 2^{em} paramètre : La température

La température est considérée comme un catalyseur physique qui peut accélérer et améliorer les rendements d'une façon significative. Cependant, une température trop élevée peut conduire à l'altération de certains composés donnant un effet antagoniste et une réduction des rendements d'extraction. Des études antérieures ont montré que les polyphénols sont des composés thermosensibles qui peuvent résister à la chaleur à des températures moyennement élevées. Antony et Farid 2022 ont montré que l'extraction des polyphénols par des techniques traditionnelles est optimale pour des températures comprises entre 60 et 80°C. Pour notre investigation nous avons choisi de travailler à la température ambiante (25°C) et à une température de 65°C. Les extractions réalisées à 65°C ont donné des rendements plus



élevés. En effet, l'augmentation de la température agit non seulement sur le soluté mais également sur le solvant. Elle diminue la viscosité de l'huile ce qui améliore la dispersion de la poudre de grignons dans le solvant et par suite augmente la surface de contact soluté-solvant assurant une meilleure extraction. La chaleur facilite aussi l'extraction en perméabilisant les parois cellulaires du soluté par dénaturation ce qui aide à la diffusion des composés d'intérêt dans le milieu réactionnel.

3. 3^{em} paramètre: méthode d'extraction

Les techniques d'extractions actuelles sont nombreuses et varient entre les traditionnelles comme la macération conventionnelle ou le Soxhlet et les techniques innovantes telles que, les extractions assistées par ultrasons et par micro-ondes, l'extraction accélérée par solvant, l'extraction par fluides supercritiques et plusieurs autres technologies. Ce travail est porté sur la comparaison entre l'extraction par macération et celle assistée par ultrasons. Les rendements d'extraction sont améliorés par la technique ultrasonore grâce aux ondes mécaniques qui génèrent le phénomène de cavitation induisant ainsi la libération des composés d'intérêts.

III. Effet des paramètres sur le rendement d'extraction

Nous avons choisi de faire un plan d'expérience complet à trois paramètres de type 2ⁿ « factoriel complet ». Il fait partie des plans d'expérience les plus exhaustifs du fait de la variation simultanée de tous les paramètres du niveau -1 au niveau +1 ce qui permet d'étudier l'interaction intra- et inter-facteurs.

1. Validation du modèle

Les résultats expérimentaux ont été ajustés selon un modèle linéaire de régression multiple tout en utilisant une équation polynomiale du second ordre. L'efficacité de l'ajustement globale est exprimée par un coefficient de corrélation R^2 . D'après les résultats du test ANOVA (Tableau 18) pour notre modèle, la valeur de R^2 était 99,92%. Cette valeur montre la bonne corrélation réelle entre les trois variables étudiées en fonction de la réponse. En outre, la valeur du coefficient de détermination ajustée est très élevée et est égale à R^2 ajusté = 99,85% ce qui confirme la validation de notre modèle.



Tableau 19 : analyse de variance « ANOVA » des données d'intensification d'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olive

Source	DF	Somme des carrés	Carré moyen ajusté	Valeur-F	Probabilité de valeur-P
Linéaire	3	4,74092	1,58031	3402,31	0,000*
X₁	1	3,45024	3,45024	7428,16	0,000*
X₂	1	0,96701	0,96701	2081,92	0,000*
X₃	1	0,32367	0,32367	696,84	0,000*
Interaction de 2^{ème} ordre	3	0,02701	0,00900	19,39	0,000*
X₁*X₂	1	0,00538	0,00538	11,57	0,009*
X₁*X₃	1	0,01768	0,01768	38,06	0,000*
X₂*X₃	1	0,00396	0,00396	8,52	0,019*
Interaction de 3^{ème} ordre	1	0,00059	0,00059	1,26	0,293
X₁*X₂*X₃	1	0,00059	0,00059	1,26	0,293
Erreur résiduelle	8	0,00372	0,00046	-	-
Erreur pure	8	0,00372	0,00046	-	-
Total	15	-	-	-	-

$R^2 = 99,92\%$; $R^2(\text{pred}) = 99,69\%$; $R^2(\text{adj}) = 99,85\%$; *Significant ($P < 0,05$)

2. Effet des facteurs

D'après le tableau 18, les valeurs-P montrent que toutes les variables ont eu un effet linéaire positif sur le rendement d'extraction ($p < 0,001$) mais d'une importance différente. En effet, le type d'huile (X_1) a eu l'effet le plus significatif en termes d'intensification du rendement d'extraction suivi par la température (X_2) et finalement on trouve la méthode d'extraction (X_3) qui a aussi un effet significatif mais le moins important par comparaison aux deux autres variables. Les interactions bidirectionnelles, appelées aussi de 2^{ème} ordre, ont été trouvées aussi significatives pour l'augmentation du rendement. L'interaction la plus importante a été trouvée entre les variables X_1 - X_3 ($p < 0,001$) mais aussi entre les deux variables X_1 - X_2 ($p = 0,009$). L'interaction X_2 - X_3 ($p = 0,019$) a eu l'effet le plus faible sur l'augmentation du rendement. L'interaction tri directionnelle, dite aussi de 3^{ème} ordre, n'était



pas significative dans notre cas. L'analyse statistique a montré que tous les paramètres avaient un effet significatif sur le rendement avec un niveau supérieur pour le statut +1 de chaque.

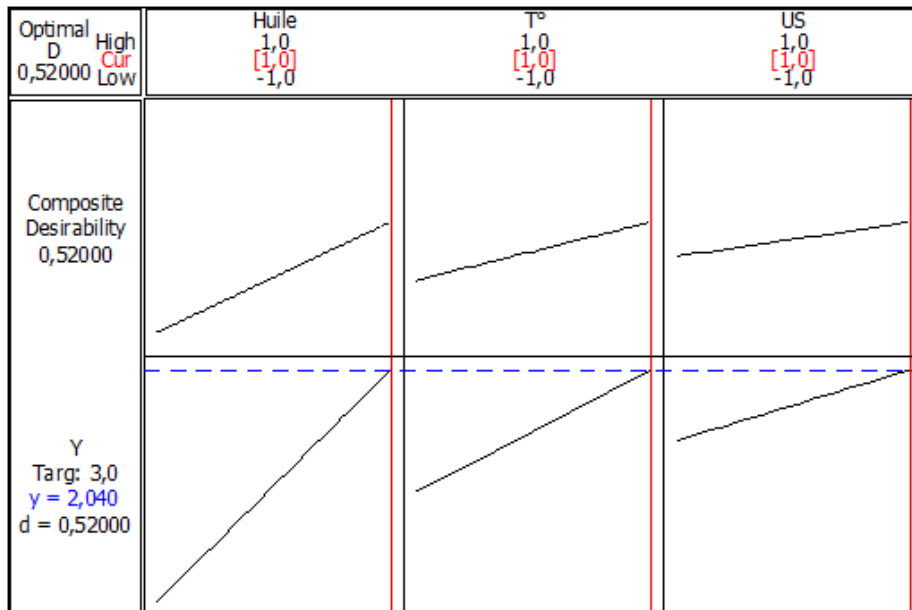


Figure 65 : effet optimal des trois paramètres : type d'huile (X_1), de la température (X_2) et la méthode d'extraction (X_3) sur le rendement.

La figure 65 montre que la prédiction du logiciel pour une réponse optimisée est de $y = 2,04$ dans les conditions suivantes : minimum = 1, maximum = 4 et une valeur cible de 3. Ainsi, les meilleures conditions proposées sont une extraction avec l'huile d'olive à 65°C et une extraction assistée par ultrasons.

a. Effet linéaire des facteurs :

La figure 66 présente l'effet moyen linéaire de chaque paramètre sur le rendement d'extraction des composés phénoliques. Il est clair que la variation du type d'huile a l'influence la plus forte sur le rendement. En deuxième lieu, la variation du paramètre température (de 25°C à 65°C) a montré un effet favorable sur le rendement. En effet, la majorité des études antérieures confirme l'effet positif du chauffage du milieu réactionnel pendant l'extraction sur le rendement, mais dans les limites exigées par le point d'ébullition du solvant et la thermosensibilité de la matrice végétale [Spigno *et al.*, 2007]. Néanmoins, le traitement de la matière végétale par les ultrasons a amélioré les rendements d'extraction par comparaison à la macération conventionnelle.

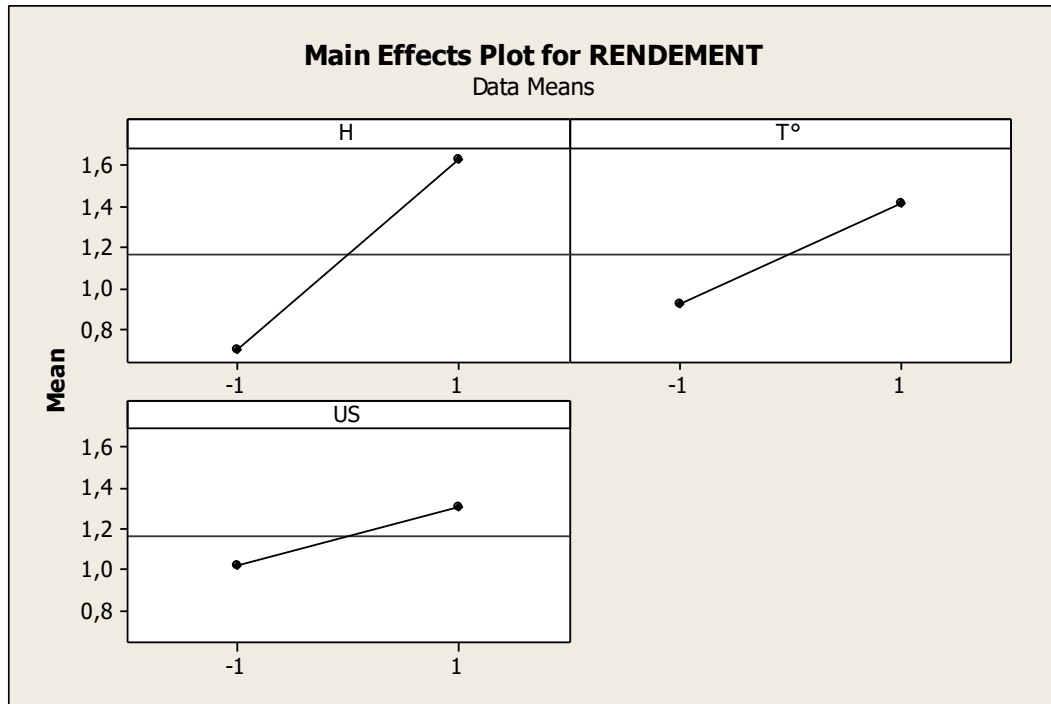


Figure 66 : effet moyen linéaire de chaque facteur sur le rendement d'extraction

b. Interaction huile-température (X_1 - X_2) :

La figure 67 présente la variation du rendement d'extraction par macération conventionnelle des deux huiles végétales à deux températures différentes. La ligne noire représente le rendement d'extraction avec l'huile de maïs plus faible que celui de l'huile d'olive (en ligne rouge) pour les deux températures étudiées. La variation de la température du 25°C à 65°C donne une amélioration significative sur le rendement d'extraction.

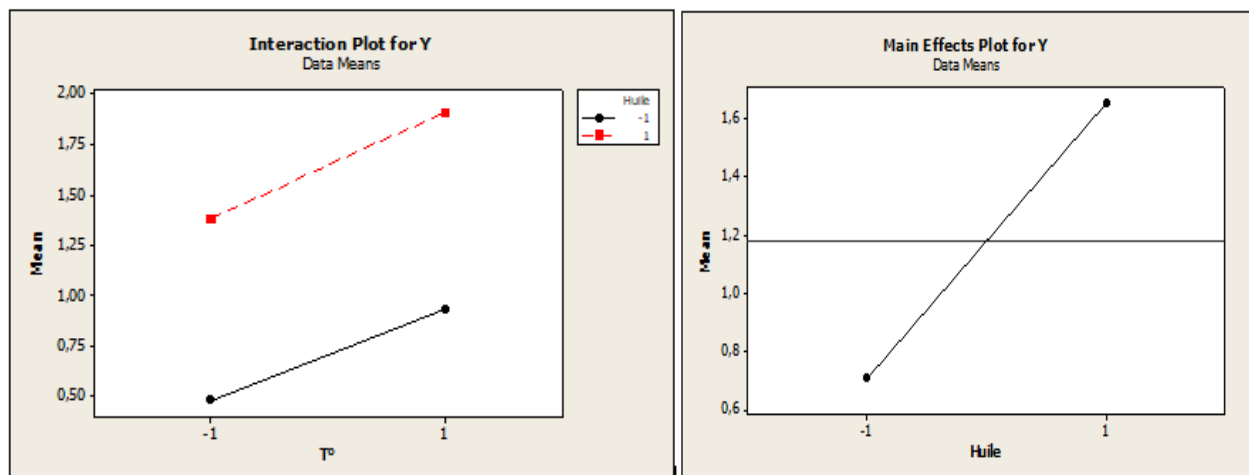


Figure 67 : interaction huile – température

L'effet de la variation du solvant -1 à +1 est très remarquable avec une pente importante. Ainsi le rendement d'extraction a doublé de $\approx 0,7$ mg d'EAG/g grignons pour l'huile de maïs à $\approx 1,6$ mg pour l'huile d'olive.



c. Interaction huile-méthode d'extraction (X_1 - X_3) :

En comparant maintenant l'interaction entre le paramètre type d'huile et le paramètre méthode d'extraction présentée par la figure 68, les résultats montrent que l'ultrason est plus efficace en termes de rendements que celle par macération conventionnelle. Bien que la pente de variation ne soit pas très importante entre les deux techniques d'extraction, l'extraction par ultrason semble être légèrement supérieure pour l'huile d'olive que pour l'huile de maïs (la pente de la ligne rouge est plus grande que celle de la ligne noire). Cela peut être expliqué par le fait que l'huile d'olive a un aspect un peu plus visqueux, et l'utilisation des ultrasons fluidifie ce solvant en favorisant sa pénétration dans les pores des tourteaux d'olive dans les grignons entraînant l'amélioration d'extraction des composés phénoliques.

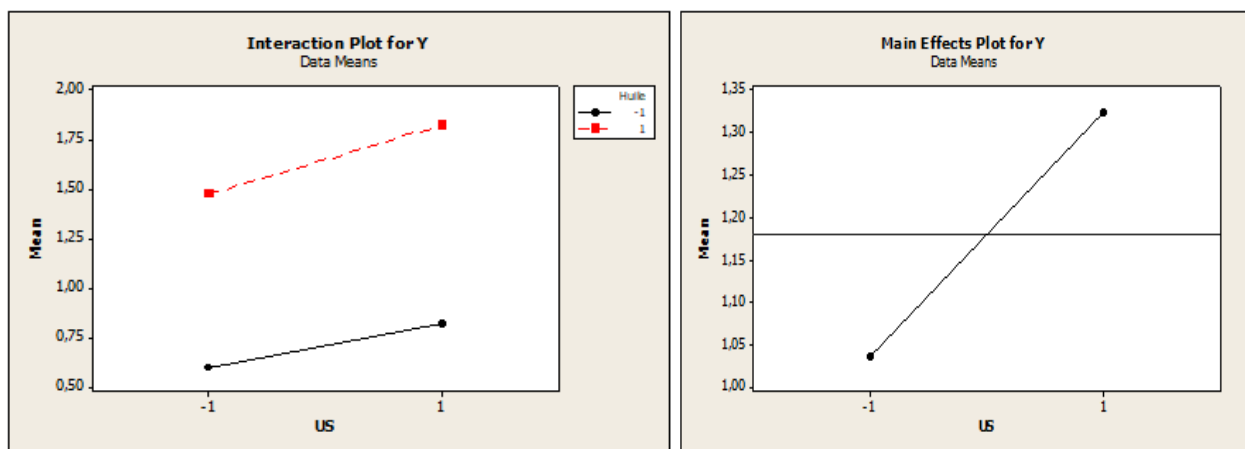


Figure 68 : interaction huile-méthode d'extraction

d. Interaction température-méthode d'extraction (X_2 - X_3) :

D'après la figure 69, l'extraction par ultrason est plus pertinente pour les deux températures (25°C et 65°C) que celle par macération conventionnelle. En effet, la pente à 25°C est plus importante que celle à 65°C. A température ambiante, l'US donne de meilleurs résultats que la macération. Par contre, à des températures élevées, la sonication reste toujours plus efficace.

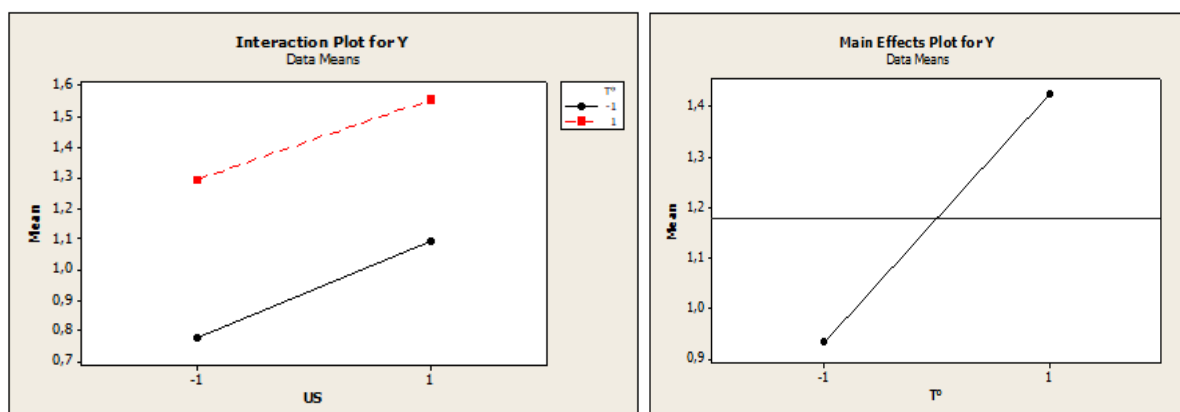


Figure 69 : interaction température-méthode d'extraction



3. L'analyse de la réponse tridimensionnelle

Les impacts des trois paramètres sur le rendement d'extraction sont illustrés par des graphiques tridimensionnels (3D) présentés par la figure 70.

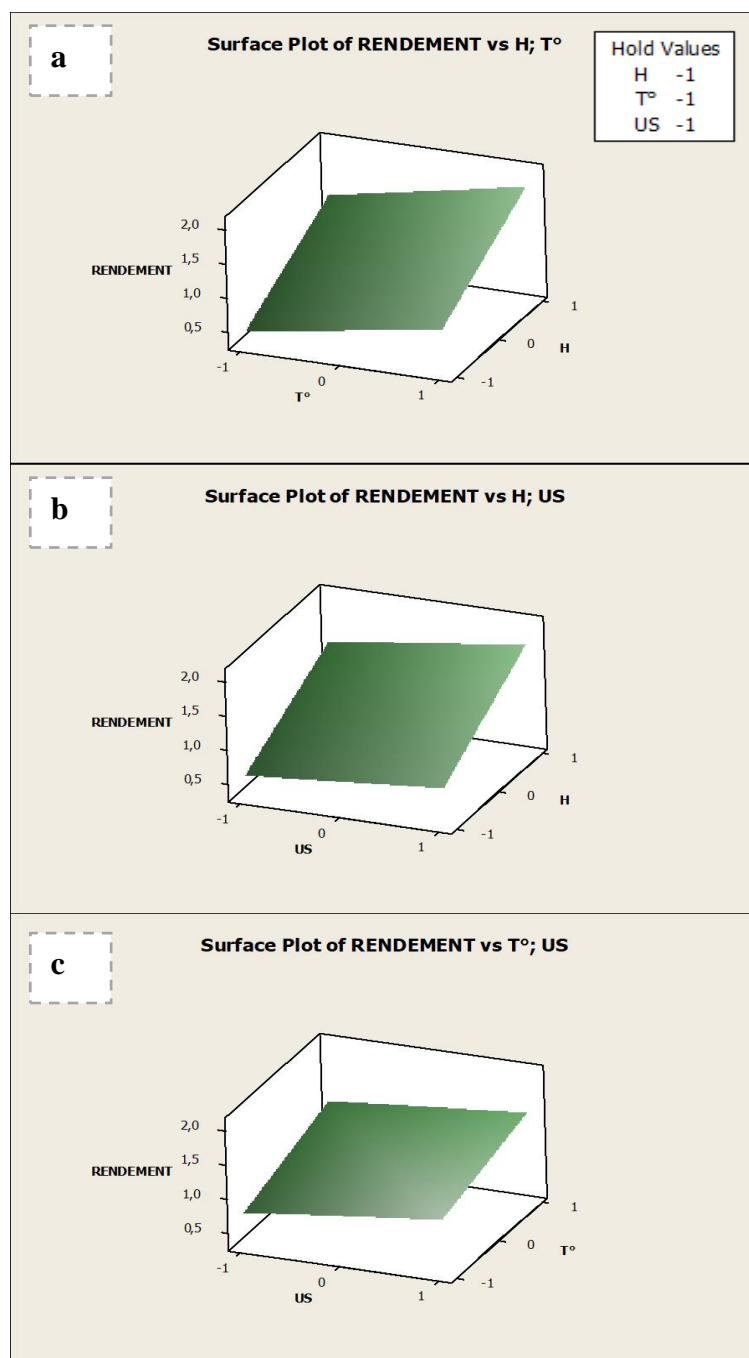


Figure 70 : représentation graphique : surface de réponse du rendement d'extraction
(a) : en fonction **huile-température** ; (b) : en fonction **huile-méthode d'extraction** ;
(c) : en fonction **température-méthode d'extraction**

Ces graphiques constituent la réponse directe d'un plan factoriel complet. Ils illustrent des différentes combinaisons binaires des paramètres sur le rendement d'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olive. La figure 70(a) montre l'effet du solvant



d'extraction (type d'huile) et la température sur le rendement sans faire intervenir l'effet du troisième paramètre. Le graphique montre que la combinaison X_1 - X_2 est la meilleure en termes de rendements. La figure 70(b) présente l'effet du type d'huile et la méthode d'extraction sur le rendement global. Ainsi, le graphique indique que l'interaction X_1 - X_3 donne une bonne réponse. La figure 70(c) illustre l'effet de la température et de la méthode d'extraction sur le rendement. Les réponses obtenues de l'exécution de notre plan d'expérience montrent que les meilleurs rendements sont dans les conditions suivantes : l'huile d'olive comme solvant d'extraction, une température de 65°C moyennant l'application des ultrasons comme méthode d'extraction pour notre matière végétale (grignons d'olive).

4. Analyse des courbes d'iso-réponse

Les courbes d'iso-réponses sont considérées comme des outils nécessaires d'exploration de l'effet global de paramètres. Ils doivent être examinés lors des premiers balancements afin de cibler les paramètres optimaux des niveaux de chaque facteur. En effet, ces courbes donnent une idée sur la totalité des régions entre les deux niveaux de chaque variable. Ces courbes peuvent être appliquées pour les effets principaux linéaires de chaque variable ou pour les interactions de 2^{ème} ordre comme présenté par la figure 71. La dégradation de la couleur verte indique l'intensité du rendement d'extraction. Plus la couleur est intense, plus le rendement est important. Comme indiqué précédemment, l'interaction huile-température (X_1 - X_2) (figure 71(a)) a donné les rendements les plus importants lorsqu'elles sont appliquées à leurs hauts niveaux. On peut remarquer à partir de cette figure que le rendement s'améliore du point 0 pour la variable (type d'huile) c.à.d. à partir : de l'utilisation de 50% huile d'olive / 50% huile de maïs pour atteindre son maximum à 100% huile d'olive. Alors que le rendement commence à s'améliorer à partir d'une température qui dépasse 45°C.

La figure 71(b) présente l'interaction huile-méthode d'extraction (X_1 - X_3) où le type d'huile garde son effet positif sur le rendement, de plus l'utilisation des ultrasons ($X_3 = +1$) améliore les résultats. On remarque ici que l'utilisation d'huile de maïs ($X_1 = -1$) moyennant la macération conventionnelle comme technique d'extraction ($X_3 = -1$) a donné la réponse la plus faible.

Néanmoins, l'interaction température-méthode d'extraction (X_2 - X_3) est la plus faible. Cela est bien illustré par la figure 71(c) montrant uniquement trois panneaux avec graduation de couleur de large plage. Sans nier l'effet de l'association binaire température-ultrasons pour avoir un rendement remarquable.

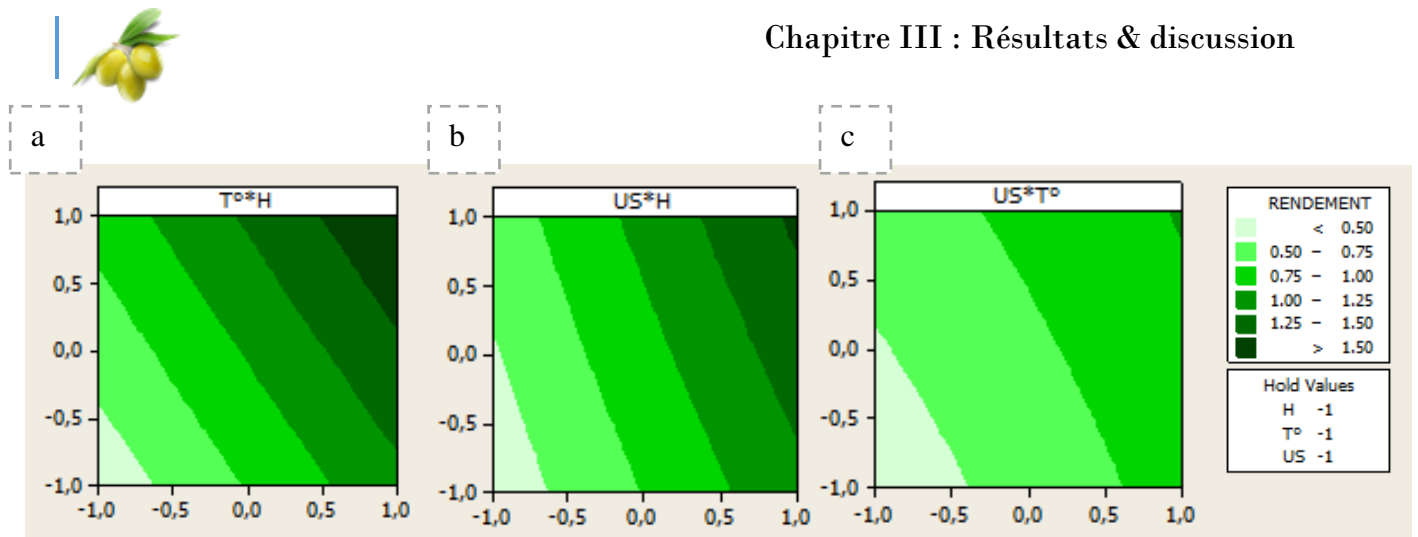


Figure 71 : les courbes d'iso-réponse des trois paramètres étudiés.
(a) : en fonction X_1 - X_2 ; (b) : en fonction X_1 - X_3 ; (c) : en fonction X_2 - X_3 .

Dans cette étude, nous avons pu conclure que l'huile d'olive peut être considérée comme un bon solvant d'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olive grâce à sa composition chimique qui diffère des autres huiles végétales. Son utilisation a donné un effet significatif sur le rendement. L'extraction à haute température améliore significativement le rendement en composés d'intérêt ; ainsi l'utilisation des ultrasons améliore le rendement obtenu par macération conventionnelle.

Suite à ces travaux, nous pouvons conclure que la réponse optimale des rendements confirmés par notre plan d'expérience (factoriel complet) est la suivante : huile d'olive comme solvant, une température de 65°C et extraction assistée par ultrasons.

IV. Conclusion

La comparaison du rendement d'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olive moyennant deux huiles végétales en tant que solvants a montré que l'huile d'olive a un pouvoir solubilisant plus grand que celui de l'huile de maïs. Le rendement optimal de l'extraction par l'huile d'olive a été obtenu à l'aide de l'UAE à une température de 65°C.

L'étude de l'effet de trois facteurs (type d'huile, procédé d'extraction et température) sur le rendement d'extraction a été réalisée à l'aide d'un plan factoriel complet à trois variables à deux niveaux. Les résultats de l'analyse statistique ont montré que tous les paramètres ont un effet linéaire positif sur le rendement d'extraction avec la dominance de la variable de type d'huile.

Le pouvoir solubilisant de l'huile d'olive pour les composés phénoliques présents dans les grignons d'olive est lié essentiellement à la présence des diglycérides, des monoglycérides



et de certains phospholipides dans cette huile végétale qui sont quasiment absents dans l'huile de maïs.

La demande croissante des consommateurs pour des produits certifiés bio et le besoin de réussite de la transition écologique et énergétique nous laisse à penser que l'utilisation des huiles végétales riches en composés phénoliques pourrait contribuer à cette évolution en particulier dans le secteur cosmétique. En complément de l'effet hydratant et solubilisant des composés lipophiles, ces huiles peuvent être utilisées comme des conservateurs naturels dans certaines préparations cosmétiques de par leur richesse en composés phénoliques.



Références bibliographiques

A

- Achat, S., Tomao, V., Madani, K., Chibane, M., Elmaataoui, M., Dangles, O. & Chemat, F. (2012). Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot scale. *Ultrasonics sonochemistry*. 19, 777-786. [10.1016/j.ultsonch.2011.12.006D](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.12.006D)
- Antony, A. & Farid, M. (2022). Effect of temperatures on polyphenols during extraction. *Appl. Sci.* 12(4), 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>

B

- Barros, F.; Dykes, L.; Awika, J. M.; Rooney, L. W. (2013). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. *J. Cereal Sci.* 58, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.011>.
- Bengana, M.; Bakhouch, A.; Lozano-Sanchez, J.; Amir, Y.; Ypupu, A.; Segura-Carretero, A. and Fernandez-Gutiérrez, A. (2013) Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil, *Food Research International*. 54(2), 1868 – 1875. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.037>
- Ben Saad, A., Tiss, M., Keskes, H., Chaari, A., Sakavitsi, M.E., Hamden, K., Halabalaki, M. & Allouche, N. (2021). Antihyperlipidemic, antihyperglucemic, and liver function protection of *Olea europaea* var. meski stone and seed extracts: Lc-ESI-HRMS-based composition analysis. *J Diabetes Res.* [doi: 10.1155/2021/6659415](https://doi.org/10.1155/2021/6659415)
- Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49(6), 2774–2779. <https://doi.org/10.1021/jf001413m>

C

- Catena, S., Rakotomanomana, N., Zunin, P., Boggia, R., Turrini, F., Chemat, F. (2020). Solubility study and intensification of extraction of phenolic and anthocyanin compounds from *Oryza sativa* L. ‘Violet Nori’, *Ultrasonics Sonochemistry*. [doi: https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105231](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105231)



- Čepo, D. V.; Albahari, P.; Končić, M. Z.; Radić, K. (2017). Solvent extraction and chromatographic determination of polyphenols in olive pomace. *Food in Health and Disease*. 6, 7-14. <https://www.researchgate.net/publication/319752053>.
- Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A. G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A. S.; Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrasonics Sonochemistry* 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>.
- Chernonosov, A.A., Karpova, E. and Lyakh, E. (2017). Identification of phenolic compounds in *Myricaria bracteata* leaves by high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) and liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal Revista Brasileira de farmacognosia*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.07.001>

D

- Da Silva Mathias and Rodrigues de Oliveira. (2019). Differentiation of the phenolic chemical profiles of *Cecropia pachystachya* and *Cecropia hololeuca*. *Journal of Wiley phytochemical analysis*. 30, 73-82. <https://doi.org/10.1002/pca.2791>

F

- Fontana Pereira, D., Cazarolli, L. H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo, M. S. R. B., Guedes, A., Silva, F. R. M. B. (2011). Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*. 27(11-12), 1161–1167.
- Francioso Ornelle, Ferrari Erika, Saladini Monica, Montecchio Daniela, Gioacchini Paola, Ciavatta Claudio (2007). TG-DTA, DRIFT and NMR characterisation of humic-like fractions from olive wastes and amended soil. *Journal of Hazardous Material*. 149(2), 408-417. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.002>

G

- Ghorbani A. (2017). Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine and pharmacotherapy*. 96, 305-312. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>



- Ghorbel, A., Wedel, S., Kallel, I., Cavinato, M., Sakavitsi, M., Fakhfakh, J., Halabalaki, M., Jansen-Durr, P., Allouche, N. (2021). Extraction yield optimization of Oleaster (*Olea europea* var. *sylvestris*) fruits using response surface methodology, LC/MS profiling and evaluation of its effects on an antioxidant activity and autophagy in HFF cells. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 15, 4946-4959. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01058-7>

H

- Hamden, K., Allouche, N., Damak, M., & Elfeki, A. (2009) Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *J. Chemico-Biological interactions*. 180(3), 421-432. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.04.002>
- Hamden, K.; Allouche, N.; Jouadi, B.; El-Fazaa, S.; Gharbi, N.; Carreau, S.; Damak, M.; Elfeki, A. (2010). Inhibitory action of purified hydroxytyrosol from stored olive mill waste on intestinal disaccharidases and lipase activities and pancreatic toxicity in diabetic rats. *Food Sci. Biotechnol.* 19, 439-447. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0062-6>

I

- Irakli, M.; Skendi, A.; Bouloumpasi, E.; Chatzopoulou, P.; Biliaderis, (2016). C.G. LC-MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Solid Residues from the Essential Oil Industry. *Antioxidants*. 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10122016>

J

- Jakobs S, Fridrich D, Hofem S, Pahlke G, Eisenbrand G. (2005) Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Mol Nutr Food Res*. 50, 52–7.
- Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(19), 8798–8804. [doi:10.1021/jf901280r](https://doi.org/10.1021/jf901280r)



K

- Kabbash, E.M., Abdel-Shakour, Z.T., El-Ahmady, S.H. et al. (2023). Comparative metabolic profiling of olive leaf extracts from twelve different cultivars collected in both fruiting and flowering seasons. *Sci Rep* 13, 612 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27119-5>
- Kamvissis, V.N., Barbounis, E. G., Megoulas, N.C. & Koupparis, M.A. (2008). A novel photometric method for evaluation of the oxidative stability of virgin olive oils. *Journal of AOAC International*. 91, 4.
- Kang C.D., Sim S.J. (2008). Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Biotechnol. Lett.* 20, 441–444. [doi: 10.1007/s10529-007-9578-0](https://doi.org/10.1007/s10529-007-9578-0).
- Kang, J., Price, W., Ashton, J., Tapsell L., and Johnson S. (2016). Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. *Food Chemistry*. 211, 215-226. [doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.052](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.052)
- Katsinas, N.; Enríquez-de-Salamanca, A.; Bento da Silva, A.; Bronze, M.R.; Rodríguez, Rojo, S. (2021). Olive Pomace Phenolic Compounds Stability and Safety Evaluation: From Raw Material to Future Ophthalmic Applications. *Molecules*. 26, 6002. <https://doi.org/10.3390/molecules26196002>
- Kehili, M., Sayadi, S., Frikha, F., Zammel, A. & Allouche, N. (2019). Optimization of lycopene extraction from tomato peelings industrial by-product by maceration in refined olive oil. *Food and bioproducts processing*. 117, 321-328. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.08.004>
- Kumar, S., Madaan, R., Sharma, A. (2008). Pharmacological evaluation of bioactive principle of *Turnera aphrodisiaca*. *Indian. J. Pharm. Sci.* 70(6), 740-4. [DOI: 10.4103/0250-474X.49095](https://doi.org/10.4103/0250-474X.49095)

L

- Lapa, F.R., Gadotti, V.M., Missau, F.C., Pizzolatti, M.G., Marques, M.C.A., Dafré, A.L., Farina, M., Rodrigues, A.L.S., Santos, A.R.S. (2009). Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *polygala paniculata*. L. in



mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 104(4), 306-15. [doi: 10.1111/j.1742-7843.2008.00365.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00365.x).

- Lei F., Zhang X.N., Wang W., Xing D.M., Xie W.D., Su H. (2007). Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *International Journal of Obesity*. 6, 1023-1029.
- Li, Y., Bundeasomchok, K., Rakotomanomana, N., Fabiano-Tixier, A.S., Bott, R., Wang, Y. & Chemat, F. (2019). Towards a zero-waste biorefinery using edible oils as a solvent for the green extraction of volatile and non-volatile bioactive compounds from rosemary. *Antioxidants*. 8(5), 140. <https://doi.org/10.3390/antiox8050140>
- Li, Y., Zuo, Y. & Sun, W.J. (2007). Study on antioxidant activity of two major secoiridoide glucosides in the fruits of *ligustrum lucidum* Ait. *Journal of Chinese Medicinal Materials*. 30(5), 543-546.
- Liorent-Martinez E.J.; Gouveia S. and Castilho P.C. (2015). Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of Laurisila forest species. *Journal of Industrial Crops and products* 64, 135 –151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.068> 0926-6690
- Liu, Y., Li, Y.Y., Feng, T.T., Hu, J.M., Ma, L., Wang, L.J., Qiqihar Med., J. (2010) *Univ.* 31, 2368.

M

- Michel, T. ; Khelif, I. ; Kanakis, P. ; Termentzi, A. ; Allouche, N ; Halabalaki, M. ; Skaltsounis, A. (2015). UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different *Olea europaea* organs of Koroneiki and Chetoui varieties, *Phytochem. Lett.* 860, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.12.020>
- Mnafigui K.; *et al.* (2016) Protective effect of hydroxytyrosol against cardiac remodeling after isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. *Cardiovasc. Toxicol.* 16, 147–155. <https://doi.org/10.1007/s12012-015-9323-1>.
- Montalescot, V.; *et al.* (2015). Bioresource technology optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresour. Technol.* 196, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.075>.



P

- Pasquet, V. (2019) La fabrication des huiles végétales : de nombreuses étapes accidentogènes. *Magasine Face au risque*. 553(11).
- Picq, M., Cheav, S.L., Prigent, A.F. (1991). Effect of two flavonoid compounds on central nervous system. Analgesic activity. *Life Sciences* 49(26), 1979-1988. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90640-W](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90640-W)
- Prieto P. and Pineda M. (1999). Aguilar Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269, 337–341.
- Pu J., Bechtel P.J., Sathivel S. (2010). Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates. *Biosyst. Eng.* 107, 364–371. [doi: 10.1016/j.biosystemseng.2010.10.001](https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.10.001).

R

- Rao A.R., Sarada R., Ravishankar G.A. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *J. Sci. Food Agric.* 87, 957–965. [doi: 10.1002/jsfa.2766](https://doi.org/10.1002/jsfa.2766).
- Rao C.N.R. (1963). Chemical Applications of Infrared Spectroscopy. *Academic Press, New York -London*.
- Repajić, M.; et al. (2020). Accelerated solvent extraction as a green tool for the recovery of polyphenols and pigments from wild nettle leaves. *Processes* 8. <https://doi.org/10.3390/pr8070803>.
- Richter, B. E.; Jones, B. A.; Ezzell, J. L.; Porter, N. L.; Avdalovic, N.; Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 68, 1033-1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>.
- Rylski, M., Duriasz-Rowińska, H., Rewerski, W. (1979). The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. *Acta Physiol. Pol.* 30(3), 385-8. [doi: 10.103/00006450-01000-0000](https://doi.org/10.103/00006450-01000-0000).



S

- Sachindra N.M., Mahendrakar N.S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresour. Technol.* 96, 1195–1200.
- Savych, A., Milian, I. (2021). Total flavonoid content in the herbal mixture with antidiabetic activity. *Pharmacologyonline.* 2, 68-75.
- Shahat, A., Ibrahim, A., Hendawy, S., Omer, E., Hammouda, F., Abdel-Rahman, F., & Saleh, M. (2011). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. *Molecules*, 16(2), 1366–1377.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D.M. (2007). Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering.* 81(1), 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Sroka, Z., & Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *J. Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 753-758. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00329-0)
- Sylla, N., Bouyahya, A., Taha, D., Dakka, N., & Elhajji, H. (2021). Study of the antioxidant and antidiabetic activity in vitro of free and encapsulated phenolic compounds of olive pomace. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 36, 102126. [doi:10.1016/j.bcab.2021.102126](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102126)

T

- Tena Noelia, Aparicio Ramón, García-González Diego L. (2017). Virgin olive oil stability study by mesh cell-FTIR spectroscopy. *Talanta.* 167, 453-461. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.042>

V

- Vernès, L.; Vian, M.; Chemat, F. (2019). Ultrasound and microwave as green tools for solid-liquid extraction, in Liquid-Phase Extraction. *Elsevier*, 355–374. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00012-8>.



- Vlatcheski F., Young M., & Tsiani E. (2019). Antidiabetic effects of hydroxytyrosol: in vitro and in vivo evidence. *Antioxidants*. 8(6), 188. <https://doi.org/10.3390/antiox8060188>

X

- Xiao, X., Wang, X., Gui, X., Chen, L. and Huang, B. (2016). Natural Flavonoids as Promising Analgesic Candidates: A Systematic Review. *Chem. Biodiversity*, 13, 1427-1440. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600060>

Y

- Yajima H., Noguchi T., Ikeshima E., Shiraki M., Kanaya T., Tsuboyama-Kasaoka N. (2005). Prevention of dietinduced obesity by dietary isomerized hop extracts containing isohumulones, in rodents. *International Journal of Obesity*. 29, 991-997.
- Yang, Y., & Guo, Y. (2018). Unraveling salt stress signaling in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*.
- Yang Hong, Irudayaraj Joseph (2001). Comparison of near-infrared, Fourier transform infrared, and Fourier transform-Raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 78, 889-895. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0360-6>
- Yao, H.M., Wang, G., Liu, Y.P., Rong, M.Q., Shen, C.B., Yan, X.W., Luo, X.D., Lai, R. (2016). Phenolic acids isolated from the fungus *Schizophyllum commune* exert analgesic activity by inhibiting voltage-gated sodium channels. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 14(9), 661-670. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30078-](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30078-)





CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La valorisation des déchets agricoles fait l'objet actuellement de nombreuses études phytochimiques et biologiques. Généralement, ces coproduits sont riches en composés naturels pouvant être valorisés dans les secteurs alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés aux études chimiques et biologiques des grignons d'olive mais surtout à l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques à partir de ce coproduit.

La première partie a été consacrée aux études chimiques et biologiques de l'extrait éthanolique de grignons d'olive. Nous avons préparé l'extrait par une macération conventionnelle dans l'éthanol. Cet extrait a été soumis à un criblage des tests phytochimiques. Ces tests ont montré que notre extrait est riche en composés phénoliques. Afin d'identifier le type de composés chimiques présents, une analyse par LC-MS a été mise en œuvre. 71 métabolites secondaires ont été détectés dont 59 composés ont été identifiés. Ces composés appartiennent à différentes classes et familles chimiques telles que, les phénols simples, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les sécoiridoïdes. Les résultats de cette étude ont montré que notre extrait contient majoritairement l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide caféïque, l'acide quinique, l'acide *p*-coumarique, l'oléoside, l'oleuropéine aglycone, la lutéoline et le verbascoside.

Cette richesse en composés phénoliques nous a amené à évaluer l'activité antioxydante de cet extrait (par DPPH, CAT et FRAP), l'activité antidiabétique (*in-vitro* et *in-vivo*) et l'activité analgésique. Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par les deux méthodes DPPH et FRAP ont montré une forte activité comparable à celle de la vitamine C. Il en est de même pour la méthode CAT qui a permis de déterminer un taux de 364,64 mg EAG/g grignons sèches. Les résultats de l'analyse *in-vitro* ont montré que l'extrait a une capacité d'inhibition intéressante contre l' α -amylase et la lipase, ce qui nous a encouragé à évaluer l'activité *in-vivo*. Les résultats ont montré que la supplémentation quotidienne de l'extrait éthanolique administrée à des rats diabétiques a la capacité d'inhiber l'activité de l' α -amylase intestinale, pancréatique et sérique de 45%, 40% et 42% respectivement. Ceci contribue à la diminution du taux de glucose sérique de 36%. Ces résultats pourraient être dus à la présence de l'hydroxytyrosol, de l'oleuropéine et de certains flavonoïdes comme la rutine. L'extrait a montré également une capacité analgésique par son



aptitude à inhiber 52% du nombre total de crampes des souris. Ces résultats pourraient être liés à la présence de certains composés de la famille des flavonoïdes comme la quercétine, la rutine, la lutéoline et l'apigénine, et aussi de la famille des acides phénoliques comme l'acide vanilique.

La richesse des grignons d'olive en composés phénoliques et l'importance de leurs activités biologiques nous a amené à réaliser des études d'optimisation de l'extraction de ces composés à partir des grignons. Afin de trouver le meilleur ratio éthanol-eau comme solvant d'extraction, une prédiction théorique a été mise en œuvre à l'aide du logiciel COSMO-RS suivie d'une étude expérimentale. Les résultats de ces travaux ont montré que les meilleurs rendements ont été obtenus avec un ratio 60/40 EtOH/H₂O à une température de 50°C. Une étude de la cinétique d'extraction a montré que 20 min est le temps nécessaire pour terminer l'extraction et que la température de 50°C a donné les rendements les plus importants. Finalement, une étude d'intensification des rendements d'extraction à l'aide de nouvelles technologies a été mise en œuvre tout en utilisant les conditions expérimentales déjà fixées. Nous avons pu conclure que les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'ASE suivie de ceux de l'US-P et de l'US-B. Les techniques BM et MW ont été les moins performantes. Les rendements obtenus par ces dernières restent supérieurs à ceux relatifs au procédé de référence la macération.

Dans la troisième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir solubilisant de deux huiles végétales pour les composés phénoliques des grignons d'olive. L'optimisation des conditions d'extraction a été menée à l'aide d'un plan factoriel complet à trois variables à deux niveaux. Une étude cinétique préliminaire nous a amené à fixer un temps de 45 min pour le procédé d'extraction de référence, la macération. Les trois facteurs sont : type d'huile (huile de maïs et huile d'olive), la température (25°C et 65°C) et la méthode d'extraction (MC et US), ce qui a conduit à réaliser 8 expériences (2³). Les extraits obtenus ont été quantifiés en composés phénoliques. Les résultats ont montré que l'huile d'olive a un pouvoir de solvatation plus important que celui de l'huile de maïs ; L'extraction assistée par US-B est plus efficace que la macération conventionnelle et la température optimale a été 65°C.

Les résultats de l'analyse statistique ont montré que tous les paramètres ont eu un effet linéaire positif sur le rendement d'extraction avec la dominance de la variable de type d'huile. Les interactions de 2^{ème} ordre, ont été trouvées aussi significatives alors que l'interaction de 3^{ème} ordre ne l'a pas été. L'analyse de la réponse sous forme de surface 3D et des courbes



d'iso-réponses ont confirmé l'importance de l'interaction huile-température et son effet sur le rendement d'extraction. Ces résultats nous ont conduits à conclure que l'huile d'olive est un solvant plus efficace que l'huile de maïs pour l'extraction des composés phénoliques des grignons d'olive. Ce pouvoir de solvatisation est lié à la présence de certains composés minoritaires dans la composition chimique de l'huile d'olive comme les diglycérides, les monoglycérides ainsi que certains phospholipides, qui sont quasiment absents dans l'huile de maïs. En conclusion générale, ces études nous ont permis de montrer que le grignon, coproduit oléicole constitue une source naturelle riche en composés bioactifs qui pourraient être valorisés dans les secteurs cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques.

En perspective, pour la continuité de notre travail, nous envisageons de :

- d'évaluer d'autres activités biologiques de l'extrait éthanolique comme l'activité anti-Alzheimer par l'évaluation de l'effet d'administration d'un extrait de grignons d'olive aux souris atteintes de la maladie d'Alzheimer sur le taux d'acétylcholine dans la fente synaptique (inhibition des enzymes cholinestérase responsables de la dégradation de l'acétylcholine). L'activité antibactérienne peut aussi être évaluée contre différents types de souches comme *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* et *Escherichia*.
- d'étudier le pouvoir solubilisant d'autres huiles végétales comme l'huile de tournesol, l'huile de colza et l'huile de soja ; et améliorer leur pouvoir solubilisant par l'ajout de certains additifs naturels à savoir les mono- et les diglycérides ainsi que les phospholipides.
- de formuler des préparations cosmétiques ou alimentaires contenant un extrait phénolique issu de grignons d'olive ou une huile végétale enrichie en polyphénols dans le but d'assurer la stabilité oxydative du produit et de prolonger sa durée de vie par exemple.