



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences alimentaires
Spécialité Sciences des corps gras



Réf :

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

MASTER

**Incorporation des antioxydants dans l'huile
d'olive**

Présenté par :
LADJOUZE Baya
Soutenu le : **25 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Dr.N.Nabet	MCB	Président
Pr. K.Madani	Professeur	Encadreur
Mme. Achat Sabiha	MCA	Co-Promotrice
Mme. Brahmi Nabila	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je tiens à remercier dieu le tout puissant de m'avoir donné, force courage et foie .

*Au terme de ce travail je tiens à exprimer mes remerciement et mes sincères gratitudees à mon promoteur **Mr K.Madani** qui à dirigé ce travail et m'a fait bénéficier de son expérience et ses conseils.*

*Un merci très spécial pour **Mme Achat Sabiha** pour son aide et sa contribution et ces conseils qui m'ont beaucoup aidé pour coordonner mon travail.*

Je tiens à remercier aussi tous les membres du jury pour prendre leur temps de valeur pour venir et soigneusement évaluer ce manuscrit.

Mr N.Nabet et Mme N.Brahmi .

Je remercie l'équipe L3BS et toute les merveilleuses doctorantes, Professeurs et tous les ingénieurs.

Ladjouze baya

Liste des abréviations

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

BBD : Box-Benken Design

CCM : Chromatographie sur couche mince

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DPPH : 1,1-diphényl -2-picryl-hydrazyl.

EAG : Equivalent en acide gallique.

EQ : équivalent en quercétine

EU :Enrichissement par ultrason

ESU :Enrichissement sans ultrason

HPLC : Chromatographie en phase liquide

JMP : John's Machintosh Project

ml : millilitre

pH : Potentiel hydrogène

PI : Pourcentage d'inhibition

PPT : Polyphenols totaux.

RSM: Response Surface Methodology

Liste des figures

Numéro	Titres des figures	Pages
Figure 1	Formules chimiques des principaux composés présents dans l'huile d'olive	10
Figure 2	Structure des tocophérols	10
Figure 3	Structures des principaux stérols de l'huile d'olive	11
Figure 4	Photographie originales des graines de pins	14
Figure 5	Bain à ultrasons	15
Figure 6	Procédé d'extraction des composés phénoliques des huiles végétales	16
Figure 7	Etapas du dosage des poly phénols totaux	17
Figure 8	Réaction de la structure poly phénoliques avec le radical DPPH	18
Figure 9	Protocole de détermination de l'activité antioxydants	18
Figure 10	protocole de dosages du pouvoir réducteur	19
Figure 11	protocole de dosages des flavonoïdes	20
Figure 12	Comparaison de la teneur en composés phénoliques de l'huile d'olive brute et l'huile d'olive enrichie	23
Figure 13	Comparaison entre le pourcentage d'inhibition entre l'huile d'olive brute et l'huile d'olive enrichie	24
Figure 14	Influence de la granulométrie sur le pourcentage d'inhibition et sur la teneur en composés phénoliques	26
Figure 15	Plan de prédiction réelle de l'huile d'olive enrichie	28
Figure 16	Surface de réponse de l'effet linéaire température pour les poly phénols	30
Figure 17	Surface de réponse linéaire temps pour les polyphénols	30
Figure 18	Surface de réponse linéaire ratiopour les polyphénols	31
Figure 19	Surface de réponse linéaire pour DPPH	31
Figure 20	Surface de l'interaction température –temps	32

Figure 21	Surface de l'interaction Temps –ratio	32
Figure 22	Histogramme représentant les teneurs en poly phénols des huiles enrichies	35
Figure 23	Histogramme représentant les teneurs en flavonoïdes des huiles enrichies	36
Figure 24	Pouvoir réducteur des huiles enrichies	37
Figure 25	Pourcentages d'inhibitions des huiles enrichies	38

Liste des tableaux

Chiffre	Titres des Tableaux	Pages
I	Classification de <i>pinus halpensis mill</i>	4
II	Composition chimique de <i>pinus halpensis mill</i>	5
III	Classification des antioxydants	6
IV	Composition principal des triglycérides de l'huile d'olive	8
V	Composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse	9
VI	Les bienfaits des différents composants de l'huile d'olive	12
VII	Optimisation du ratio d'extraction	15
VIII	Plan box behnken	21
IX	Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expériences box behnken	26
X	Estimation des coefficients de régression pour le rendements des composés phénoliques d'huile enrichie	28
XI	Estimation des coefficients de régression pour le rendements de l'activité antioxydants d'huile enrichie	28
XII	Condition optimales d'extraction des poly phénols et activité antioxydant	33

Liste des abréviations

Table des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction

Partie bibliographique

I.	<i>Pinus halpensis mill</i>	
	1. Origine de pinus	3
	2. Distribution géographique	3
	3. Classification de <i>pinus halpensis mill</i>	4
	4. Composition chimique	5
	5. Effet biologique et utilisations	5
II.	Les antioxydants	
	1. Définition.....	6
	2. classification.....	6
	3. Mécanisme d'action des antioxydants.....	7
III.	Huile d'olive	
	1. Définition.....	7
	2. production en Algérie.....	7
	3. Composition chimique de l'huile d'olive	8
	3.1 Fraction saponifiables	8
	3.2 Fraction insaponifiables	9
	4. Les bienfaits de l'huile d'olive	12
	5. L'enrichissement de l'huile d'olive	13

Partie pratique

I.	Matériels et méthode	
	1. Matériel végétal.....	14
	2. Huiles végétal.....	14

3. enrichissement de l'huile d'olive	14
4. Instrumentation.....	15
5. Etude préliminaire.....	15
6. extraction des composés phénoliques	15
7. analyses photochimique	16
7.1 Détermination de la teneur en composés phénoliques	16
7.2 Test DPPH	17
7.3 Pouvoir réducteur	19
7.4 Dosage des flavonoïdes	19
8. Optimisation des paramètres d'extraction par la méthode box behnken design .	20
8.1 Plan d'expériences	20
8.2 étude préliminaire	20
8.3 Condition optimale et validations du modèle	21
II. Résultats et discussion	
1. comparaison entre l'huile d'olive vierge et l'huile d'olive enrichie	22
1.1. Dosage des antioxydants poly phénols totaux	22
1.2 activité antioxydante	23
2. étude préliminaires	24
2.1 Choix du ratio	24
2.2 Plan d'expériences box behnken design	25
2.2.1 validation du modèle	26
2.2.2 Solution optimale	32
3. Dosages des antioxydants	34
3.1 Polyphénols totaux	34
3.2 flavonoïdes	35
4. Activité antioxydants et anti radicalaire	35
4.1 Pouvoir réducteurs	35
4.2 Pouvoir antiradicalair	36
Conclusion	38

Références bibliographique

Annexe

Introduction

Depuis quelques années la popularité croissante du régime méditerranéen est devenue largement associée à la santé améliorée et le bien être qui semble être attribué à la haute consommation d'huile d'olive qui représente la source des acides gras essentielles de ce régime.

Parmi les propriétés saines de l'huile d'olive, d'une part sa capacité d'abstenir les maladies qui peuvent être liées aux dégâts oxydatifs comme les inflammations, les insuffisances coronariennes et plusieurs types de cancers ; d'autre part sa capacité d'établir un excellent équilibre entre les acides gras saturés et non saturés bien que ce soit la seule huile végétale qui peut être consommée dans son état brute (**Abdallah et al, 2018**).

L'huile d'olive est constituée d'acides gras de caroténoïdes, de composés phénoliques notamment les flavonoïdes, les polyphénols sont des antioxydants qui confère à cette huile sa stabilité contre des oxydants. La teneur en composés phénoliques est un facteur important à considérer dans l'évaluation de la qualité de l'huile d'olive vierge (oov) (**viellet et al, 2010**).

Une bonne combinaison pour assurer un apport optimal de poly phénols par le biais habituel de l'alimentation serait de produire de l'huile d'olive vierge enrichie avec des polyphénols bioactifs bien connus d'où l'intérêt de cette étude.

Pinus halpensis mill connu comme une plante médicinale aux activités antiseptiques et anti-inflammatoires, antioxydants, antinéoplasiques. Les graines riches en lipides et en acides gras sont largement utilisées dans la préparation des plats traditionnelles, un remède naturel contre plusieurs maladies dont un effet sur la fatigue et l'antivieillessement.

Les propriétés biologiques de cette espèce sont dues à la richesse de ces graines en polyphénols, elle possède également, une très large gamme de nutriments bénéfiques pour la santé humaine. En effet, elle pourrait contribuer à l'apport alimentaire global car elle constitue une très bonne source de sucres, de protéines et d'acides gras essentiels ce qui justifie l'importance non négligeable de composés phénoliques et d'huiles essentielles qui sont de très bons agents thérapeutiques qui pourraient orienter vers l'utilisation de ces graines dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques (**Kadri, 2013**).

L'enrichissement de l'huile d'olive vierge avec des antioxydants naturels contenus dans les graines de *Pinus halpensis mill* broyées est l'objectif de la présente étude, qui vise pour la première fois, à un enrichissement de l'huile d'olive vierge avec les composés

phénoliques de *pinus halpensis mill* extraits par ultrasons. Cette technique d'extraction permet d'améliorer l'extraction de produits naturels à partir de matériel végétal.

Ce travail englobe deux aspects : l'optimisation des conditions d'enrichissements d'huile d'olive vierge par des graines de pins broyées , le second aspect vise à évaluer le potentiel d'enrichissement d'huile d'olive enrichie avec ultrasons et huile d'olive enrichie sans ultrasons obtenue aux conditions optimales.

Partie bibliographique

I. L'espèce *Pinus halpensis mill*

I.1. Origine de pinus

Pinus halpensis Mill (pin d'Alep) est une espèce cultivée dans la région méditerranéenne, son arbre est le plus répandu en Algérie avec une surface de 900 000 hectares, le fruit est de forme sphérique avec des cônes et des aiguilles brunes, ces graines gris –noir sont logées dans des cornes et elles sont riches en huiles essentielles aromatiques. Le contenu varie en raison des différentes espèces et de facteurs (**Kadri et al., 2015**).

I.2. Distribution géographique

Pinus haplensis mill est distribuée dans la région méditerranéenne ou elle couvre plus de 25000km² et domine les régions forestières semi arides et arides. Son aire de répartition s'étend de l'Afrique du nord (Maroc , Algérie, Tunisie , Libye) et Moyen Orient jusqu'au sud de la méditerranée (Croatie , ile de France , Espagne), elle peut pousser sur des sols pauvres et très calcaires (**Djerrad et al., 2015**).

Elle comprend l'une des cultures les plus importantes car elle est une espèce pionnière résistante à la sécheresse. En Algérie, les 4 espèces de pins les plus abondantes sont *p.halpensis mill*, *p.pinaster* qui sont sauvages, tandis que *P. pinea* et *P. canariensis* sont essentiellement cultivées, elles ont été introduites au début du 20 siècles, sans connaître les origines des graines (**Kadri et al., 2013**).

I.3. Classification de *pinus halpensis mill*

Le genre *Pinus* appartient à la famille des Pincacea contenant 250 espèces, les deux principales sont : *Pinus halpensis mill* et *Pinus brutia* (**Şan et al., 2015**).

La classification de cette espèce est comme suite:



Tableau I : classification de *Pinus halpensis mill* (Şan et al., 2015).

Embranchement	Phanérogames
Sous embranchement	Gymnospermes
Ordre	Pinales
Famille	Pinacée
Genre	Pinus
Section	Pinaster
Espèce	<i>Pinus halpensis mill</i>

I.4. Compositions chimique de *pinus halpensis Mill*

L'espèce *Pinus halpensis mill* est riche en huiles végétales , en composés phénoliques et en acide gras insaturés, minéraux comme le montre le tableau II .

Tableau II :Compositions chimiques de *Pinus halepensis mill*

<i>Pinus halepensis mill</i>	composition	Références
<p>Aiguilles</p> 	<p>Les aiguilles sont riches en huiles essentielles aromatiques et contiennent des mono terpènes principaux composant volatils.</p>	(Kadri <i>et al.</i> , 2013)
<p>Graines</p> 	<p>Les graines sont riches en huiles végétales , en acides gras ; l'acides gras majeure est l'acide linoléique et oléique.</p> <p>La graine contient des AGI 76%, une quantité appréciable de minéraux, le phosphore, le potassium et le magnésium sont les éléments les plus dominants.</p> <p>Riche en protéines, en composés phénoliques et flavonoïdes ; Pauvre en composés volatiles.</p>	(Kadri <i>et al.</i> ,2015)

I.5 Effet biologique de *Pinus halepensis mill*

Les graines de pins sont utilisées en médecine traditionnelle et elles ont de nombreux effets à savoir la prévention des maladies coronariennes, maladies cardiaques (Cheikh-Rouhou *et al.*, 2006), effets sur la fatigue et l'antivieillessement , activité anti-inflammatoire et antinéoplastique, activité antioxydante , et elles sont utilisées aussi dans les industries alimentaires et cosmétiques (Kadri *et al.*, 2015) .

II. Les antioxydants

II.1. Définition

Les antioxydants sont des substances ajoutées à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air et qui inhibe l'oxydation d'un substrat, alors qu'ils se présentent en concentrations très faibles dans le milieu où ils interviennent (Sies, 1993). Ils agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres agissent en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène pour la transformer en chaleur. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Huang *et al.*, 2004).

II.2 Classification

Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions, leurs localisations cellulaires et leurs origines.

Tableau III : classification des antioxydants

	Antioxydant	Références
Antioxydant synthétique	-butylhydroxyanisole (BHA). -butylhydroxytoluène(BHT) -le gallate propylée (PG) -tétrabutylhydroquinone (TBHQ)	(Wang <i>et al.</i> ,2003)
Antioxydant d'origine végétale	-tocophérol : α , β , δ et γ . -caroténoïde : la lutéine, β carotènes, xanthophylles -polyphénol	(Silva <i>et al.</i> , 2006) (Sebei <i>et al.</i> , 2007)
Antioxydants enzymatiques	Enzymes primaires SOD, Catalase, Glutathion Peroxydase	(Ratnam <i>et al.</i> , 2006)

Enzymes secondaires

Glutathion réductase,
déshydrogénase glucose-6-
phosphate

II.3 Mécanismes d'actions des antioxydants

L'oxydation est l'un des processus les plus producteurs des radicaux libres dans les aliments et les tissus vivants. Ces radicaux causent des dégradations majeures dans les macromolécules et l'acide nucléique (**Bubonja-Sonje et al. 2011**).

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif, l'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (**Favier, 2003**).

Ces antioxydants exécutent leurs activités par de nombreux mécanismes, d'une manière générale un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus vite que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol (**Berset et Cuvelier, 1996**). De plus, leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqués par l'oxygène moléculaire prévenant ainsi l'initiation de la formation des radicaux libres, diminuant la concentration d'oxygène contenu dans l'huile et décomposant les peroxydes (**Dais et Boskou, 2009**).

III. Huile d'olive

III.1. Définition

L'huile d'olive vierge est l'une des huiles végétales les plus appréciées dans le monde, c'est une huile végétale du fruit de l'olivier *olea europaea* obtenue seulement par des méthodes mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions thermiques notamment qui n'entraînent pas d'altération de l'huile et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration (**Peñalvo et al. 2016**).

III.2. Production en Algérie

En Algérie, l'olivier compte environ 32 millions d'arbres distribués sur une superficie d'environ 328.884 hectares soit 34,09% du verger arboricole national. L'olivier, de part ses fonctions multiples de lutte contre l'érosion, de valorisation des terres agricoles et de fixation des populations dans les zones de montagne, s'étend sur tout le territoire

national, il se concentre notamment dans trois principales régions : la région du Centre (54%), la région de l'Est (29%) et la région de l'Ouest (17%). Pour la région centre, l'essentiel du verger oléicole de cette zone (95%) est occupé par les wilayas de Bejaïa, Tizi-Ouzou et Bouira. Les wilayas de Guelma, Sétif, Jijel et Skikda détiennent (68%) du verger oléicole de la région Est ; et enfin, la région Ouest (71%) du verger est occupée par les wilayas de Mascara, Sidi Bel abbés, Relizane et Tlemcen (**Sekour ,2012**).

III.3. Composition chimique de l'huile d'olive

L'huile d'olive vierge a une saveur délicate et unique qui la distingue des autres huiles végétales comestibles, sa composition chimique est très complexe mais ces composants peuvent être divisés en deux fractions : la fraction saponifiable comprends 98-99% du poids total de l'huile et il est principalement formée par des triacylglycérides. la mineure fraction de composants environ 2 % du poids total comprend plus de 230 composés, principalement des pigments, des alcools aliphatiques et triterpéniques, des stérols , hydrocarbures , composés volatils et phénoliques (**Bajoub et al., 2017**).

III.3.1. Fraction saponifiable

- **Les triglycérides:** ce sont des esters d'acides gras et du glycérol, les glycérides constituent le principal composant de l'huile d'olive, le triglycérides majoritaire de l'huile d'olive est la trioléine OOO (**tableau IV**) (**Rouas et al., 2016**).

Tableau IV: Composition principal des triglycérides de l'huile d'olive (**Azadmard-Damirchi 2007**)

Nature	Glycérides %
OOO	40-59
POO	12-20
OOL	12,5-20
POL	5,5-7
SOO	3-7

O : acide oléiques / **P** : acide palmitique / **L** : acide linoléique / **S** : acide stéarique

- **Les acides gras :** La variabilité en acides gras dans l'huile d'olive est relativement importante, mais en moyenne, elle se compose de 72% d'acides gras mono- insaturés

(AGMI), 14% d'acides gras polyinsaturés (AGPI) et 14% d'acides gras saturés (AGS) (Aparicio et Harwood, 2013).

Les principaux acides gras de l'huile d'olive sont représentés, dans le tableau V.

Tableau V: Composition en acide gras par chromatographie en phase gazeuse (Aparicio et Harwood, 2013)

ACIDES GRAS	Symboles	Nombres en % (codex alimentaires)
Acides myristique	C14 :0	≤0,03
Acide palmitique	C16 :0	7,5-20
Acide heptadécanoïque	C17 :0	≤0 ,3
acide palmitoléique	C16 :1n-7	0,3-3,5
Acide heptadécénoïque	C17 :1	≤0,3
Acide stéarique	C18 :0	0, 5-5
Acide oléique	C18 :1n-9	55-8 3
Acide linoléique	C18 :2n-6	2,5-21
Acide a-linolénique	C18 :3n-3	≤1
Acide arachidonique	C20 :0	≤0,6
Acide gadoléique	C20 :1n-9	≤0 ,4
Acide béhénique	C22 :0	≤0,2
acide lignocérique	C24 :0	≤0,2

III.3.2. Fraction insaponifiable

- **Composés phénoliques**

L'huile d'olive vierge est riche en composés phénoliques appartenant à diverses familles (phénols et hydroxyphénols, acides et alcools phénols, sécoïridoïdes, lignanes, flavonoïdes,...), les polyphénols affectent fortement les propriétés sensorielles de l'huile d'olive vierge comme le goût amer et piquant typique et contribuent à la stabilité de l'huile d'olive vierge lutte contre l'auto oxydation. La quantité de polyphénols dans l'huile d'olive vierge varie en fonction de plusieurs facteurs tels que la zone géographique , les conditions agro climatiques , le degré de maturité des fruits (Talhaoui et al.,2016).

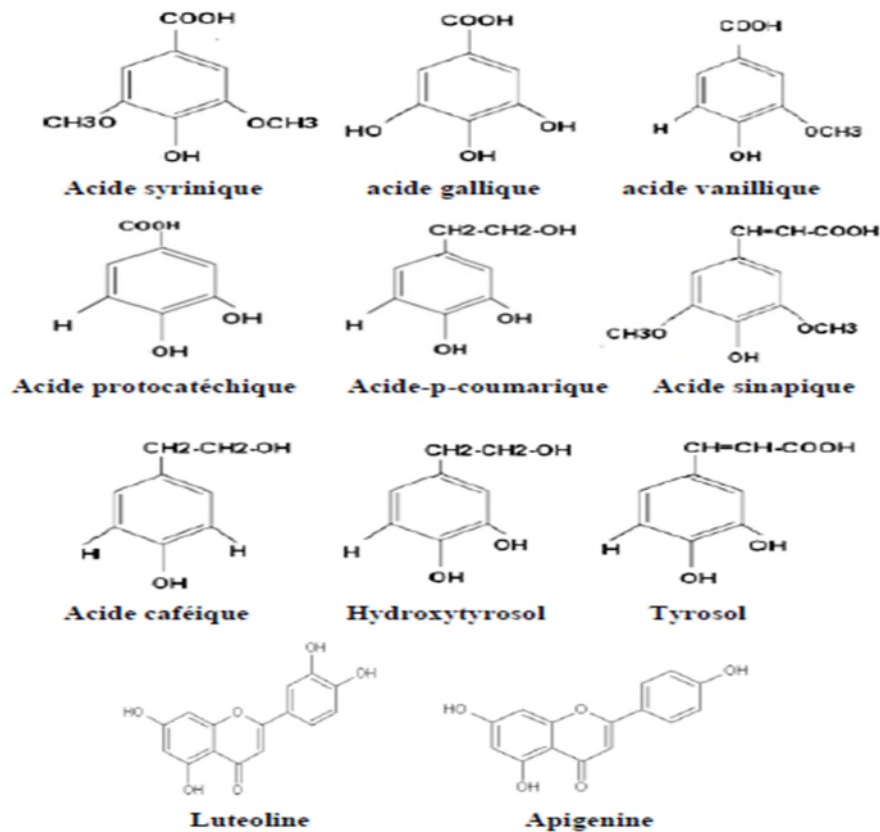


Figure 1 : formules chimiques des principaux composés phénoliques présents dans l'huile d'olive (Ollivier et al. 2004).

• Tocophérols

Les tocophérols sont des composés importants de l'huile d'olive en raison de leur double action bénéfique. En effet, ils ont tout d'abord l'avantage d'être une vitamine E et ils ont également une forte activité antioxygène en raison de leur contribution à la stabilité oxydative et à la qualité nutritionnelle. La molécule de tocol constitue la structure de base des tocophérols, elle est constituée d'un noyau hydroxychromane sur lequel est fixé une chaîne phytyle entièrement saturée (Haddam et al., 2014).

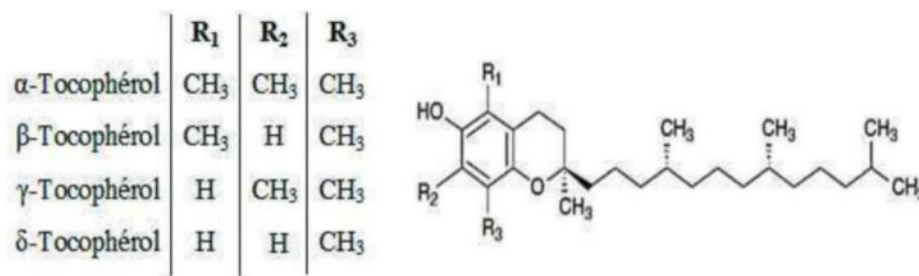


Figure 2: structure des tocophérols (Chanforan, 2010).

- **Les stérols**

Les stérols se trouvent dans l'huile d'olive sous forme libre ou estérifiée avec les acides gras et représentent les constituants majeurs de la fraction insaponifiable (**Leroy, 2001**). La quantité totale de stérols dans l'huile d'olive vierge extra varie de 113 à 265mg/100g dont le principal stérol, est le β -sitostérol, qui représente jusqu'à 75-90 % du total, le delta-5 avénastérol (3 à 14%), le campésterol (2à 4%), le stigmastérol (1 à 2%) et le cholestérol (<0,3) (**Velasco et Dobarganes, 2002**).

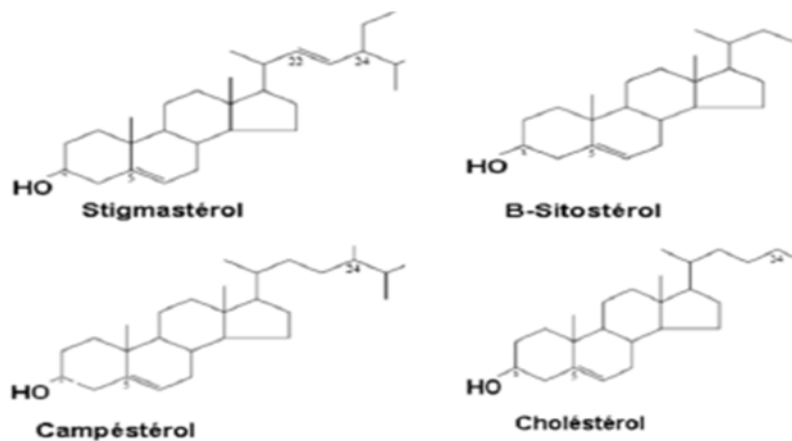


Figure 3 : Structures des principaux stérols de l'huile d'olive (**Kamal-Eldin, 2005**).

- **Les hydrocarbures**

Ce sont quantitativement les principaux composants de la fraction insaponifiable présents dans les huiles végétales ; ils sont à chaînes linéaires ou cycliques, saturées ou insaturées. Ils représentent 30 à 50 % de cette fraction. Le composant majeur est le squalène un terpène insaturé (isoprénoïde) (C₃₀H₅₀) et il est un précurseur métabolique du cholestérol et d'autres stérols (**Sanchez-Fidalgo et al. 2010**).

- **Les pigments**

Les principaux pigments présents dans les huiles sont les chlorophylles et leurs produits de dégradation et les caroténoïdes (**Salvador et al. 1998**).

La couleur de l'huile d'olive est le résultat des pigments (chlorophylles 80% et caroténoïdes 20%), les pigments ont un caractère antioxydant dans l'obscurité et pro-oxydant dans la lumière ils semblent jouer un rôle important dans la stabilité oxydative de l'huile au cours de son stockage (**Oueslati et al. 2009**).

III.4. Les bienfaits de l'huile d'olive pour la santé

Les bienfaits des différents composants de l'huile d'olive pour la santé sont représentés dans le tableau VI ci-après

Tableau VI : Effets thérapeutiques de l'huile d'olive .

Action de l'huile d'olive sur certaines maladies		
Composés	Effets	auteurs
acides gras	<ul style="list-style-type: none"> -diminuent le risque des maladies cardiovasculaires. - les acides gras poly-insaturés semblent plus impliqués dans la protection vis-à-vis de certains cancers. - améliorent la mémoire et donc réduisent le risque de maladie d'Alzheimer . - ralentissent la pénétration des acides gras dans les parois des cellules artérielles. 	<p>(OUEDRHIRI et al. 2016)</p> <p>(Ghedira ,2008)</p>
Composés phénoliques	<ul style="list-style-type: none"> - protègent l'huile de l'oxydation -réduisent le nombre de tumeurs et leur croissance. -préviennent le stress oxydant, -ont une activité anti-inflammatoire -modifient la signalisation cellulaire -protègent des isoflavones observés dans les modèles de cancers mammaires et prostatiques -inhibent l'absorption du glucose au niveau intestinal - diminuent le risque de diabète de type II -ont un effet antioxydant - réduisent l'inflammation associée à certains processus pathologiques comme l'athérosclérose 	<p>(Gigon et Le Jeune ,2010)</p>
Tocophérols	<ul style="list-style-type: none"> -Limitent le processus d'oxydation radicalaire, -inhibent leur oxydation. 	<p>(Veillet et al. 2010)</p>

III.5 L'enrichissement de l'huile d'olive

L'enrichissement de l'huile d'olive est réalisé de trois manières différentes :

- L'extraction par solvant extraction liquide-liquide dans laquelle l'huile est mise en contact avec un extrait alcoolique de phénol qui sont transférés à la phase huileuse en fonction de leur facteur de répartition, en éliminant la phase alcoolique par centrifugation (**Japón-Luján et Luque de Castro ., 2008**).
- L'autre méthode est l'extraction solide-liquide dans laquelle l'extrait phénolique purifié est séché dans des conditions appropriées et la pâte obtenue est partiellement dissoute dans l'huile en fonction de la solubilité des différents composants de la pâte dans la phase huileuse.
- La troisième méthode est la combinaison de ces deux procédures dans lesquelles l'extrait alcoolique et l'huile sont mis en contact ; et le système à deux phases est soumis à l'élimination de l'alcool dans un évaporateur rotatifs (**Japón-Luján et al., 2008**) .

Matériel et méthodes

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériel végétal

Les graines de pins de *Pinus halpensis Mill* ont été récoltées durant le mois de mars 2018, elles ont été obtenues du parc National de Djurdjura. elles ont été nettoyées pour enlever la poussière et débris, séchées dans une étuve à 40°C pendant deux jours jusqu'à obtenir une masse constante et finement broyées à l'aide d'un broyeur électrique (Moulinex) pour obtenir une poudre. Puis enfin conservées dans des contenants pour un usage ultérieurs.

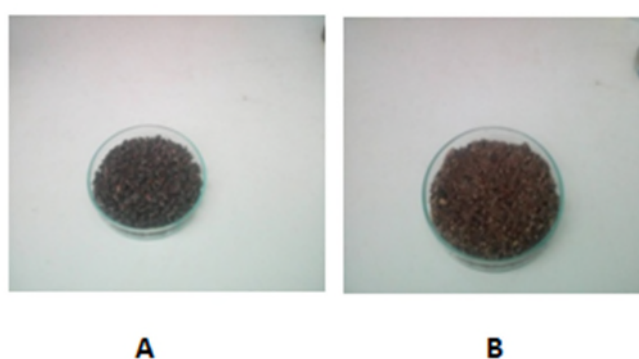


Figure 4 : Photographie des graines de pins.

A graines de pins , **B** graines de pins broyées

I.2. Huile végétale

L'huile d'olive vierge utilisée dans ce travail provient de la région de Seddouk obtenue par des moyens d'extraction exclusivement mécanique à partir du fruit de l'olivier (*olea europaea*).

I.3. Enrichissement de l'huile d'olive

L'objectif de cette étude est l'optimisation de l'enrichissement de l'huile d'olive vierge avec des polyphénols des graines de pins par deux méthodes :

- Macération assistée par ultrasons : L'enrichissement de l'huile d'olive vierge avec les graines de pins broyées a été réalisée comme suit : 1,5g de graines de pins (séchées et broyées) ont été introduites dans 10g d'huile d'olive vierge comme solvant, dans un bain à ultrasons durant 45min, température 22°C.

- Macération conventionnelle utilisée pour la comparaison avec les mêmes conditions(45min et température 22°C) sans ultrasons, sous agitation.
- Tous les essais d'extraction ont été répétés trois fois sauf pour le plan d'expérience.

I.4. Instrumentation

Un bain ultrasonique (Ctra. NII:585 Abrera (Barcelone) Espagne, Ultrasons H-D, fréquences:20 À 60 KHZ, Pouvoir(Puissance) : 80 à 600 W) a été utilisé pour le processus d'enrichissement.



Figure 5 : Bain à ultrasons .

I.5. Etude préliminaire

Une étude a été effectuée pour déterminer le rapport optimal solide –liquide (huile d'olive – graines de pins broyées), l'effet de la charge des graines de pins a été réalisé comme suit :

Tableau VII : optimisation du ratio d'extraction

Ratio g/ml	1,5	3
Température	22°C	
Temps	45mn	

I.6.Extraction des composés phénoliques des huiles

Principe

C'est une extraction liquide-liquide qui consiste à dissoudre l'huile dans un solvant organique et à le mélanger avec un solvant polaire pour la récupération des composés phénoliques (Tsimidou *et al.*, 1992).

Protocole

L'extraction liquide-liquide des composés phénoliques des huiles végétales étudiées (brutes et enrichies) a été effectuée selon le protocole figure 6 de (Tsimidou *et al.*, 1992).

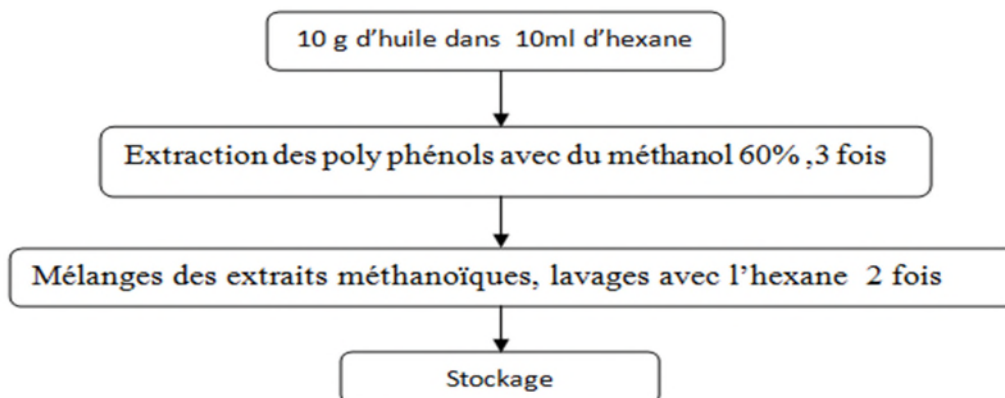


Figure 6: Procédés d'extraction des composés phénoliques des huiles végétales (Tsimidou, *et al.*, 1992)

I.7. Analyse phytochimiques

I.7.1. Détermination de la teneur en composés phénolique

Principe

L'estimation quantitative des polyphénols, a été réalisée à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu, mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀) réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃). La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 765 nm. Elle est proportionnelle aux taux de composés phénoliques.

La teneur en polyphenols totaux de l'extrait des huiles d'olive (brutes et enrichies) à été déterminée par la méthode décrite par (Negiet *al.* 2003).

la mesure spectrophotométrique a été répétée trois fois pour chaque extrait selon le mode opératoire précisé dans la figure 7 . Les données moyennes ont été interpolées dans une courbe d'étalonnage d'acide gallique et exprimées en mg d'équivalents d'acide gallique par kg d'échantillon de poids sec (**Annexe N°1**).

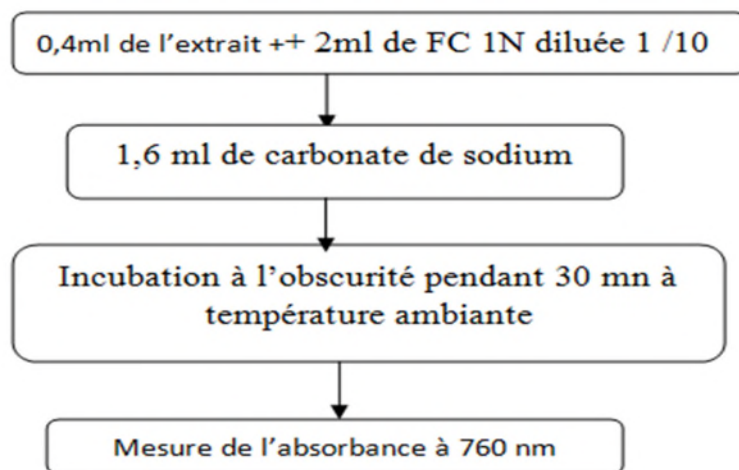


Figure 7: Etapes du dosages des poly phénols totaux (Negi et al., 2003).

I.7.2. Test DPPH

Principe

Le composé chimique, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (α , α -diphényl- β -picrylhydrazyl) possède un électron non apparié sur un atome de pont d'azote, les molécules du radical ne forment pas de dimères de sorte qu'il reste dans sa forme de monomère relativement stable à température ambiante.

C'est cette délocalisation qui provoque la couleur violet foncé caractéristique de la solution DPPH, Pour les composés phénoliques, le principal mécanisme d'action est le piégeage des radicaux libres par transfert de l'atome H sur le DPPH puis transformé en une molécule stable de DPPH. Quand la solution de DPPH qui H a été mélangée à celle d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène ou un électron. ceci provoque la forme réduite 1,1-diphényl-2 (2,4,6- trinitrophenyl) hydrogène DPPH₂ avec la perte de la couleur violette et l'apparition d'une couleur jaune due à la présence du groupement picryle (Goupy et al. 2003).

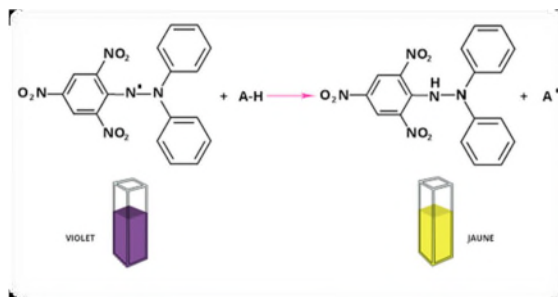


Figure 8: Reaction de la structure polyphenolique avec le radical DPPH (Dudonné *et al.*, 2009)

Les résultats sont exprimés en activité anti-radicalaire ou en pourcentage d'inhibition des radicaux libres en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité anti radicalaire} = (A_0 - A / A_0) * 100$$

Où:

A₀: Absorbance de la solution du DPPH

A : Absorbance de la solution du DPPH après réaction avec l'extrait

Protocole

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques des huiles étudiées est effectuée par la méthode décrite par Goupy *et al* (2003).

la figure 9 nous montre le protocole de dosages du test DPPH .

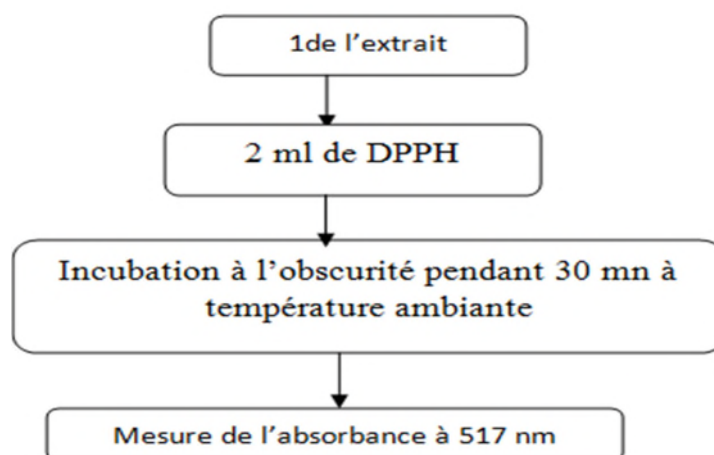


Figure 9 : Protocole de la détermination de l'activité antioxydante

I.7.3. pouvoir réducteur

Principe

La couleur jaune de la solution d'essai devient verte en fonction du pouvoir réducteur de l'extrait. la présence de réducteurs dans la solution entraine la réduction du complexe Fe^{3+} / ferricyanure à la forme ferreuse .Par conséquent, Fe^{2+} peut être surveillé par la mesure de l'absorbance à 700 nm (Zhou et Yu, 2004).

Protocole

La figure 10 nous montre le protocole de dosages du pouvoir réducteur.

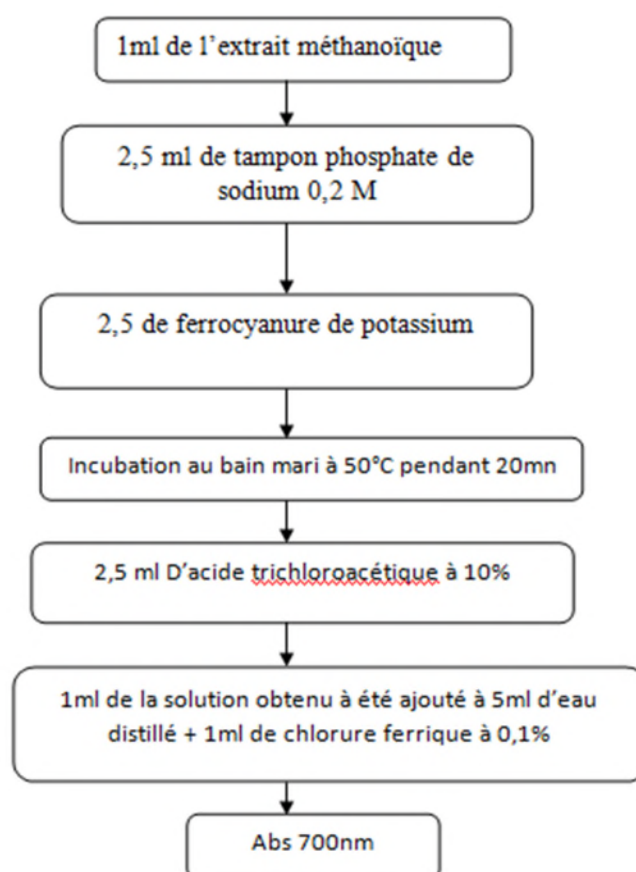


Figure 10 :protocole de dosages du pouvoir réducteur (Zhou et Yu 2004).

L'évaluation du pourcentage de réduction du chlorure ferrique par rapport aux concentrations de standard (vitamine C) est réalisée dans les mêmes conditions (Annexe N°3).

I.7.4 Dosage des flavonoïdes

Principe

Les flavonoïdes forment des complexes avec l'aluminium sous forme d'ions Al^{3+} après décomposition de chlorure d'aluminium. Les complexes formés sont responsables de l'absorption de la lumière dans le visible (**Ribéreau-Gayon 1968**).

La teneur en flavonoïdes dans les extraits a été déterminée selon la méthode décrite par (**Djeridane, Yousfi et al. 2006**). En utilisant une méthode sur la base de la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, ayant une absorbance à 430 nm.

Protocole

La figure 11 nous montre le protocole de dosages des flavonoïdes .

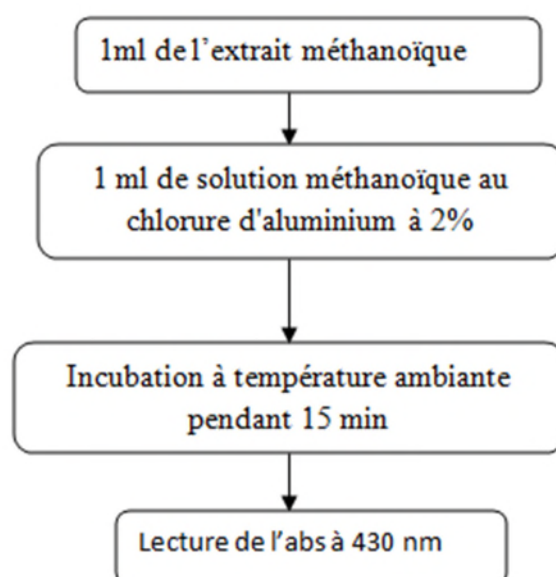


Figure 11 :protocole de dosages des flavonoïdes (**Djeridane, Yousfi et al. 2006**)

La teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg d'équivalent de quercétine (EQ)/g d'échantillon, et elle est déterminée par une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec de la quercétine (**Annexe N°2**).

I.8. Optimisation des paramètres d'extraction par la méthode **box-behnken Design (BBD)**

Dans un contexte de valorisation des produits végétaux , une méthodologie expérimentale d'extraction de substances bioactives du matériel végétal mentionné ci-dessus a été mise en place, cette étude a été consacrée à évaluer divers facteurs influençant le processus d'extraction et à déterminer les niveaux bas et haut de chaque

facteur retenu par le plan expérimental JMP 14 ; ensuite a choisir le plan expérimental approprié , la méthodologie expérimentale choisi qui devrait faciliter l'interprétation des résultats. Il doit également minimiser les tentatives sans altérer la qualité. la méthodologie de surface de réponse (RMS) a été employée pour découvrir les conditions optimales pour l'extraction des composés phénoliques , dans cette étude BBD (trois facteurs à trois niveaux) ont été appliqués, dans le total 15 expériences ont été effectuées (**Jeganatha et al, 2014**).

I.8.1. plan d'expérience

Box-behnken Design (BBD) est un modèle multivarié de second degré , possède une propriété de séquentialité dont les principales caractéristiques sont :

- Nécessité d'un numéro d'expérience $N=2k (K-1)+C_p \dots(1)$ ou K est le nombre de facteurs et C_p est le nombre de points centraux .
- Ajustement fr tous les niveaux de facteurs qui doivent être à seulement 3 niveaux (-1,0,+1) avec des intervalles réguliers(**Maran et al. 2013**).

I.8.2. Etude préliminaire

Au cours de cette étude, un plan de box-behnken a été appliqué et RSM sur les effets des trois variables indépendantes (température X1 de 15-45°C, temps X2 15-60 mn et ratio X3 5-20 g/ml) qui nous a permis de déterminer la gamme appropriée de condition pour l'extraction des composés phénoliques et DPPH . Cette dernière permettra de modéliser les réponses étudiées sous la forme d'une équation polynomiale du second degré ci-dessous (**Bezerra et al., 2008**).

$$Y=a_0+a_1X_1+a_2X_2+a_3X_3+a_4X_4+a_{12}X_1X_2+a_{23}X_2X_3+a_{34}X_3X_4+a_{13}X_1X_3+a_{14}X_1X_4+a_{24}X_2X_4+a_{11}X_1^2+a_{22}X_2^2+a_{33}X_3^2+a_{44}X_4^2+E$$

Avec : $a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_{12}, a_{23}, a_{34}, a_{13}, a_{14}$ et a_{24} : sont les coefficients de régression,

X_1, X_2, X_3 : sont les facteurs étudiés ;

y : la réponse mesurée ;

E : l'erreur.

Tableau VIII: Plan box-behnken

Nombre d'essai	X1Température	X2Temps	X3Ratio %
1	15	37,5	20
2	15	37,5	5
3	30	15	5
4	45	60	12,5
5	30	60	5
6	45	15	12,5
7	15	15	12,5
8	45	37,5	5
9	30	37,5	12,5
10	30	60	20
11	45	37,5	20
12	30	37,5	12,5
13	15	60	12,5
14	30	37,5	12,5
15	30	15	20

I.8.3. Conditions optimales et validation du modèle

Les résultats de TCP et d'activités antioxydants obtenues sont traitées par le logiciel JMP pour avoir la condition optimale, une fois ce derniers sélectionnée, on a effectué des dosages de TCP, DPPH ,flavonoïdes , pouvoir réducteur pour l'huile enrichie avec ultrasons et enrichie sans ultrasons .

Résultats et discussion

II. Comparaison entre l'huile d'olive vierge et l'huile d'olive enrichie

II.1. Dosage des polyphénols totaux

La méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est l'une des méthodes désignées pour la détermination de la teneur en composés phénoliques dans les aliments ou les plantes médicinales. La teneur en polyphénols de l'huile d'olive brute et l'huile d'olive enrichie avec les graines de pins broyées est rapportée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par 1 kg d'échantillon (mg EAG/kg), En se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions (annexe 1). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure N°12.

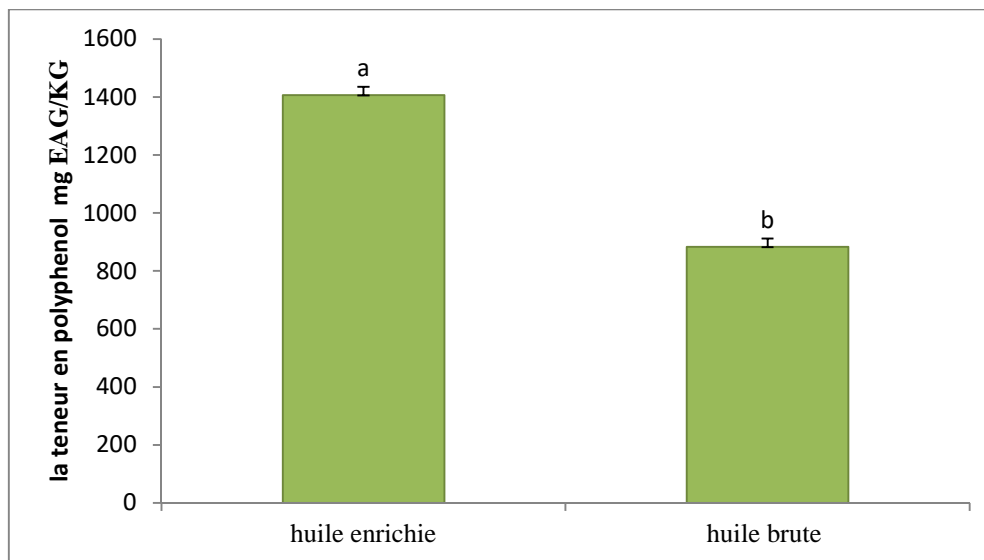


Figure 12 : Comparaison entre la teneur en composés phénoliques de l'huile brute et l'huile enrichie.

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures \pm écartype

Les valeurs avec les différentes lettres (a-b) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés;

les résultats sont classés en ordre descendant : a>b

L'analyse statistique a montré que la teneur en polyphénols de l'huile d'olive enrichie qui est de 1406mgEAG/Kg est supérieure à celle de l'huile d'olive brute avec une valeur de 883,47 mg EAG/kg .En effet, l'utilisation de l'ultrason pour l'extraction des composés bioactifs a augmenté le rendement de l'extraction.

II.1.2. Activité antioxydante

Dans la présente étude l'activité antioxydante des extraits phénoliques des huiles étudiées a été déterminée en utilisant l'activité anti radicalaire du radical DPPH.

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante. La méthode est basée sur la capacité des antioxydants à agir en tant que piègeurs de radicaux en réduisant le DPPH par un transfert d'hydrogène.

Les résultats obtenus (Figure13), ont montré que les extraits des huiles testées ont exhibé d'importantes capacités inhibitrices du DPPH.

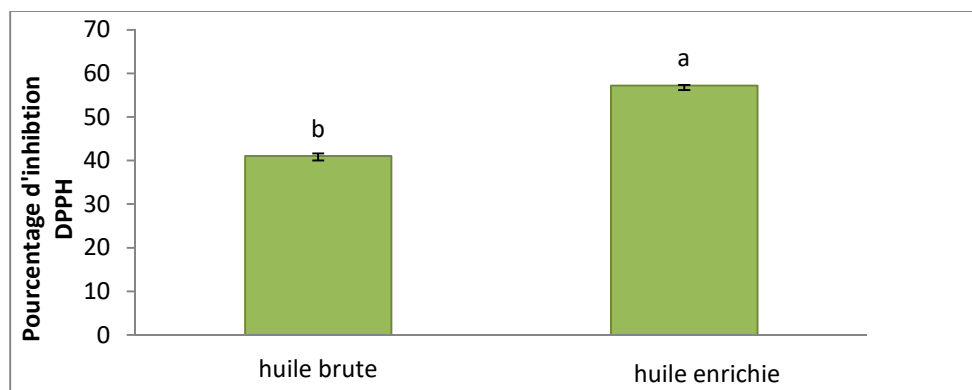


Figure 13 : comparaison entre le pourcentage d'inhibition de l'huile brute et l'huile enrichie

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures ± écartype

Les valeurs avec les différentes lettres (a-b) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés;

les résultats sont classés en ordre descendant : $a > b$

L'étude statistique des résultats (Figure 13) indique une différence significative entre l'huile enrichie et l'huile brute ($P > 0.05$).

L'effet d'inhibition du radical DPPH le plus important a été obtenu avec l'huile d'olive enrichie ($57,17 \pm 0,18\%$) par rapport à l'huile d'olive brute ($41,05 \pm 0,54\%$).

Les résultats obtenus avec ce test révèlent que les deux huiles ont des propriétés anti radicalaires et montrent également que le pourcentage d'inhibition du radical libre est meilleur dans le cas de l'huile enrichie.

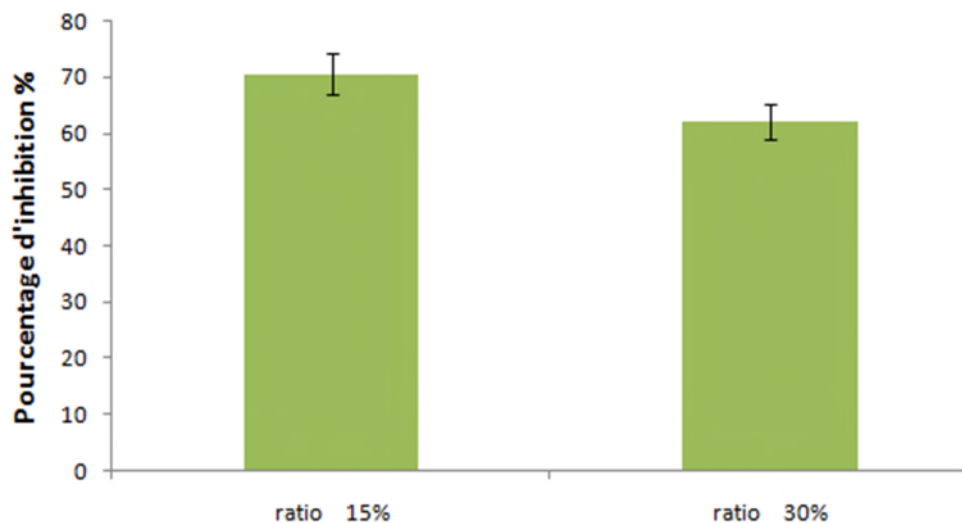
Ces résultats pourraient être liés à la richesse de l'extrait par lequel on a enrichi l'huile en polyphénols, car selon **Turkmen et al. (2007)**, les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH en raison de leur structure chimique.

Ceci suppose que, les antioxydants de l'huile et ceux des graines de pins broyées peuvent influencer en coalition vis-à-vis des radicaux DPPH.

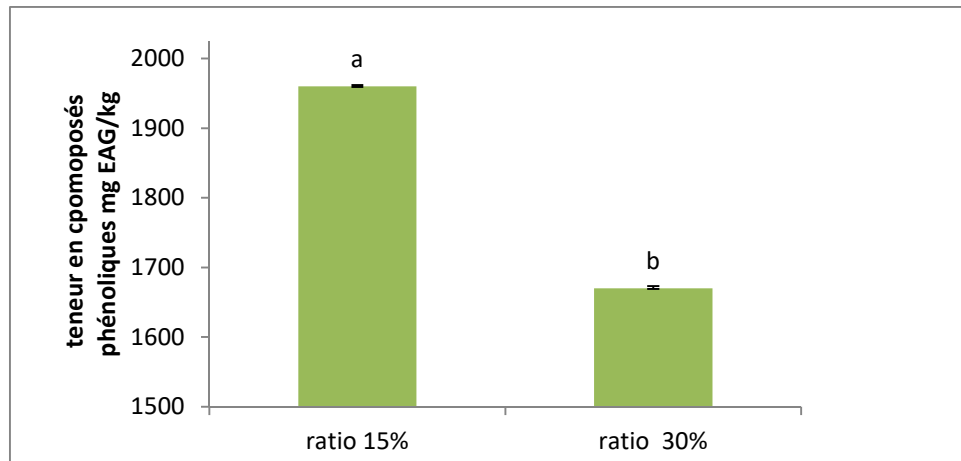
III. Étude préliminaire

III.1. Choix Du Ratio

Pour extraire le maximum de polyphénols au niveau des graines étudiées, on a procédé par une séparation de ces graines en deux ratio différents : 15 % et 30%, car ce paramètre influence considérablement sur la teneur de polyphénols totaux extraite et l'activité antioxydante. Il est généralement admis que, sous une forme broyée, la matière végétale présentera une plus grande surface de contact avec le solvant (**Bonnaillie et al., 2012**).



(A)



B)

Figure 14 : (A) : Influence de la granulométrie sur le pourcentage d'inhibition du DPPH ;
(B) : Influence de la granulométrie sur la teneur en polyphénols.

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures \pm ecartype

Les valeurs avec les différentes lettres (a-b) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés;

les résultats sont classés en ordre descendant : $a > b$

Les résultats de l'étude statistique ont révélé une différence significative entre les teneurs en polyphénols en utilisant les Ratios citées précédemment. La plus grande teneur a été enregistrée avec le ratio 15%, elle est la meilleure pour l'extraction maximale des polyphénols. Il semble qu'avec les fines particules les composés chimiques sont plus facilement transférés de la matière végétale vers le solvant d'extraction. Cela s'expliquerait par le fait que, le solvant se diffuse plus facilement à l'intérieur des petites particules pour extraire les molécules de polyphénols grâce à la création d'une surface de contact plus grande avec la diminution de la taille des particules et aussi à l'ouverture de plus grands nombres de pores. Une étude similaire a été rapportée par (Kossah et al., 2010).

III .2. Plan d'expériences box-behnken

Beaucoup de paramètres peuvent agir sur l'efficacité de l'extraction des polyphénols ainsi que sur l'effet scavenger du DPPH, tels que : la méthode d'extraction, la nature et la concentration du solvant, la température d'extraction et le temps d'extraction.

Un plan box – behnken a été réalisé pour déterminer la meilleure combinaison de variables d'extraction pour les rendements des polyphénols et l'activité antioxydante.

Trois facteurs (X1, X2, X3) à trois niveaux (-1, 0 et +1) ont été appliqués pour optimiser l'extraction (Zhong et Wang,2010).A partir, de l'enrichissement de l'huile d'olive par les graines de *Pinus halpensis mill.* Les facteurs choisis dans la présente étude sont :

- Température d'extraction (15,30,45) ;
- Temps d'extraction (15, 37.5, 60 min).
- Ratio poudre/solvant (5, 12.5,20).

Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau **IX**.

Tableau IX : Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expérience Box-Behnken.

Ess-ai	configuration	X1 Température	X2 Temps	X3 ratio	Valeurs réelles TPC mgEAG / /KG	Valeur prédites de TPC mgEAG / KG	Valeur réelles DPPH%	Valeur prédites DPPH%
1	000	30	37,5	12,5	2023,82	2050,98	70,57	71,06
2	000	30	37,5	12,5	2163,54	2050,98	71,06	71,06
3	000	30	37,5	12,5	1965,6	2050,98	71,55	71,06
4	--0	15	60	12,5	1311,25	1306,32	45,13	46,30
5	++0	45	60	12,5	1800,27	1805,03	53,48	54,25
6	0+-	30	60	5	1464,94	1473,015	68,42	66,92
7	0-+	30	15	20	1697,81	1689,73	66,78	68,27
8	0++	30	60	20	1560,36	1552,43	65,5	65,04
9	-0-	15	37,5	5	1680,92	1677,76	45,85	46,16
10	0--	30	15	5	1660,73	1668,65	65,92	66,37
11	-0+	15	37,5	20	1500,59	1513,43	48,35	47,63
12	+-0	45	15	12,5	1703,63	1708,55	55,63	54,45
13	+0+	45	37,5	20	1960,62	1963,77	53,28	52,96
14	--0	15	15	12,5	1740,52	1735,75	49,56	48,78
15	+0-	45	37,5	5	1711,78	1698,93	53,71	54,43

Les résultats de la présente étude ont montré que, les teneurs en composés phénoliques varient entre 1311,25 et 2023,82 mg EAG/kg de MS, l'activité antioxydant par contre, varie entre 45,85% à 71,06%. Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (température, temps et ratio) sur les taux des polyphénols extraits ainsi que sur les pourcentages d'inhibition du radical DPPH.

III.2.1. Validation du modèle

Dans les plans d'expériences, le modèle mathématique assemble la réponse aux facteurs qui l'influencent et afin d'avoir une bonne réponse, plusieurs conditions doivent être vérifiées.

II.2.2. Coefficient de corrélation

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de corrélation R^2 (Chan *et al.* 2009). Dans notre étude, la valeur de R^2 pour les polyphénols et DPPH est de 0,97 et 0,99 respectivement, ce qui signifie, qu'uniquement 0.03 et 0.01 des résultats obtenus ne sont pas valables.

De plus, la valeur du coefficient de détermination ajustée est élevée ($R^2_{ajusté} = 0,91$), ($R^2_{ajusté} = 0,97$) ce qui confirme la haute signification du modèle.

L'analyse de la variance de la régression du modèle montre que celui-ci est très significatif ($P < 0.005$) et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ($P > 0.05$) par rapport à l'erreur pure, ce qui confirme que le modèle est satisfaisant (Fei *et al.* 2010).

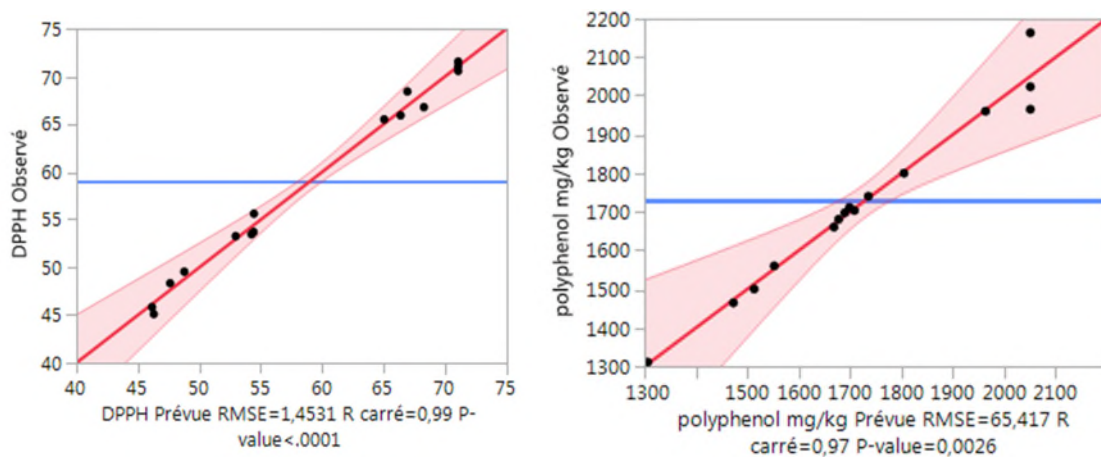


Figure 15: Plan de prédiction réelle de l'huile d'olive enrichie

III.2.3. Effet des facteurs

l'analyse de la variance de la régression des facteurs (coefficients) consiste à analyser l'impact des variables ($X_1X_2X_3$) à $p<0.05$ afin d'évaluer le degré d'influence des facteurs (température, temps, ration) sur l'extraction des substances bioactives (Uma *et al.*,2010).

Les P -value sont utilisés comme un moyen pour vérifier la signification de chaque coefficient, ce qui indique aussi l'intensité d'interaction de chaque paramètre. Les plus petits P -value présentent la plus grande signification du facteur correspondant (Liu *et al.*, 2010). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau X et XI.

Tableau X : Estimation des coefficients de régression pour le rendement des composés phénoliques d'huile enrichie.

Terme	estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob > t
Constante	2050,98	37,76	54,30	<0,0001*
X1température(15,45)	117,87	23,12	5,10	0,0038*
X2temps (15,60)	-83,23	23,12	-3,60	0,0156*
X3 ratio (5,20)	25,12	23,12	1,09	0,3269*
X1temperature*X2temps	131,47	32,70	4,02	0,0101*
X1température*X3ratio	107,29	32,70	3,28	0,0219*
X2temps*X3ratio	14,58	32,70	0,45	0,6743
X1température*X1température	-14,27	34,04	-4,33	0,0075*
X2temps*X2temps	-264,79	34,04	-7,78	0,0006*
X3ratio*X3ratio	-190,23	34,04	-5,59	0,0025*

Tableau XI : Estimation des coefficients de régression pour le rendement de l'activité antioxydant d'huile d'olive enrichie .

Terme	estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob > t
Constante	71,06	0,838	84,70	<0,0001*
X1 température	3,40	0,513	6,62	0,0012*
X2 temps	-0,67	0,513	-1,30	0,2496
X3 ratio	-0,0019	0,513	0,00	0,9971
X1température *X2temps	0,57	0,726	0,78	0,468
X1température*X3ratio	-0,733	0,726	-1,01	0,3588
X2temps*X3ratio	-0,945	0,726	-1,30	0,2501
X1température*X1température	-18,23	0,756	-24,11	<0,0001*
X2temps*X2temps	-1,87	0,756	-2,48	0,0557
X3ration*X3ratio	-2,52	0,756	-3,34	0,0205

➤ Effet linéaire

Les résultats de cette étude montrent que le facteur qui possède une influence clairement significative sur l'extraction des polyphénols sont X1 température, X2 temps et X3 ratio avec une probabilité de $P=0,0038$, $P=0,0156$, $P=0,3269$ contrairement à l'activité antioxydante qui possède une influence significative seulement avec X1 température avec $P=0,0012$.

Selon une étude réalisée par **Telli et al. (2010)**, le temps d'extraction influence considérablement sur l'extraction des polyphénols, ce qui permis de dire que l'allongement du temps d'extraction accélère d'une manière significative le pouvoir d'extraction. **Galvan D'Alessandro (2013)** a rapporté que l'augmentation de la température facilite l'extraction aussi car elle augmente la perméabilité des parois cellulaires.

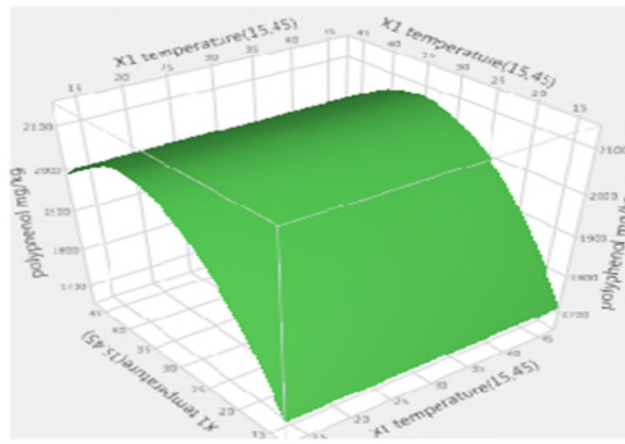


Figure16: Surface de réponse de l'effet linéaire température pour les polyphénols.

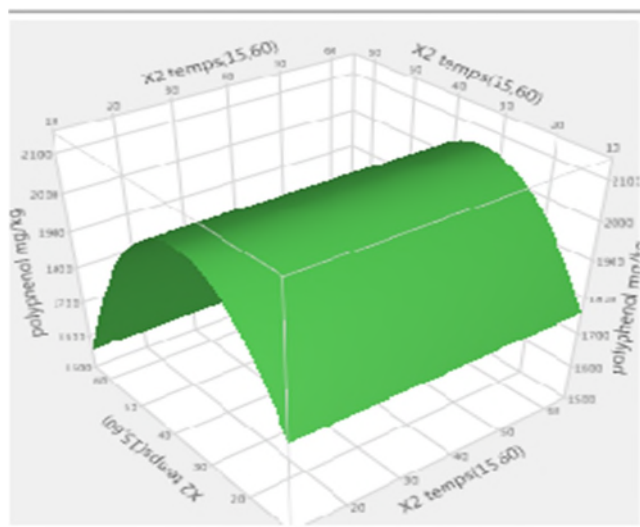


Figure 17 :Surface de réponse de l'effet linéaire temps pour les polyphénols.

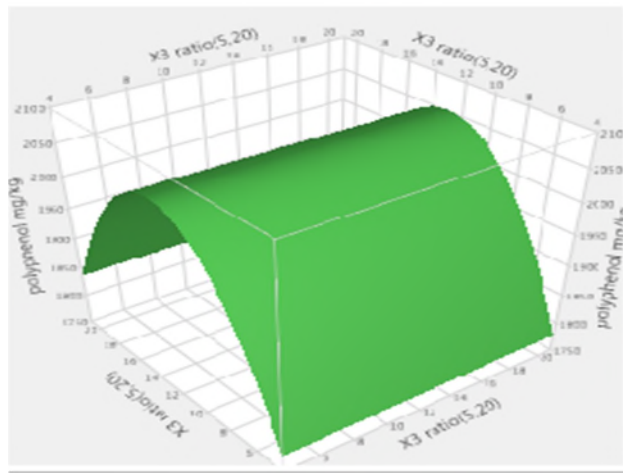


Figure18: Surface de réponse linéaire ratio pour les polyphénols.

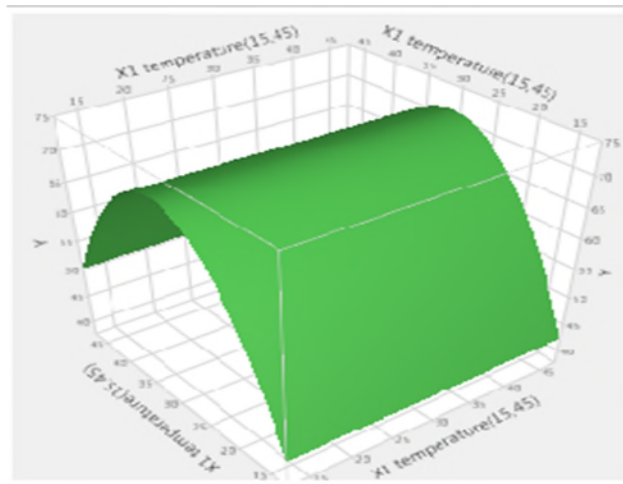


Figure 19 : Surface de réponse linéaire pour DPPH.

➤ Effet d'interaction

Les résultats indiquent que l'interaction ($X1 \cdot X2$) et ($X1 \cdot X3$) sont significatifs sur l'extraction des polyphénols avec une probabilité de $P= 0,0101$, $P= 0,0219$ respectivement et que les interactions $X2 \cdot X3$ ne sont pas significatives avec la probabilité $P=0,6743$; cependant, les résultats de l'activité antioxydante vis-à-vis du DPPH indiquent l'absence d'interaction par conséquent l'ensemble des résultats des effets exercés par les facteurs sont considérablement significatifs. Cela peut se définir par les effets multiplicateurs du traitement et le potentiel d'extractible élevés. En pénétrant profondément dans la matrice solide, le solvant peut entrer en contact avec une quantité plus grande de soluté favorisant ainsi la libération des composés phénoliques (**Bonnaillie et al. ,2012**).

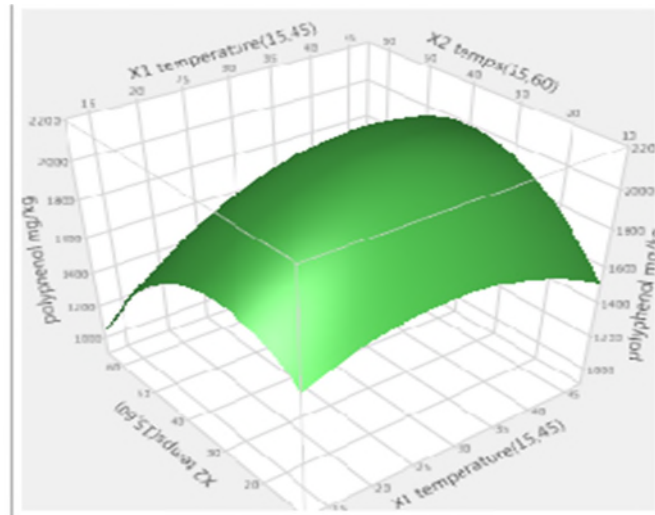


Figure 20 : Surface de l'interaction température –temps.

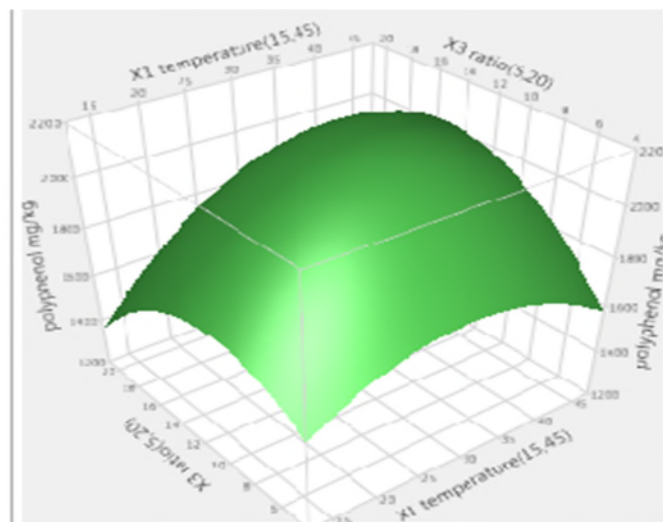


Figure 21: Surface de l'interaction temperature- ratio.

➤ Effet quadratique

Les résultats des Tableau N°X et N°XI, indiquent que les effets quadratiques X_1^2 (température-température) X_2^2 (temps-temps) et X_3^2 (ratio-ratio) sont hautement significatifs sur la teneur en polyphénols avec des probabilités respectives de $P=0,0075$; $P=0,0006$ et $P=0,0025$ pour les valeurs en antioxydants. Il a été constaté que, X_1^2 (température-température) est hautement significatifs avec une probabilité $P=0,001$.

Ces résultats montrent l'importance de la température, ratio et temps dans l'extraction des polyphénols ; il Ya un effet interactif positif entre les trois facteurs. la température a été le paramètre principal qui a influencé la libération des composés

antioxydants et composés phénoliques . L'augmentation de la température favorise la libération de ces composés qui peuvent mener aux réactions de d'oxydo-réduction (**Ramírez-Godínez et al., 2017**).

II .2.2.4. Modèle mathématique

Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné au choix préalable d'un modèle mathématique. Les modèles les plus classiques sont les modèles polynomiaux (le plus souvent de degré inférieur ou égal à deux).

Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est un modèle de deuxième degré classique qui est volontairement simplifié par élimination des effets d'interactions jugés non significatifs dans l'analyse, ce qui permet de manipuler plus facilement cette expression réduite tout en gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire (**Tinsson, 2010**). Le modèle mathématique opté dans la présente étude est représenté par la relation suivante :

$$Y_{\text{polyphenol}}=2050,98+117,87X_1-83,23X_2+131,45X_1X_2+107,29X_1X_3-147,27X_1X_1-264,79X_1^2-264,79X_2^2-190,23X_3^2$$

$$Y_{\text{DPPH}}=71,06+3,40X_1-18,23X_1^2$$

III.2.3. Solution optimale

Cette étude montre qu'un modèle polynomial d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles conduisant à une maximisation de l'extraction des polyphénols et l'activité antioxydantes, sont obtenues au sein du domaine expérimental, La méthode de désirabilité a été employée pour optimiser les variables de processus.

Tableau XII: Conditions optimales d'extraction des polyphénols et de l'activité antioxydante.

Variable	Valeurs critiques pour les polyphénols	Valeurs critique pour DPPH
Température (15-45)	30	30
Temps (15-60)	37,5	37,5
Ratio (5-20)	12,5	12,5
Valeur prévus de la solution	2050,98	71,06

La présente étude confirme les avantages de cette méthode comparant à la méthode classique d'optimisation des conditions d'extraction des antioxydants. Les résultats ont montré que la teneur en polyphénols est affectée par les trois paramètres : température suivie du temps et le ratio. Pour avoir une teneur en composés phénoliques de l'ordre de 2050 ,98mg EAG/KG huile et l'activité antioxydante est affectée beaucoup plus par la température pour obtenir une activité antioxydante de 71,06%.

III.3. Dosage des antioxydants

III.3.1. Polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols de l'huile d'olive enrichie avec ultrasons et de l'huile d'olive enrichie sans ultrasons avec macération conventionnelle sont représentés dans la figure N°22.

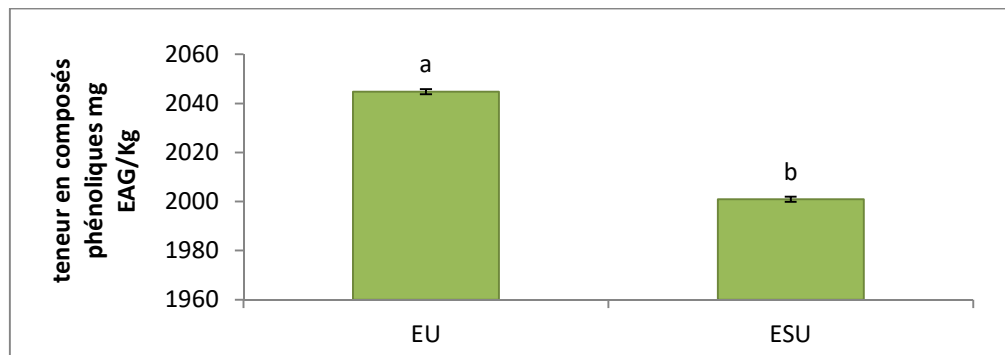


Figure 22 : Histogramme représentatif de la teneur en poly phénols des huiles enrichies.

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures \pm ecartype

Les valeurs avec les différentes lettres (a-b) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés;

les résultats sont classés en ordre descendant : $a > b$

D'après les résultats obtenus la teneur en polyphénols totaux de l'échantillons enrichie avec ultrasons est proche de celle de l'intervalle de prédiction du plan d'expériences 2044,79 estimée à 2050,98 mg EAG / Kg . L'étude statistiques a montré une différence significative entre la teneur en polyphénols $P < 0,05$ des deux échantillons enrichies.

L'échantillon enrichie avec ultrasons est plus riche que l'échantillon enrichie avec macération conventionnelle, avec une teneur $2044,79 \pm 2,36$ et $2000,93 \pm 3,69$ mg EAG/kg.

Ces résultats sont supérieurs à ceux de **Achat et al.(2012)** qui ont trouvé $445 \pm 3,2$ mg O /kg d'huile pour l'enrichissement par ultrasons et 314 mgEAG/KG pour la méthode conventionnelle.

L'écart trouvé entre les résultats obtenus et la littérature est tout à fait justifié. En effet, la richesse en antioxydants de cette matrice et les conditions d'extraction ne sont pas les mêmes, de plus l'ultrason permet d'augmenter le rendement d'extraction.

III.3.2. Flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes de l'huile enrichie avec la méthode conventionnelle et avec l'ultrason exprimées par mg EQ/Kg de l'échantillon se référant à une courbe d'étalonnage dans les mêmes conditions, sont représentées dans la figure N°22.

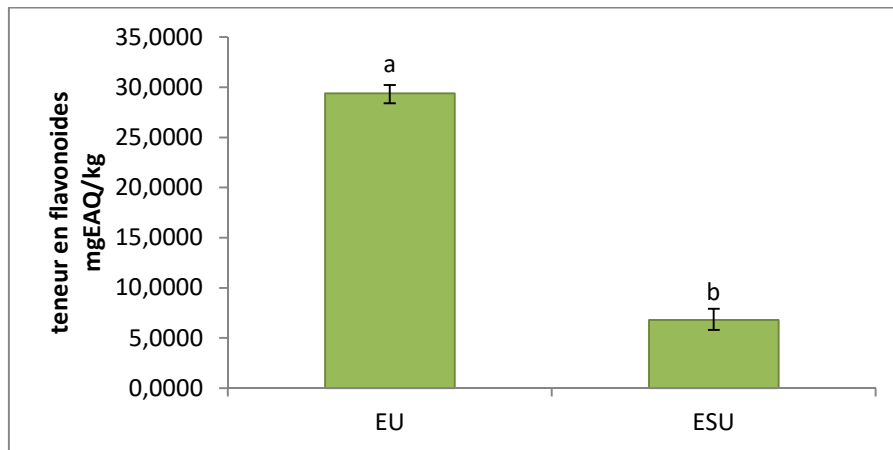


Figure 23 : Histogramme représentant les teneurs en flavonoïdes des huiles enrichies.

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures \pm écartype

Les valeurs avec les différentes lettres (a-b) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés;

les résultats sont classés en ordre descendant : $a > b$

D'après les résultats obtenus dans cette étude, l'huile enrichie avec ultrasons est plus riche en flavonoïdes avec une teneur de 30,10 mg EQ/kg ; la teneur en flavonoïdes de l'huile enrichie avec macération est de 6,81 mg EQ/kg .

III.4. Activités antioxydants

III.4.1. Pouvoir réducteur

La puissance activité antioxydant de l'huile d'olive enrichie est évaluée en utilisant la méthode de réduction du ferrocyanure de potassium. La présence de composés réducteurs (antioxydants) dans les extrait cause la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) du ferrocyanure de potassium pour donner du fer ferreux (Fe^{2+}). La couleur jaune de ferrocyanure de potassium vire vers une couleur bleu verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'extrait (Ferreira et al., 2007).

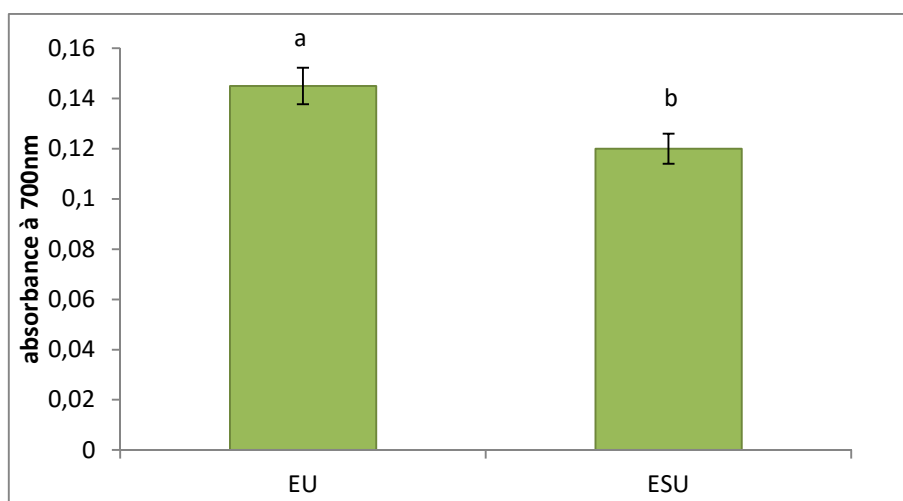


Figure 24 : pouvoir réducteurs des huiles enrichies

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures \pm écartype

Les valeurs avec les différentes lettres (a-b) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés;

les résultats sont classés en ordre descendant : $a > b$

D'après les résultats obtenus dans la présente étude l'huile d'olive enrichie avec ultrasons détient une capacité de réduction du chlorure ferrique de 21,85 mg EE d'équivalent de vitamine E par kg .

L'étude statistique a montré l'existence d'une différence significative entre les deux échantillons d'huiles enrichies $p < 0,05$ et une bonne corrélation entre la réduction de $FeCl_3$ avec les teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes avec un coefficient de corrélation respectivement de l'ordre de $R=0,82$, $R=0,96$.

III.4.2. Pouvoir anti radicalaire

III.4.2.1. Activité scavenger du radical DPPH

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH pour les huiles enrichies sont représentés dans la figure N°25.

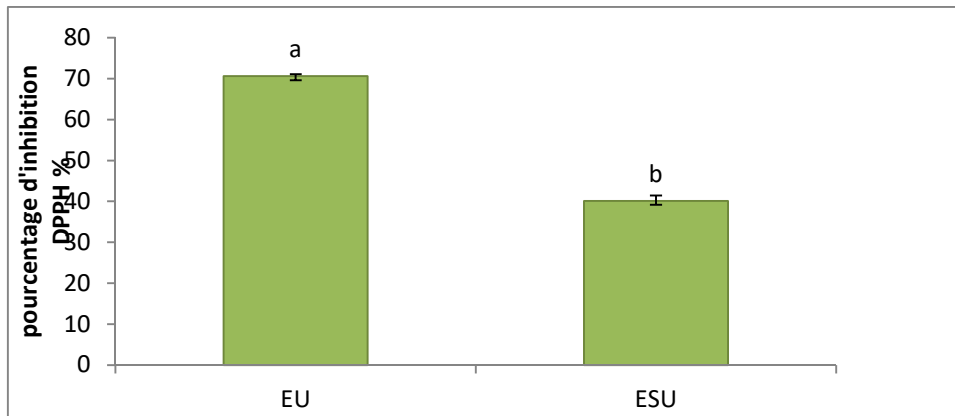


Figure 25 : Pourcentage d'inhibition des huiles enrichies

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures ± écartype

Les valeurs avec les différentes lettres (a-b) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés;

les résultats sont classés en ordre descendant : $a > b$

D'après les résultats obtenus, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'huile enrichie avec ultrasons est de $70,06 \pm 0,4$ % est proche de celle de l'intervalle de prédiction du plan BBD estimé à $71,06$ % .

Le pourcentage d'inhibition de l'huile enrichie par ultrasons est supérieur à celui enrichi avec macération conventionnelle $40,13 \pm 1,28$ % .

Les résultats de l'étude statistique ($P < 0.05$) obtenus indiquent l'existence d'une bonne corrélation linéaire entre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, aussi bien avec la teneur en composés phénoliques qu'avec la teneur en flavonoïdes dont les coefficients de corrélation correspondants respectivement sont de l'ordre de 0.786 et 0.996.

Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par **Achat et al. (2012)** qui ont trouvé $86,2 \pm 0,6$ % pour l'enrichissement avec ultrasons et $65,5 \pm 0,8$ % pour la méthode conventionnelle.

Cette différence des résultats peut être liée au mode d'extraction utilisé mais aussi à la composition de l'échantillon étudié.

Conclusion

Dans ce présent travail le modèle expérimental est divisé en deux parties, des essais préliminaires sont effectués selon le modèle classique d'extraction en variant le ratio et fixant le temps et la température ; ces essais préliminaires sont effectués sur l'huile d'olive enrichie par les graines de pins broyées.

La présente étude a pour objectif d'optimiser l'extraction des antioxydants par le dosage des composés phénoliques de l'huile enrichie par les graines de pins broyées.

Le modèle BBD utilisé dans l'optimisation de l'enrichissement assisté par ultrasons est validé et les conditions optimales (Temps 37,5 mn, Température 30°C, Ratio 12,5) nous ont permis d'avoir une huile riche en composés bioactifs à savoir PT par rapport à l'huile obtenue par macération conventionnelle et l'huile brute.

Le taux de composés phénoliques retrouvés sous les conditions optimales pour l'huile EU et ESU sont respectivement 2044mgEAG /Kg ,2000mgEAG /kg.

Les teneurs en composés flavonoïdes dans les extraits sont de l'ordre de 21,30 mgEAQ /Kg, 6,21mgEAQ /Kg.

Le pouvoir réducteur estimé par le test de réduction de chlorure ferrique des extraits optimaux est de l'ordre de 21,62 et 14,43 .

Le pouvoir anti radicalaires DPPH des huiles enrichies étudiées ont révélé des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 70,60 % pour EU et 40,13 % pour ESU.

Ces résultats nous ont permis de conclure que l'incorporation des antioxydants de la graine de pins broyée dans l'huile d'olive a relativement augmenté le rendement en antioxydants. Par conséquent cette huile produite peut constituer un potentiel aliment fonctionnel par sa riche composition en composés phénoliques. En termes de perspectives et dans le but de compléter ce travail dans l'avenir, il serait intéressant d'utiliser des techniques d'analyses avancées (CCM, HPLC, CPG) pour identifier les antioxydants présents dans l'huile enrichie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Abdallah, M., Marzocco, S., Adesso, S., Zarrouk, M., & Guerfel, M. (2018).** Olive oil polyphenols extracts inhibit inflammatory markers in J774A. 1 murine macrophages and scavenge free radicals. *Acta Histochem*, 120(1), 1-10.
- 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 plant scale. *Ultrason Sonochem*, 19(4), 777-786.
- Aparicio, R., & Harwood, J. (2013).** Handbook of olive oil. *Analysis and properties. 2nd ed* Springer, New York.
- Azadmard-Damirchi, S. (2007).** Olive Oil Phytosterols, Tracing of Adulteration with Hazelnut Oil and Chemical Interesterification.
- Bajoub, A., Medina-Rodríguez, S., Gómez-Romero, M., Bagur-González, M. G., Fernández-Gutiérrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2017).** Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics. *Food Chem*, 215, 245-255.
- Berset, C., & Cuvelier, M. (1996).** Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments (France)*.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008).** Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., & Saykova, I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.).
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., & Abram, M. (2011).** Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chem*, 127(4), 1821-1827.
- Chan, S., Lee, C., Yap, C., Aida, W. W., & Ho, C. (2009).** Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16(2), 203-213.
- Chanforan, C. (2010).** Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation: études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. In): Avignon.

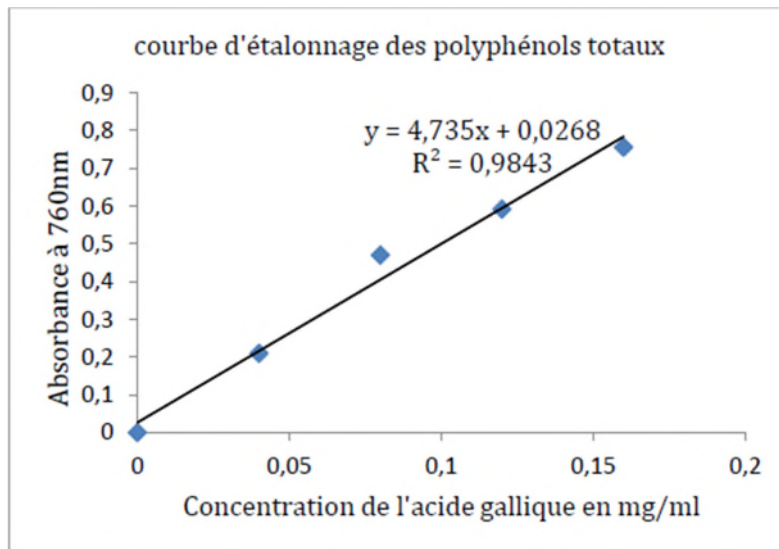
- Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2006).** Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food science and technology international*, 12(5), 407-415.
- Dais, P., & Boskou, D. (2009).** Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil, olives, and biological fluids. *Olive Oil, Minor Constituents and Health*, 55-107.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97(4), 654-660.
- Djerrad, Z., Kadik, L., & Djouahri, A. (2015).** Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products*, 74, 440-449.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009).** Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem*, 57(5), 1768-1774.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- Fei, C. Y., Salimon, J., & Said, M. (2010).** Optimisation of urea complexation by Box-Behnken design. *Sains Malaysiana*, 39(5), 795-803.
- Ferreira, I. C., Baptista, P., Vilas-Boas, M., & Barros, L. (2007).** Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem*, 100(4), 1511-1516.
- Galvan D'Alessandro, L. (2013).** *Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-produits*. Lille 1.
- Ghedira, K. (2008).** L'olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83-89.
- Gigon, F., & Le Jeune, R. (2010).** Huile d'olive, *Olea europaea* L. *Phytothérapie*, 8(2), 129-135.
- Haddam, M., Chimi, H., & Amine, A. (2014).** Formulation d'une huile d'olive de bonne qualité. *OCL*, 21(5), D507.
- Huang, H., Kwok, K. C., & Liang, H. (2004).** Effects of tea polyphenols on the activities of soybean trypsin inhibitors and trypsin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(2), 121-126.

- Japón-Luján, R., Janeiro, P., & Luque de Castro, M. a. D. (2008).** Solid– liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasound-assisted approach. *J Agric Food Chem*, 56(16), 7231-7235.
- Japón-Luján, R., & Luque de Castro, M. (2008).** Liquid–liquid extraction for the enrichment of edible oils with phenols from olive leaf extracts. *J Agric Food Chem*, 56(7), 2505-2511.
- Jeganathan, P. M., Venkatachalam, S., Karichappan, T., & Ramasamy, S. (2014).** Model development and process optimization for solvent extraction of polyphenols from red grapes using Box–Behnken design. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(1), 56-67.
- Kadri, N., Khettal, B., Aid, Y., Kherfella, S., Sobhi, W., & Barragan-Montero, V. (2015).** Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food Chem*, 188, 184-192.
- Kadri, N., Khettal, B., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., & Montero, J.-L. (2013).** Analysis of polar lipid fraction of *Pinus halepensis* Mill. seeds from North Algeria. *Industrial crops and products*, 51, 116-122.
- Kamal-Eldin, A. (2005).** Minor components of fats and oils. *Bailey's industrial oil and fat products*.
- Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H., & Chen, W. (2010).** Optimization of extraction of polyphenols from Syrian sumac (*Rhus coriaria* L.) and Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruits. *Research Journal of Phytochemistry*, 4(3), 146-153.
- Maran, J. P., Manikandan, S., Thirugnanasambandham, K., Nivetha, C. V., & Dinesh, R. (2013).** Box–Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 604-611.
- Negi, P., Jayaprakasha, G., & Jena, B. (2003).** Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem*, 80(3), 393-397.
- Ollivier, D., Boubault, E., Pinatel, C., Souillol, S., Guérère, M., & Artaud, J. (2004).** Analyse de la fraction phénoliques des huiles d'olive vierges. In *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique*, vol. 965 (pp. 169-196).
- OUEDRHIRI, M., BENISMAIL, C., EL MOHTADI, F., & ACHKARI-BEGDOURI, A. (2016).** Evaluation de la qualité de l'huile de pulpe d'olive vierge de la variété Picholine marocaine. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 5(2).

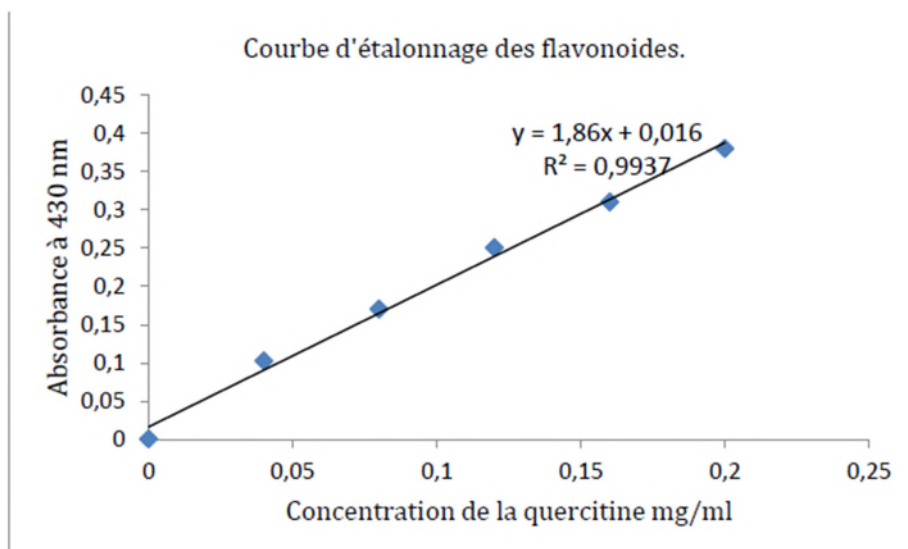
- Oueslati, I., Anniva, C., Daoud, D., Tsimidou, M. Z., & Zarrouk, M. (2009).** Virgin olive oil (VOO) production in Tunisia: the commercial potential of the major olive varieties from the arid Tataouine zone. *Food Chem*, *112*(3), 733-741.
- Peñalvo, G. C., Robledo, V. R., Callado, C. S.-C., Santander-Ortega, M., Castro-Vázquez, L., Lozano, M. V., & Arroyo-Jiménez, M. (2016).** Improving green enrichment of virgin olive oil by oregano. Effects on antioxidants. *Food Chem*, *197*, 509-515.
- Ramírez-Godínez, J., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Añorve-Morga, J., Salazar-Pereda, V., González-Olivares, L. G., & Contreras-López, E. (2017).** Optimization of physical conditions for the aqueous extraction of antioxidant compounds from ginger (*Zingiber officinale*) applying a box-Behnken design. *Plant Foods for Human Nutrition*, *72*(1), 34-40.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968).** *Les Composés phénoliques des végétaux: par Pascal Ribéreau-Gayon*: Dunod.
- Rouas, S., Rahmani, M., El Antari, A., Idrissi, D. J., Souizi, A., & Maata, N. (2016).** Effect of geographical conditions (altitude and pedology) and age of olive plantations on the typicality of olive oil in Moulay Driss Zarhoun. *Mediterranean Journal of Biosciences*, *1*(3), 128-137.
- Salvador, M., Aranda, F., & Fregapane, G. (1998).** Chemical composition of commercial Cornicabra virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops. *Journal of the american oil chemists' society*, *75*(10), 1305-1311.
- Şan, B., Karakurt, Y., & Dönmez, F. (2015).** Effects of thidiazuron and activated charcoal on in vitro shoot proliferation and rooting of Myrtle (*Myrtus communis* L.). *Tarım Bilimleri Dergisi*, *21*(2), 177-183.
- Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., Cárdeno, A., Talero, E., Sanchez-Hidalgo, M., Motilva, V., & de la Lastra, C. A. (2010).** Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Clin Nutr*, *29*(5), 663-673.
- Sebei, K., Boukhchina, S., & Kallel, H. (2007).** Évolution des tocophérols en relation avec les acides gras insaturés au cours de la maturation des graines de colza de printemps (*Brassica napus* L.). *Comptes Rendus Biologies*, *330*(1), 55-61.
- Sekour, B. (2012).** *Phytoprotection de l'huile d'olive vierge (HOV) par ajout des plantes végétales (thym, ail, romarin)*.
- Sies, H. (1993).** Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry*, *215*(2), 213-219.

- Silva, D. M. d., Riet-Correa, F., Medeiros, R. M., & Oliveira, O. F. d. (2006).** Toxic plants for livestock in the western and eastern Seridó, state of Rio Grande do Norte, in the Brazilian semi-arid. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26(4), 223-236.
- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A. M., León, L., De la Rosa, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2016).** From olive fruits to olive oil: phenolic compound transfer in six different olive cultivars grown under the same agronomical conditions. *Int J Mol Sci*, 17(3), 337.
- Telli, A., Mahboub, N., Boudjeh, S., Siboukeur, O., & Moulti-Mati, F. (2010).** Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) variété ghars. *Annales des Sciences et Technologie*, 2(2), 107-114.
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., & Boskou, D. (1992).** Phenolic compounds and stability of virgin olive oil-Part I. *Food Chem*, 45(2), 141-144.
- Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., & Polat, G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12(3), 484-496.
- Uma, D., Ho, C., & Wan Aida, W. (2010).** Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana*, 39(1), 119-128.
- Veillet, S., Tomao, V., & Chemat, F. (2010).** Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chem*, 123(3), 905-911.
- Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002).** Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 661-676.
- Wang, L., Yen, J.-H., Liang, H.-L., & Wu, M.-J. (2003).** Antioxidant effect of methanol extracts from lotus plumule and blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Journal of food and drug Analysis*, 11(1), 60-66.
- Zhong, K., & Wang, Q. (2010).** Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 80(1), 19-25.
- Zhou, K., & Yu, L. (2004).** Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT-Food Science and Technology*, 37(7), 717-721.

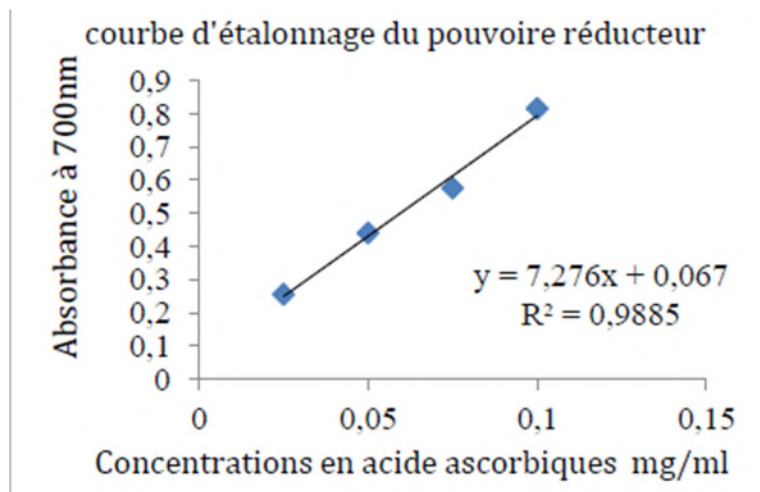
ANNEXE



Annexe N°1 : Courbe d'étalonnage des poly phénols totaux



Annexe N°2 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes



Annexe N°3 : Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur

Nom du produit	Marque	Pays de fabricant
Acide gallique monohydrate	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
Acide quercétine	Riedel-de Haën	Germany
Ethanol	GPR RECTAPUR	Germany
Méthanol	SIGMA-ALDRICH	France
Folin-Ciocalteu 1/10	BIOCHEM Chemopharma	France
Carbonate de sodium	SIGMA-ALDRICH	Germany
Chlorure d'aluminium à 2%	BIOCHEM Chemopharma	USA
Ferricyanure de potassium à 1%	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
Acide trichloroacétique(10%)	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
Chlorure de fer	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)	SIGMA-ALDRICH	Germany
di-hydrogénophosphate de potassium à	BIOCHEM Chemopharma	Quebec

Annexe N°4 : Solvant et réactifs utilisé au cours du travail.

Matériel	Appareils
Béchers	Bain marie
Burette graduée	Balance de précision
Cuve en plastique	Micropipette
Eprouvette graduée	Plaque magnétique agitatrice (VELP SCIENTIFICA)
Tubes à essais	Réfrigérateur (SAMSUNG)
Erlenmeyer	Spectrophotomètre (RAYLEIGH)
Fioles	Vortex (VELP SCIENTIFICA)

Ampoules	Etuve ventilée (MEMMERT)
----------	--------------------------

Annexe N°5 : Matériel et appareil utilisé au cours du travail.

Préparation de la solution tampons	Dissoudre 9,08g dedi-hydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) dans 1 litre d'eau, et 9,74g de di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) dans 1 litre d'eau. Puis mélanger ces deux solutions progressivement pour ajuster le PH a 6,6.
Préparation de la solution DPPH	Dissoudre 4mg de DPPH dans 100ml De méthanol
Chlorure d'aluminium à 2%	Dissoudre 2g de Chlorure d'aluminium dans 100ml d'eau distillé

Annexe N°6 : Préparation de quelques solutions .

Résumé

La présente étude est portée sur l'optimisation des conditions d'huile d'olive vierge par des graines de pins broyées en utilisant la méthode de surface de réponse développée par le plan BBD , et à évaluer le potentiel d'enrichissement d'huile d'olive enrichie avec ultrasons et huile d'olive enrichie sans ultrasons obtenue aux conditions optimales : la température 30°C , le temps 37,5 mn , le ratio 12,5 .

Une quantification des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante (pouvoir anti-radicalaire et réducteur) effectués sur les deux enrichissements de huiles d'olives (**avec ultrasons** et **sans ultrasons**). Dont les résultats obtenus indiquent des teneurs en PPT respectivement de 2044,79mg EAG/kg ; 2000,93mgEAG/kg et teneurs en flavonoïdes respectivement de 30,10mg EQ/kg ; 6,81 mgEQ/KG. Une teneur de 21,85mgEE/kg; 14,43mgEE/kg Pour le pouvoir réducteur. En dernier les pourcentages d'inhibition Sont de l'ordre de 70,06% ; 40,13% .

Abstract

The present study is concerned the optimization of the conditions of blank olive oil by seeds of pines crushed by using the method of surface of answer developed by the plan BBD and to estimate the potential of enrichment of olive oil enriched with the ultrasounds and olive oil enriched without ultrasounds obtained on the optimal conditions : the temperature 30°C, the time 37,5 mn , the ratio 12,5.

A quantification of the total polyphenols (PPT) and the flavonoids as well the evaluation of the antioxidizing activity (anti-free radical and reducing power) made on both enrichment of olive oil (with ultrasounds and without ultrasounds) . whose obtained results (profits) Indicate contents in PPT respectively of 2044,97mgEAG/kg ; 2000,93mgEAG/kg and contents in flavonoids respectively of 30,10mg EQ/kg ; 6,81 mgEQ/kg . a contents of 21,85 mgEE/kg ; 14,43 mgEE/kg for the reducing power . lastly the percentages of inhibition are of the power of 70,06 % ; 40,13%.

Keywords: activity antioxidant, extraction, enrichment, optimization, olive stone, polyphenols, boxn behnken.