

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

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Biologique
Spécialité : Science alimentaire
Option : bioprocédés et technologie alimentaire



Réf :.....

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

MASTER

Thème

***Optimisation de l'extraction des composés
phénoliques à partir de la poudre de noyaux
d'olives par la méthode de Box-Behnken et
l'étude de quelques activités biologiques***

Présenté par :

BACHA Amine & LALAM Mohand Oulhadj

Soutenu le : **20 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M^{me}. GEMGHAR. H

M^{me}. HAMRI. S

M^{me}. SOUFI. O

M^{elle}. LANDRI. K

MCA

MCA

MCB

Doctorante

Présidente

promoteur

Examineur

Co-promoteur

Année universitaire : 2016 / 2017



Remerciements



Au terme de notre travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères Au bon Dieu pour la patience et la santé qui nous ont été utiles tout au long de notre parcours.

*Il nous est agréable de remercier notre promotrice **M^{me} HAMRI.S** pour nous avoir assuré l'encadrement et l'orientation afin de permettre le bon déroulement de notre travail.*

*Et tout particulièrement notre Co-promotrice **M^{lle} LANDRI.K** pour son aide précieuse et ces conseils avisés autant que pour sa disponibilité que pour le temps qu'elle nous a consacré.*

*Sans oublier **M^{lle} BEJAOVI.K** et **M^{lle} BOULAHBAL.N***

*Nous remercions également **M^{ME} GUEMGHAR.H** qui a bien voulu présider le jury*

*Ainsi que **M^{ME} SOUFI.O** pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Enfin, on remercie profondément nos chers parents pour leur soutien moral et matériel durant nos études ainsi que toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

BACHA.A et LALAM.M

*D*édicaces

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds,

Je dédie ce modeste travail

A DIEU le Tout Puissant. Je me prosterne devant ta Grandeur pour te remercier de m'avoir comblée de ta grâce et de m'avoir assistée tout au long de ce voyage dans le sanctuaire du savoir, j'implore ta bénédiction et que ta lumière guide mes pas. Que toute la gloire te revienne.

A mes très chers parents, sans eux je n'aurai pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts et sacrifices, leurs amours et soutiens et leurs encouragements durant toutes mes études. Qui m'ont donné confiance et sécurité

A ma chère petite sœur, qui été une source d'inspiration pour moi.

A la mémoire de mes très chers grand parents que dieu le tout puissant les reçoivent dans son vaste et grand paradis.

A mes cousins et cousines, ainsi qu'à leurs petites familles.

A toute ma famille, à mes amis et à tous ceux qui m'ont aidé.

AMINE

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A la mémoire de ma chère sœur que j'aimerais pour toujours et que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont tout donné.

Je souhaite qu'ils trouvent dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A mon frère : KADER et sa femme LAMIA et leurs fils YANNI.

A ma sœur : SOUHILA et son mari RIAD et leurs fils MAYAS.

A ma sœur SAMIA et son mari LOUNIS.

A mon binôme PACHECO et toute sa famille.

A toute la promotion BTA 2017



MOHAND

Liste des abréviations

AAO : Activité anti-oxydante.

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

av. J.-C : Seigneur Jésus-Christ', est un terme qui désigne l'année supposée de la naissance de Jésus-Christ'.

BBD : Box-Benken Design

CCM : Chromatographie sur couche mince

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DM : Drie matter

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

EAA : Equivalent en acide ascorbique

EAG : Equivalent en acide gallique.

EQ : équivalent en quercétine

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

HPLC : Chromatographie en phase liquide

JMP : John's Machintosh Project

MS : Matière sèche

MSR : Méthodes de Surfaces de Réponses

pH : Potentiel hydrogène

PI : Pourcentage d'inhibition

PPT : Polyphenols totaux.

RMSE : Root Mean Squared Error

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra-violet.

VIS : Visible

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Figure N°1	Aspect morphologique de l'olivier cultivé <i>Olea europaea L.</i>	3
Figure N°2	Schéma représentatif de la composition de l'olive.	5
Figure N°3	Photographies des noyaux d'olive utilisées dans cette étude.	13
Figure N°4	Photographies de la poudre utilisée dans cette étude.	13
Figure N°5	Protocole d'extraction des polyphénols.	16
Figure N°6	Réduction du Radical DPPH [•] .	18
Figure N°7	Teneur en humidité résiduelle de la poudre des noyaux d'olives étudiée	21
Figure N°8	Influence de la granulométrie sur la teneur en polyphénols extraite.	22
Figure N°9	Effet de la nature du solvant sur la teneur en polyphénols extraites.	23
Figure N°10	Effet du ratio sur la teneur en polyphénols extraite	25
Figure N°11	Effet du temps sur la teneur en polyphénols extraite.	27
Figure N°12	Plan de prédiction réelle.	30
Figure N°13	Surface de réponse linéaire (concentration).	31
Figure N°14	Surface de réponse d'interaction (Température-ratio).	32
Figure N°15	Surface de de l'interaction (concentration-temps).	32
Figure N°16	Histogramme représentatif des teneurs en polyphénols totaux des différentes variétés.	35
Figure N°17	Histogramme représentatif des teneurs en flavonoïdes des différentes variétés.	36
Figure N°18	Pouvoir réducteur des extraits de poudre étudiée.	37
Figure N°19	Pouvoir anti-radicalaire <i>vis -à- vis</i> le radical DPPH [•] par les extraits de poudre étudiée.	38
Figure N°20	Pourcentage d'inhibition du radical ABTS ^{•+} par les extraits de poudre étudié.	39
Figure N°21	Distribution des variables dans le plan 1-2 révélée à partir de l'ACP chez les trois variétés de noyaux d'olives.	40
Figure N°22	Dendrogramme de la classification hiérarchique des variétés de noyaux d'olives étudiées.	40

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau I	Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie.	4
Tableau II	Composition physique de l'olive.	5
Tableau III	Composition chimique de l'olive (%).	6
Tableau IV	Principales classes des composés phénoliques.	8
Tableau V	Niveaux des variables choisies pour les essais.	15
Tableau VI	Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expérience Box-Behnken.	28
Tableau VII	Estimation des coefficients de régression du model polynomiale de second degré.	30
Tableau VIII	Conditions optimales d'extraction des polyphénols à partir de la poudre étudiée.	34

Sommaire

SOMMAIRE**Liste des abréviations****Liste des figures****Liste des tableaux****Introduction 1****Partie bibliographique****I. Généralités sur l'olive 2****I.1. Origine et expansion 2****I.2. Répartition de la culture de l'olivier 2****I.2.1. Dans le monde 2****I.2.2. En Algérie 3****I.3. Systématique de l'olivier 3****I.4. Composition physique de l'olive 5****I.5. Composition chimique de l'olive 5****I.6. Sous-produits de l'oléiculture 6****II. Généralités sur les composés phénoliques 7****II.1. Définition 7****II.2. Biosynthèse des composés phénoliques 7****II.3. Classification des structures phénoliques 8****II.4. Activité antioxydante. 8****II.5. Propriétés des polyphénols 9****II.5.1. Propriétés industrielles 9****II.5.2. Propriétés thérapeutiques 9****III. Généralités sur les plans d'expériences 10****III.1. Définition 10****III.2. Terminologie 10****III.2.1. Réponse 10****III.2.2. Facteur 11****III.2.3. Espace expérimentale 11****III.2.4. Domaine d'étude 11****III.2.5. Surface de réponse 11****III.3. Modèle mathématique postulé 11**

III.4. Plan de box-behnken	12
III.4.1. Description du plan	12
Partie pratique	
I. Matériel et méthodes	13
I.1. Matériel végétal.....	13
I.2. Test d'humidité	14
I.3. Extraction des polyphénols	14
I.3.1. Optimisation des conditions de l'extraction	15
I.4. Dosage des antioxydants.....	16
I.4.1. Dosage des polyphénols	16
I.4.2. Dosage des flavonoïdes	17
I.5. Détermination de l'activité antioxydante et antiradicalaire	17
I.5.1. Pouvoir réducteur	17
I.5.1.1. Réduction du chlorure ferrique	17
I.5.2. Neutralisation des radicaux libre	18
I.5.2.1. Inhibition du radicale DPPH [·]	18
I.5.2.2. Inhibition du radicale ABTS ^{·+}	19
I.6. Détermination de l'activité antibactérienne	19
I.6.1. Test de l'activité antibactérienne	20
I.6.1.1. Standardisation des souches	20
I.6.1.2. Test de l'activité antibactérienne	20
I.7. Etude statistique	20
II. Résultats et discussion.....	21
II.1. Test d'humidité	21
II.2. Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols	21
II.2.1. Essais préliminaire	22
II.2.1.1. Choix de la granulométrie	22
II.2.1.2. Choix du solvant	23
II.2.1.3. Choix de la concentration du solvants	24
II.2.1.5. Choix de l'intensité de l'agitation	25
II.2.1.6. Choix de la température	26
II.2.1.7. Choix du temps d'extraction	26
II.2.2. Plan d'expérience box-behnken	27
II.2.2.1. Validation du modèle	29
II.2.2.2. Coefficient de corrélation	29

II.2.2.3. Effet des facteurs (coefficient).....	30
II.2.2.4. Modèle mathématique	33
II.2.2.5. Solution.....	34
II.3. Dosage des antioxydants	34
II.3.1. Polyphénols totaux	34
II.3.2. Flavonoïdes	35
II.4. Activités antioxydantes et antiradicalaires	36
II.4.1. Pouvoir réducteur	37
II.4.1.1. Réduction du chlorure ferrique	37
II.4.2. Pouvoir antiradicalaire	38
II.4.2.1. Pouvoir anti radical DPPH·	38
II.4.2.2. Pouvoir anti radical cation ABTS ^{·+}	39
II.5. Analyse statistique des résultats	40
II.5.1. Résultats de l'analyse en composantes principales (ACP)	40
II.6. Activité antibactérienne	41
Conclusion	43
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, les plantes étaient vénérées pour des vertus qu'on leur avait reconnues, personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissent, mais c'était un fait incontesté qui paraissait magique (**Schauenberg and Paris, 2005**).

Ce n'est qu'au début du 20^{ème} siècle, que les scientifiques ont commencé à s'intéresser à leurs propriétés biologiques afin de mieux les connaître et pour une meilleure utilisation, et qui servira souvent de guide pour la recherche et la découverte de nouveaux traitements (**Uma et al., 2010**).

L'oxygène indispensable à notre vie est aussi à l'origine des radicaux libres : molécules qui oxydent nos cellules et les font vieillir. Récemment, l'intérêt des antioxydants naturels a augmenté car ils sont employés pour protéger l'organisme contre des dommages causés par le stress oxydatif (**Mata et al., 2007**).

En effet l'olivier est une plante typiquement méditerranéenne, un patrimoine qui est représenté par de nombreuses variétés, et afin de tirer bénéfice de l'aspect thérapeutique de ses noyaux et pour une meilleure valorisation, une bonne maîtrise des conditions d'extraction de ses polyphénols s'avère nécessaire.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des noyaux de *Olea europea*.L de la variété **Aymel**, comparaison avec les deux variétés **Achemlal** et **Azeradj** en appliquant le modèle de plan d'expérience Box-Behnken, et étude de leurs activités biologiques.

Partie bibliographique

I. Généralités sur l'olive

I.1. Origine et expansion

L'olivier est cité dans le saint Coran comme étant un arbre béni, symbole de l'homme universel et l'huile d'olive, est source de la lumière divine pour guider les hommes.

L'origine de l'olivier se perd dans la nuit des temps, son histoire se confond avec des civilisations qui ont vu le jour autour du bassin méditerranéen, et ont pendant longtemps régi les destinées de l'humanité et marqué de leur empreintes la culture occidentale (**Besnard and Bervillé, 2000; Zohary and Spiegel-Roy, 1975**).

Plusieurs civilisations méditerranéennes se relayèrent à travers l'histoire pour propager la culture de cet arbre de l'Est en Ouest dans le bassin circumméditerranéens (**Besnard and Bervillé, 2000; Zohary and Spiegel-Roy, 1975**).

Avec la découverte du Nouveau Monde, les émigrants de la péninsule ibérique (Espagne) ont introduit l'olivier dans leurs anciennes colonies des Amériques comme l'Argentine, le Mexique, le Pérou ensuite le Chili et la Californie, et ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que l'oléiculture a vu un essor rapide en s'implantant dans les pays éloigné de son lieu d'origine comme l'Afrique du sud, l'Australie, le Japon, la Chine (**Loussert and Brousse, 1978**).

Selon le Conseil Oléicole Internationale, on découvrit en 1957 dans la zone montagneuse du Sahara Central (Tassili dans le Hoggar en Algérie), des peintures rupestres réalisées au II^{ème} millénaire avant J.C avec des hommes couronnés de branches d'olivier témoignant ainsi de la connaissance de cet arbre au cours de ces époques anciennes (**C.O.I, 1998**).

I.2. Répartition de la culture de l'olivier

I.2.1. Dans le monde

Bien que l'olivier soit présent dans les quatre continents, environ (98%) de la production mondiale de l'huile d'olive provient du Bassin méditerranéen. Il est considéré comme une espèce caractéristique de la région méditerranéenne. La surface totale occupée par l'olivier est d'environ 11 millions d'hectares. L'Union européenne représente (50%) de ce verger, l'Afrique (Afrique du Nord) (25%), le Moyen- Orient (20%), le reste se répartissant entre l'Amérique (Californie, Chili, Argentine...), l'Australie et la Chine. Près de (82%) de ces vergers sont de type «traditionnel» (**A.F.I.D.O.L, 2012**).

I.2.2. En Algérie

En Algérie, l'olivier compte environ 32 millions d'arbres (**Bensemmane, 2009; Mendil, 2009**) répartis sur une superficie d'environ 328.884 hectares (**FAOSTAT, 2013**), soit 34,09% du verger arboricole national. L'olivier, de par ses fonctions multiples de lutte contre l'érosion, de valorisation des terres agricoles et de fixation des populations dans les zones de montagne, s'étend sur tout le territoire national. Il se concentre notamment dans trois principales régions : la région du Centre (54%), la région de l'Est (29%) et la région de l'Ouest (17%). Pour la région centre, l'essentiel du verger oléicole de cette zone (95%) est occupé par les wilayas de Bejaïa, Tizi-Ouzou et Bouira. 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 occupé par les wilayas de Mascara, Sidi Bel abbés, Relizane et Tlemcen (**Belkacem, 2012**).



Figure N°1 : Aspect morphologique de l'olivier cultivé *Olea europae L.*

I.3. Systématique de l'olivier

Selon la classification de (**A.F.I.D.O.L, 2017**) l'olivier présente la classification suivante:

Règne: Plantae

Sous-règne: Tracheobionta

Embranchement: Spermaphytes (Phanérogames)

Sous-embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones (Magnoliopsida ou Thérébinthales)

Sous –classe: Astéridées (ou Gamopétales)

Ordre: Gentianales (Scrophulariales ou Lingustrales)

Famille: Oleacées

Genre: *Olea*

Espèce: *europaea*

Mais la seule espèce portant des fruits comestibles est l'*Olea europea* L., qui se trouve dans les régions à climat méditerranéen (**Green and Wickens, 1989**). Parmi les sous-espèces d'*Olea europae* L., *Olea europea* L. var. *sativa* (**Loussert and Brousse, 1978**), ou olivier domestique. Il est constitué par un grand nombre de variétés améliorées, ayant une diversité phénotypique importante (**Belaj et al., 2001; Ouazzani et al., 1995**), parmi ces variétés on peut énumérer quelques-unes, qui sont les plus connues.

Tableau I : Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie (**Mendil and Sebai, 2006**).

Variétés et synonymes	Origine et diffusion	Caractéristiques
Chemlal ou Achemlal	Occupe 40% du verger oléicole national, présent surtout en Kabylie, s'étend du mont Zekkar à l'Ouest aux Bibans à l'Est.	Variété rustique et tardive, le fruit est de poids faible (2.5g) et de forme allongée de petite taille, destiné à la production d'huile, le rendement en huile de 18 à 22%.
Azeradj	Petite Kabylie (oued Soummam) occupe 10% de la surface oléicole nationale	Arbre rustique et résistant à la sécheresse, fruit de poids élevé (3-5g) de grande taille et de forme allongée, utilisée pour la production d'huile et olive de table, rendement en huile de 24 à 28%.
Limli ou aymel	Originaire de Sidi-Aïch (Bejaïa), occupe 8% du verger oléicole national, localisé sur les versants montagneux de la basse vallée de la Soummam jusqu'au littoral.	Variété précoce, peu tolérante au froid, résistante à la sécheresse; le fruit est de poids faible (2g) et de forme allongée de taille moyenne, utilisée dans la production d'huile, le rendement de 20 à 24%.

I.4. Composition physique de l'olive

L'olive est une drupe. Sa composition dépend de sa variété, du sol et du climat. Le contenu de cette dernière est illustré dans la figure et le tableau suivant.

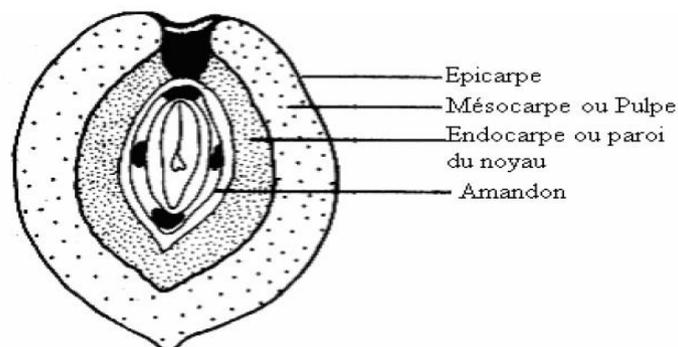


Figure N°2 : Schéma représentatif de la composition de l'olive (Nefzaoui, 1984).

La partie la plus riche en huile est le mésocarpe ou (pulpe), et celle plus riche en cellulose brute est l'endocarpe ou (noyau) (Loussert and Brousse, 1978).

Tableau II : Composition physique de l'olive (Nefzaoui, 1984).

Composition	% Poids de l'olive
Épicarpe	2,0 à 2,5
Mésocarpe	71,5 à 80,5
Endocarpe	17,5 à 23,0
Amandan	2,0 à 5,5

I.5. Composition chimique de l'olive

L'olive est constituée chimiquement, d'eau, huile, composés azotés, cellulose, minéraux et enfin composés phénoliques, qui se répartissent en quantités différentes, dans la pulpe, endocarpe et graine, dont le tableau III est l'illustration de cette répartition.

Tableau III : Composition chimique de l'olive (%)(Crozier *et al.*, 2008; Niaounakis and Halvadakis, 2006)

Composants	Pulpe d'olive	Endocarpe	Graine
Eau	50-60	9,3	30
Huile	15-30	0,7	27,3
Composés azotés	2-3	3,4	10,2
Sucres cellulosiques	3-7,5	41	26,6
Cellulose	3-6	38	1,9
Minéraux	1-2	4,1	1,5
Composés phénoliques	2,25-3	0,1	0,5-1

I.6. Sous-produits de l'oléiculture

En plus de la production principale (huile d'olive vierge et huile de grignon) l'industrie oléicole génère deux résidus l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons). Dans le cas de la production de l'olive de table, qui est l'olive dénoyautée, ou le noyau est un effluent. Mais ce dernier peut être valorisé. Selon un point de vue environnemental et économique, ce sous-produit peut être considéré comme une source d'énergie renouvelable. En outre, on peut obtenir encore d'autres composés de haute valeur ajoutée qui peuvent avoir d'autres utilisations selon les propriétés chimiques et physiques spécifiques (Rodríguez *et al.*, 2008).

Selon (Rodríguez *et al.*, 2008), les plus importantes utilisations du noyau d'olive sont :

- Comme combustible;
- Charbon actif d'adsorption;
- Production de furfural;
- Comme abrasif;
- Utilisation en cosmétique dû aux qualités d'exfoliation du noyau;
- Comme biosorbent de métaux lourds;
- Comme supplémentation animale diététique;
- Comme résine de phénol-formaldéhyde.

II. Généralités sur les composés phénoliques

II.1. Définition

Les composés phénoliques sont des molécules du métabolisme secondaire spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton, 1999**). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (**Tao and Lambert, 2014**). Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être libres ou engagées, avec d'autres fonctions (alcoolique, carboxylique,...) (**Pietta, 2000; Robards, 2003; Robards et al., 1999**).

La désignation «polyphénols» est fréquemment utilisée dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, elle devrait être réservée aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols (**Hennebelle et al., 2004; Kühnau, 1976; Mompon et al., 1998**). Car la structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire (**Hopkins, 2003; Maarouf, 2000**). Les grandes familles de polyphénols sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, et les tanins (**Georgé et al., 2005**).

Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt. A l'heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont montré que ces composés contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme. Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers. D'où l'importance croissante des études consacrées à ces composés.

II.2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les cycles aromatiques des polyphénols sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate (**Bruneton, 1999**). La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine synthétique et elle augmente souvent avec la participation simultanée du shikimate et de l'acétate conduisant à l'élaboration de composés mixtes (flavonoïdes, stilbènes, xanthones, etc...). Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés dans les plantes et dans les aliments d'origine végétale (**Habauzit and Horcajada, 2008**).

II.3. Classification des structures phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de classes (**Harborne, 1990; Macheix et al., 2006**) (**tableau IV**) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation ...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) (**Macheix et al., 2006**). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes (**Crozier, 2006; Harborne, 1990**).

Tableau IV : Principales classes des composés phénoliques (**Crozier et al., 2008; Harborne, 1989; Macheix et al., 2006**).

Squelette carboné	Classes	Exemples
C ₆	Phénols simples	Catéchol
C ₆ -C ₁	Acids hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque
C ₆ -C ₃	Acids hydroxycinnamiques Coumarines	Acidecaféique, Acidefé-
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols 	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine
(C ₆ -C ₂) ₂	Lignanes	Pinorésinol
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	
(C ₁₅) _n	Tannins	

II.4. Activité antioxydante

L'oxydation est l'une des plus importantes manifestations à l'origine des altérations alimentaires, et elle est la cause dans le vieillissement des tissus biologiques ainsi que dans de nombreuses pathologies, qui est due au phénomène de stress oxydatif, induit par l'oxygène et les dérivés oxydants d'oxygène couramment connus comme espèces réactives d'oxygène, peuvent être soit des radicaux libres (O²⁻ : anion superoxyde, OH• : radical hydroxyle) ou des molécules non radicalaires, mais hautement instables, ainsi que les enzymes (lipoxygénase, peroxydase), catalysées par les ions métalliques (Cu, Fe) et les peroxydes lipidiques, qui concourent tous à la formation de radicaux libres (**Berset, 2006**).

Pour cela, ces substances naturelles issues des végétaux, dite métabolites secondaire, connues pour leurs propriétés antioxydantes et anti-radicalaires, dont le principal mode d'action est la capture de ces radicaux libres, sont utilisées pour retarder ou inhiber l'oxydation dans divers domaines (alimentaire, cosmétique et pharmaceutique) (**Berthet and Amar-Costesec, 2006**).

Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres initiant des réactions d'oxydation en chaîne, mais le corps humain maintient l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres en produisant simultanément les deux types de substances dans le processus métabolique. Le déséquilibre entre ces deux types de composés conduit à ce phénomène appelé stress oxydatif. Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaire (**Borg et al., 2004**).

II.5. Propriétés des polyphénols

II.5.1. Propriétés industrielles

Les polyphénols ont un rôle essentiel dans les interactions des végétaux avec leur environnement et dans leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles (couleur, astringence, amertume et qualité nutritionnelles...). En outre, leur propriété antioxydante est importante dans la stabilité des produits alimentaires et dans les mécanismes de défense des systèmes biologiques (**Catherine et al., 1997; Dicko et al., 2006; Macheix et al., 2005**).

L'activité antioxydante des composés phénoliques se manifeste par leur grande réactivité en perdant un proton pour donner un radical libre fortement stabilisé inhibant ainsi l'oxydation de façon indirecte en désactivant l'oxygène singulier (1O_2) ou en chélatant les métaux (**Boubekri, 2014; Gómez-Caravaca et al., 2006**).

Ce qui favorise le vieillissement cellulaire on interrompant le passage du stress oxydatif et interceptant le message de l'apoptose (**Macheix et al., 2005**).

II.5.2. Propriétés thérapeutiques

L'action antimicrobienne est liée à leur capacité de dénaturer les protéines et, agissent en provoquant la fuite cytoplasmique des constituants (les protéines, le potassium et le phosphore), qui est peut-être due à la perturbation du peptidoglycane de la cellule (**Sousa et al., 2006**).

Les polyphénols s'adhèrent aussi, à la surface de la membrane plasmique et pénètrent à l'intérieur de la cellule bactérienne, inactivant ainsi certaines enzymes telles que les perméases, qui sont impliquées dans le transport des substrats (aminoacides et des polysaccharides), ce qui peut entraîner une modification de la perméabilité cellulaire, induisant la lyse de la cellule bactérienne (**Łojkowska and Holubowska, 1992**).

D'après (**Rice-Evans et al., 1997**), les polyphénols sont des agents cardioprotecteurs et anticancéreux. Ils ont un effet sur le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurologiques (**Del Caro et al., 2004**) et possèdent également des activités anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériennes, antivirales (**Ali et al., 2007**), anti-allergènes et vasodilatatrices (**Falleh et al., 2008**). Enfin, ils contribuent à la diminution de l'oxydation du cholestérol dans les lipoprotéines à basse densité (**Middleton et al., 2000**).

III. Généralités sur les plans d'expériences

III.1. Définition

Les plans d'expériences, c'est l'application de méthodes mathématiques et statistiques, à l'expérimentation. Dans le but de la résolution des problèmes de l'organisation des essais, dus au nombre élevé de paramètres à étudier, qui ne permet pas la multiplication du nombre d'expériences étudiait, ainsi réaliser l'étude de plusieurs facteurs à la fois, par simple définition des tables d'expériences permettant de réduire considérablement le nombre d'expériences à effectuer sans diminuer la pertinence de la campagne d'essais.

Il consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs, qui sont les variables, discrètes ou continues, à chaque essai. Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse (**Faucher, 2006**).

L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise : « Obtenir un maximum d'information avec un minimum d'expériences » (**Tinsson, 2010**).

III.2. Terminologie

Les plans d'expériences ont un vocabulaire et une terminologie qu'il est nécessaire de définir.

III.2.1. Réponse

On appelle réponse la grandeur d'intérêt observée dans l'étude d'un phénomène. A pour objectif dans la plupart des cas la recherche d'un extremum (**Tinsson, 2010**).

III.2.2. Facteurs

On qualifie de facteur toute variable, obligatoirement contrôlable, susceptible d'influer sur la réponse observée (Tinsson, 2010).

III.2.3. Espace expérimental

C'est l'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur ou plus simplement le domaine du facteur. On a l'habitude de noter le niveau bas par -1 et le niveau haut par $+1$ (Goupy and Creighton, 2006) (Annexe N°4).

S'il y a un second facteur, il est représenté, lui aussi, par un axe gradué et orienté. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé l'espace expérimental (Goupy, 2006) (Annexe N°5).

III.2.4. Domaine d'étude

Le domaine d'étude est défini par la réunion des domaines des différents facteurs. Ce domaine d'étude est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais. Une étude, c'est-à-dire plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points répartis dans le domaine d'étude (Goupy, 2006) (Annexe N°6).

III.2.5. Surfaces de réponse

À chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. À l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localise sur une surface appelée surface de réponse (Goupy, 2006) (Annexe N°7).

III.3. Modèle mathématique postulé

Les plans d'expériences dits factoriels utilisent tous le modèle mathématique suivant qui relie la réponse y aux facteurs x_i . Ce modèle théorique est postulé a priori. Il s'agit d'un modèle polynomial.

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + e$$

Y : la réponse ou la grandeur d'intérêt, mesurée au cours de l'expérimentation et obtenue avec une précision donnée.

X_i : le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai, valeur parfaitement connue, dont le niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).

a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} : les coefficients du modèle mathématique adopté a priori doivent être calculés à partir des résultats des expériences

e:l'erreur expérimentale calculée par le logiciel (**Goupy, 2006**).

Ce modèle comporte dix coefficients, donc au minimum des équations pour les estimer. Le plan classique de box-behnken à trois facteurs comporte 13 équations indépendantes, une solution mathématique au problème. Les 15 points expérimentaux fournissent chacun une équation, dont dix équations servent à calculer les coefficients, et cinq pour le résidu

L'existence des points répétés au centre du domaine d'étude sert à calculer, par le logiciel, l'erreur expérimentale et le manque d'ajustement (**Goupy, 2006**).

III.4. Plan Box-Behnken

III.4.1. Description du plan

Ce sont des structures symétriques dans lesquelles chaque facteur prend trois niveaux (**Chagnon, 2005**). Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est construit sur un cube. Pour quatre facteurs, ce plan est construit sur un hypercube à quatre dimensions. Les points expérimentaux ne sont pas placés au sommet du cube ou de l'hypercube, mais au milieu des arêtes ou au centre des faces (carrés) ou au centre des cubes.

Cette disposition a pour conséquence de répartir tous les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, donc sur une sphère ou sur une hypersphère suivant le nombre de dimensions. Des points sont ajoutés au centre du domaine d'étude (**Goupy and Creighton, 2006**).

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs, est un cube possédant 12 arêtes à qui sont ajoutés, habituellement trois points d'expériences, au centre du domaine d'étude. Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs possède donc 15 essais (**Goupy and Creighton, 2006**) (**Annexe N°8**).

Partie expérimentale

Matériels
et
méthodes

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériel végétal

Le travail réalisé porte sur l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des noyaux d'olives « *Olea europaea .L* », récoltés au début du mois d'octobre de l'année 2016, dans le village d'Ighil Nacer, commune d'ighram, daïra d'Akbou (Bejaia).

Les prélèvements de l'échantillon sont effectués au hasard, sur plusieurs oliviers de variété **Aymel, Achemlal et Azeradj.**

Après la récolte, les olives ont été nettoyées, débarrassées d'impuretés et décortiquées manuellement, pour récupérer les noyaux, puis séchées à l'abri de la lumière à température ambiante.



Figure N°3 : Photographies des noyaux d'olives utilisées dans cette étude.

Une fois le séchage est fait, ces noyaux sont broyés à l'aide d'un moulin traditionnelle, afin d'obtenir une poudre très fine. Cette dernière est tamisée en utilisant un système de tamis électrique a porosité descendante (Retsch AS200), et les poudres ainsi obtenues $\Phi \leq 500\mu\text{m}$, $\Phi \leq 250\mu\text{m}$ et $\Phi \leq 125\mu\text{m}$ sont conservées à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un récipient hermétique et opaque.



Figure N°4 : Photographies de la poudre utilisée dans cette étude.

I.2. Test d'humidité

La détermination de l'humidité est réalisée selon la méthode décrite par (Doymaz et al., 2004). Une prise d'essai d'échantillon (1g) est séchée dans une étuve (Memmert type-ONE 7, Schutzart DIN EN 60529-IP 20. Germany) à $103^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ jusqu'à un poids constant. Le taux d'humidité des échantillons est calculé selon la formule suivante :

$$H (\%) = \frac{P_{\text{avant}} - P_{\text{après}}}{P_{\text{avant}}} \times 100$$

Où :

H (%) : Taux d'humidité en pourcentage.

P_{avant} : Poids de l'échantillon avant séchage.

P_{après} : Poids de l'échantillon après séchage.

I.3. Extraction des polyphénols

La poudre obtenue a été soumise à une extraction par macération selon la procédure décrite Par (Elfalleh et al., 2012), avec de légères modifications. Une prise d'essai de la poudre (1g) est mise en contact avec 20ml de solvant d'extraction, dans un dans Bain Marie sous agitation. Pendant un temps donné à une température donnée, à l'abri de la lumière, le mélange est filtré, puis l'extrait obtenu est ajusté au volume initial de solvant d'extraction. A la fin de cette opération, on obtient l'extrait correspondant, dont le taux d'extraction est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction} = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

D'où :

P₀ : Poids du bécher vide (gramme).

P₁ : Poids du bécher après évaporation (gramme).

E : Prise d'essai d'échantillon (gramme).

I.3.1. Optimisation des conditions de l'extraction des polyphénols

Le modèle expérimental est divisé en deux parties. Des essais préliminaires sont effectués, selon le modèle classique d'extraction en variant un paramètre et fixant les autres (Al-Farsi et al., 2005; Heinonen et al., 1998). Ces essais préliminaires sont effectués sur la poudre de noyaux de la variété Aymel.

Afin de pouvoir choisir la meilleure granulométrie, pour extraire les composés phénoliques de la poudre des noyaux d'olives, une série d'extractions est réalisée avec les trois granulométries : $\Phi \leq 500\mu\text{m}$, $\Phi \leq 250\mu\text{m}$ et $\Phi \leq 125\mu\text{m}$.

Afin de pouvoir choisir le meilleur solvant, pour extraire les composés phénoliques de la poudre des noyaux d'olives, une série d'essais est réalisée avec quatre solvants, dont l'éthanol, l'acétone, méthanol et l'eau distillée. L'extraction est effectuée en utilisant 1g de poudre dans 20ml de solvant à 40%, pendant 30 minutes à 40°C. Le choix du solvant adéquat est déterminé selon la teneur en polyphénols totaux extraite. Puis on joue sur la concentration de ce solvant, en gardent les mêmes conditions, et de la même façon on détermine le meilleur solvant et sa concentration.

Après avoir identifié le solvant ainsi que sa concentration adéquate, on doit déterminer le temps et la température optimale pour l'extraction. Une fois ces conditions fixées, il reste à optimiser le ratio et l'agitation.

L'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques, à partir de la poudre de noyaux d'olives selon la méthode de surface de réponse (MSR), le modèle mathématique polynomial a été développé. Le type du modèle choisi est le plan de Box-Behnken (Goupy, 2006).

Quatre facteurs (X_1 , X_2 , X_3 et X_4) à trois niveaux (-1, 0 et +1) sont appliqués pour optimiser l'extraction des polyphénols à partir de la poudre.

Tableau V : Niveaux des variables choisies pour les essais.

X_1 Concentration (%)	X_2 températures (°C)	X_3 temps (mn)	X_4 Ratio (m/v)
(-1)20	(-1)60	(-1)10	(-1)1/40
(0)40	(0)70	(0)30	(0)1/60
(+1)60	(+1)80	(+1)50	(+1)1/80

Le plan Box-Behnken comprend 27 essais dont l'essai centré (0, 0, 0) est répété trois fois pour vérifier l'erreur type et la reproductibilité du procédé d'extraction.

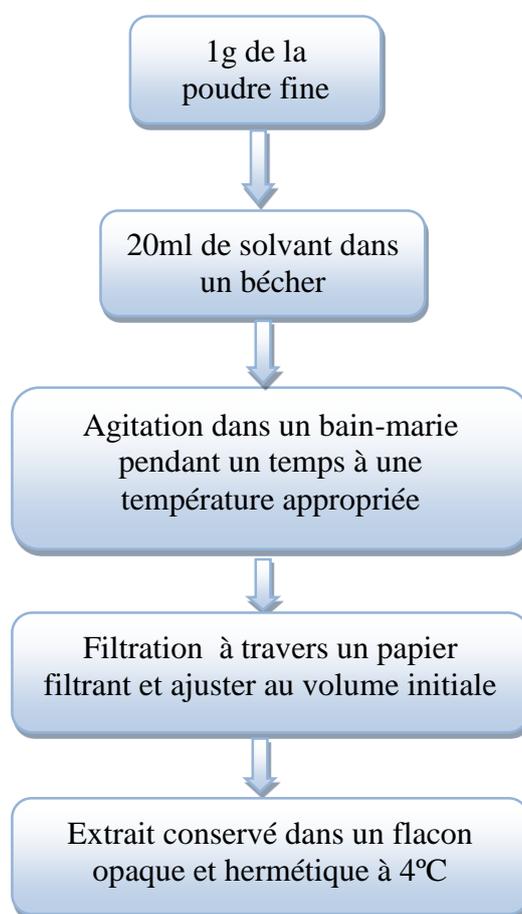


Figure N°5 : Protocole d'extraction des polyphénols (Elfalleh et al., 2012)

I.4. Dosage des antioxydants

I.4.1. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait est estimée selon la méthode décrite par (Georgé et al., 2005).

500µl d'extrait sont additionnés à 2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilue 1/10), le mélange a été incubé pendant 2 min à température ambiante à l'abri de la lumière, puis un volume de 2 ml de carbonate de sodium (7.5%) a été ajouté, suivie d'une incubation pendant 15 minutes à 50 °C et enfin refroidie dans un bain d'eau-glacée. L'absorbance a été immédiatement mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre (UV-VIS). La concentration en composés phénoliques de l'extrait, exprimée en mg équivalent d'acide gallique (EAG)/g d'échantillon, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique (Annexe N°9).

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), oxyde les composés phénoliques, les oxydes métalliques produits sont de couleur bleue, dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Enneb et al., 2015).

I.4.2. Dosage des flavonoïdes

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

Pour 1 ml d'extrait mélangé avec 1 ml de solution méthanoïque au chlorure d'aluminium à 2% après incubation à température ambiante pendant 15 min, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 430 nm, avec un spectrophotomètre (UV-VIS). Et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg d'équivalent de quercétine (EQ)/g d'échantillon, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec de la quercétine (Annexe N°10).

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 and Gautheret, 1968).

I.5. Détermination de l'activité antioxydante et antiradicalaire

L'activité antioxydante de l'extrait a été déterminée selon deux méthodes. La première est l'estimation du pouvoir réducteur qui mesure la capacité des extraits à réduire les ions métalliques (fer ferrique en fer ferreux). La deuxième évalue le pouvoir antiradicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation d'un radical (DPPH[•] et ABTS^{•+}) par les antioxydants présents dans notre échantillon.

I.5.1. Pouvoir réducteur

I.5.1.1. Réduction du chlorure ferrique

Le pouvoir de réduction ferrique des extraits a été déterminé en utilisant du ferricyanure de potassium-chlorure ferrique méthode (Oyaizu, 1986).

1ml d'extrait a été ajouté à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1%). Le mélange a été incubé à 50° C pendant 20 min, après on a ajouté 2,5 ml d'acide trichloroacétique (10%). Deux et un demi-millilitre du mélange ont été prélevés et mélangés avec 2,5 ml d'eau et 0,5 ml de $FeCl_3$ à 1%. L'absorbance à 700nm a été mesurée par un spectrophotomètre (UV-VIS), après avoir laissé reposer la solution pendant 30 min. 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°11).

L'analyse du pouvoir réducteur est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure- Fe^{3+} en fer ferreux (Fe^{2+}), en présence d'antioxydants réducteurs. La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Gülçin, 2012).

I.5.2. La neutralisation des radicaux libres

I.5.2.1. Inhibition du radical DPPH[•]

Le pouvoir antiradicalaire, par la neutralisation du radical DPPH[•], de l'extrait est évalué selon la méthode décrite par (**Brand-Williams et al., 1995**), légèrement modifiée par (**Lim et al., 2007**).

Pour 500µl d'extrait, 2ml de DPPH (0.06mg/ml) sont ajoutés. Après une incubation de 30 minutes à l'abri de la lumière, l'absorbance de l'extrait est mesurée à 517nm. Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] :

$$PI \% = [(Abs_{Témoin} - Abs_{Extrait}) / Abs_{Témoin}] \times 100$$

D'où :

Abs_{Témoin} : Absorbance du Témoin après 30 minutes à 517 nm.

Abs_{Extrait} : Absorbance de l'extrait après 30 minutes à 517 nm.

Un antioxydant a la capacité de donner un hydrogène au radical synthétique DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) de coloration violette (forme oxydée) pour le réduire en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picryl hydrazine) de coloration jaune-verte (**Molyneux, 2004**)

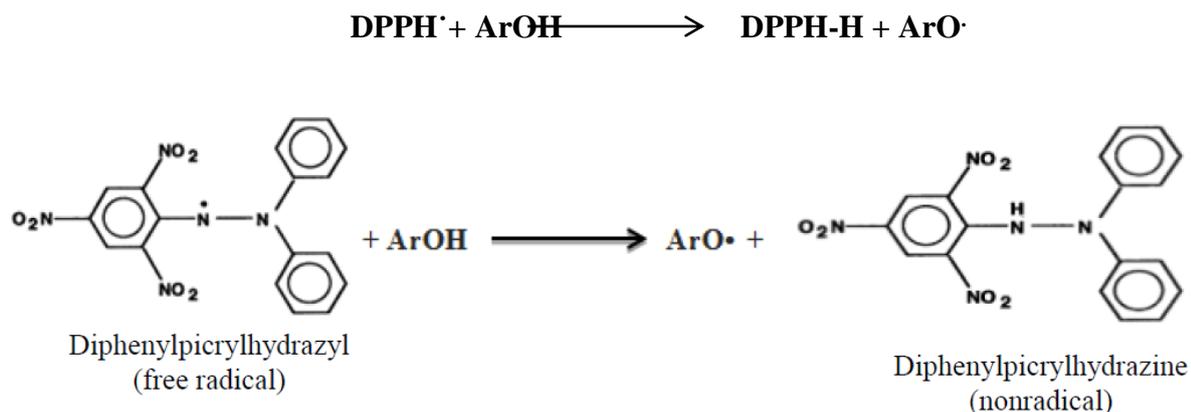


Figure N°6 : Réduction du Radical DPPH[•] (**Molyneux, 2004**).

I.5.2.2. Inhibition du radical ABTS^{•+}

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} est évalué par la méthode de (**Spigno and De Faveri, 2009**), qui repose sur la capacité des antioxydants à interagir avec le radical ABTS^{•+}, en diminuant son absorbance à 734 nm.

Une solution radicalaire (7 mM ABTS et 2,45 mM de persulfate de potassium) a été préparée et incubée à l'obscurité à température ambiante pendant 12-16 h avant son utilisation. Cette solution a ensuite été diluée avec de l'éthanol à 50% jusqu'à une absorbance de $0,705 \pm 0,02$ à 734 nm et équilibrée à 30°C. Des échantillons de contrôle, d'ébauche et d'extrait ont été préparés, respectivement ; 2 ml de solution radicalaire, 2 ml de solution radicalaire mélangée à 20µl de solvant d'extraction et 2 ml de solution radicalaire mélangée à 20µl d'extrait. L'absorbance a été lue, après 6 min d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, à 734 nm et l'activité antioxydante a été calculée en fonction de la diminution de l'absorbance en pourcentage selon l'équation :

$$PI\% = [(Abs_{\text{blanc}} - Abs_{\text{Echantillon}}) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100$$

D'où :

Abs_{Echantillon}: Absorbance des extraits, après 30 minutes, à 734 nm.

Abs_{Contrôle} : Absorbance du contrôle après 30 minutes à 734 nm.

Abs_{blanc}: Absorbance de blanc, à 734 nm.

La méthode qui détermine l'activité scavenger du radical ABTS est basée sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cationique ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) de coloration bleu verte en le transformant en ABTS-H⁺ incolore, par un don d'hydrogène (**Antolovich et al., 2002**). La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre.

I.6. Détermination de l'activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits étudiées, vis-à-vis des quatre souches bactériennes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), la technique de l'antibiogramme est utilisée. Les souches bactériennes sont à l'origine d'une collection du Laboratoire de Microbiologie Appliqué (LMA) de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

I.6.1. Test d'activité antibactérienne

I.6.1.1. Standardisation des souches

Une standardisation des souches est réalisée par spectrophotométrie pour l'obtention d'une suspension de 10^6 UFC/ml dont le but est d'avoir une charge homogène de toutes les souches étudiées pour pouvoir comparer l'effet antibactérien des extraits étudiés.

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton.

I.6.1.2. Test de l'activité antibactérienne

Une dilution de 10^{-2} a été préparée à partir des souches mères de 10^8 UFC/ml obtenus après standardisation, et chaque souche a étéensemencé par écouvillonnage dans les boîtes de pétri coulées de milieu gélose Muller Hinton.

Des disques en papier (5mm de diamètre) stériles sont imprégnés avec un volume de 20 μ l de chaque extrait (**Achemlal, Azeradj et Aymel**). Un disque témoin imbibé de l'éthanol à 33% est déposé dans chaque boîte.

Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 24h. L'activité antibactérienne des extraits testés est évaluée par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour des disques.

I.7. Étude statistique

Les résultats des essais préliminaires sont analysés par XLSTAT 2016, basé sur l'analyse de la variance (ANOVA-MANOVA) du teste LSD (teste de tukey). Tous les résultats sont exprimés en moyennes de trois valeurs \pm écart types. D'autre part, les résultats expérimentaux du plan d'expérience de Box-Benhken sont analysés par le logiciel JMP (logiciel de statistiques dans lequel une partie est consacrée aux plans d'expérience).

Résultats
et
discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Test d'humidité

L'humidité ; c'est connaître la teneur en eau de notre matrice, ce qui est important pour pouvoir estimer le rendement après séchage, de cette dernière. Le taux élevé d'humidité est une source de dégradation des antioxydants par le phénomène d'oxydation, En effet, l'eau est une source de dégradation dont l'inconvénient peut être éliminé par un séchage rapide, aussitôt après sa récolte (**Ribéreau-Gayon and Gautheret, 1968**).

Ainsi l'humidité résiduelle de la poudre étudiée est déterminée en utilisant la méthode pondérale, qui consiste à la détermination de la perte en eau par dessiccation à l'étuve, ce qui permettra d'uniformiser la teneur en eau et ainsi d'assurer un meilleur broyage et homogénéité. Le résultat obtenu est représenté dans la figure N°7.

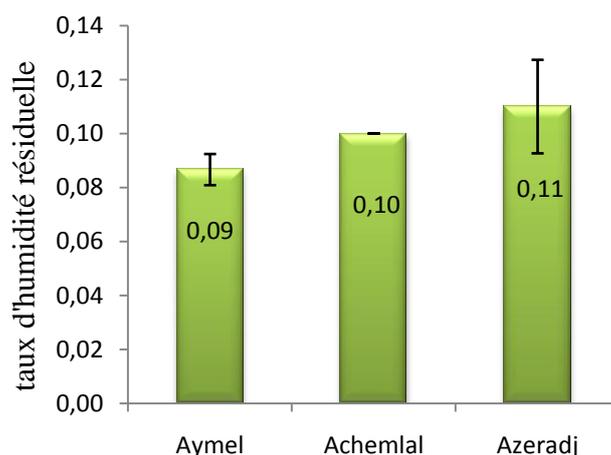


Figure N°7 : Teneur en humidité résiduelle de la poudre des noyaux d'olives étudiée

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures \pm ecartype.

Le résultat de la présente étude montre que la teneur en humidité de la poudre étudiée est d'environ 0.1%. Comparé aux travaux réalisés par (**Zaidi et al., 2009**), sur le grignon d'olive, qui est nettement plus riche en eau que la poudre de noyaux et qui est de l'ordre de 10 %.

Ce taux faible d'humidité de 0.1% permet de mieux conserver les propriétés antioxydantes des composés phénoliques de la poudre.

II.2. Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols

L'extraction est l'une des méthodes les plus utilisées dans les industries alimentaires, pour l'obtention des composés désirés retenus initialement dans la matrice de l'aliment (**Barzana et al., 2002**).

II.2.1. Essais préliminaires

II.2.1.1. Choix de la granulométrie

Pour extraire le maximum de polyphénols, de notre poudre on a opté pour une séparation de cette dernière en 3 granulométries différentes ($\Phi \leq 500 \mu\text{m}$), ($\Phi \leq 250 \mu\text{m}$) et ($\Phi \leq 125 \mu\text{m}$), car ce paramètre influence considérablement la teneur de polyphénols totaux extraite, 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**). La figure N°8 est l'illustration parfaite de cette influence.

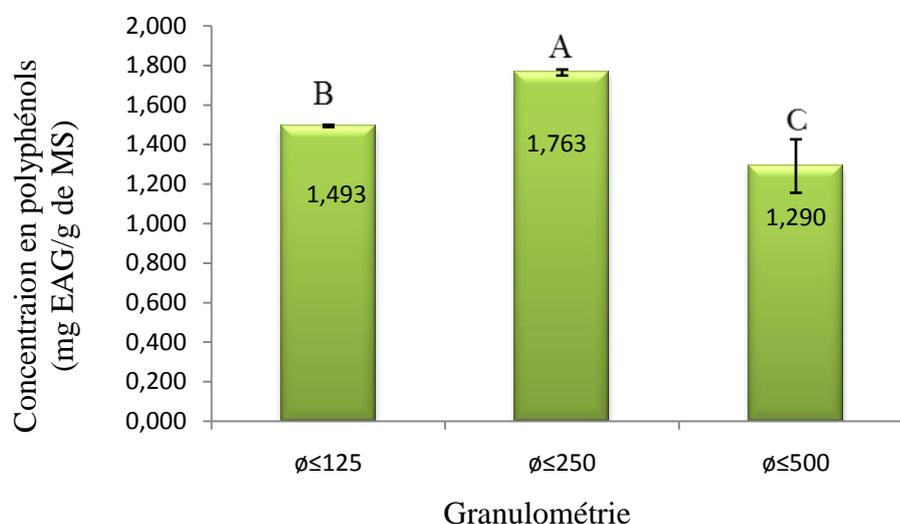


Figure n°8 : Influence de la granulométrie sur la teneur en polyphénols extraite.

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures \pm écart-type.

Les valeurs avec les différentes lettres (A-B-C) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes granulométries;

Les résultats sont classés en ordre descendant : $A > B > C$.

Les résultats de l'étude statistique ont révélé une différence significative entre les teneurs en polyphénols, extraites à partir de ces granulométries utilisées qui varient de 1.29 à 1.76 mg EAG/g de MS, dont la plus grande teneur, enregistrée pour la granulométrie ($\Phi \leq 250 \mu\text{m}$) qui est la meilleure pour l'extraction maximale des polyphénols.

Il s'avère de ce qui précède 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 ports, sans pour autant que celle-ci soit trop fine, afin d'éviter le phénomène de colmatage de cette dernière, et facilitant ainsi le contact avec le solvant, les particules très fines sont également plus difficiles à séparer

de l'extrait liquide après la fin de l'extraction (Mafart and Béliard, 1992; Penchev et al., 2010; Virginie et al., 2015), une observation similaire a été trouver par (Kossah et al., 2010).

II.2.1.2. Choix du solvant

La sélection du solvant d'extraction est une étape fondamentale dans l'optimisation des conditions d'extraction solide – liquide des antioxydants. Les solvants organiques sont les plus utilisés pour l'extraction (Escribano-Bailon and Santos-Buelga, 2003).

Afin d'extraire les polyphénols, quatre types de solvants sont utilisés à savoir l'acétone, l'éthanol, méthanol et l'eau distillée. Chaque extraction est effectuée à température 40°C dans le bain-marie, avec un temps d'agitation égale à 30 minutes. Les résultats obtenus, de l'effet de la nature du solvant, sur la teneur en polyphénols extraite sont représentés dans la figure N°9.

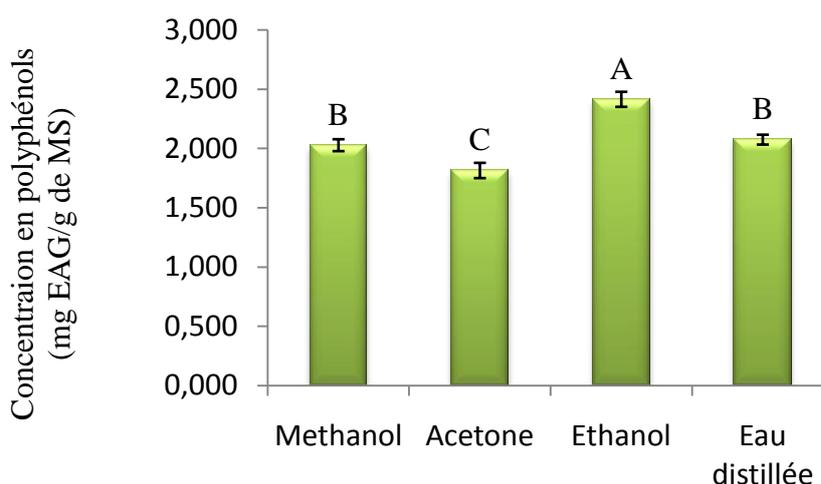


Figure N°9 : Effet de la nature du solvant sur la teneur en polyphénols extraite.

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-C) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différents solvants.

Les résultats sont classés en ordre descendant : $A > B > C$.

Les résultats décrits ci-dessus révèlent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur les polyphénols. Les résultats de l'étude statistique montrent une différence significative entre les teneurs extraites par ces solvants qui varie de 1,81 à 2,5mg EAG/g de MS.

Il s'avère que l'éthanol est le meilleur solvant d'extraction des polyphénols avec 2.5mg EAG/g de MS. Cette variation de la teneur extraite est due probablement à la différence de polarité existant entre les solvants utilisés (Naczk and Shahidi, 2006). Ce qui est en accord avec d'autres auteurs, qui ont trouvé que l'éthanol est le solvant idéal pour l'extraction optimale des polyphénols (Bourgou et al., 2016).

II.2.1.3. Choix de la concentration du solvant

Le mélange solvant-eau distillé semble très efficace pour l'extraction des polyphénols, car l'eau en combinaison avec le solvant contribue à la création d'une moyenne modérément polaire qui assure à la fois l'extraction des composés phénoliques et la préservation de leur activité antioxydante (Chirinos *et al.*, 2007).

La solubilité des polyphénols est étroitement liée au degré de Polymérisation en raison de l'augmentation de nombre de groupe hydroxyles, ainsi le choix du solvant sera conditionné par le caractère polaire des composés phénoliques présents dans la matrice étudiée (Savova *et al.*, 2007).

En prenant l'éthanol comme meilleur solvant d'extraction, il est aussi important de déterminer sa concentration idéale. Donc on réalise plusieurs extractions dans les mêmes conditions, en variant la concentration de l'éthanol.

L'étude statistique a montré une différence significative entre les teneurs en polyphénols extraites par les différentes concentrations d'éthanol utilisées, allant de 1.46 à 2.38mg EAG/g de MS, la concentration d'éthanol idéale doit être égale ou au voisinage de 40%. Par conséquent, le plan d'expérience Box-Behnken déterminera précisément la concentration réelle d'éthanol afin d'obtenir une teneur en composés phénoliques optimale.

Les teneurs les plus faibles ont été obtenues lorsque le milieu d'extraction est entièrement composé d'eau ou de solvant. Concernant les proportions 20%, 40% et 60%, et 80%, les concentrations en PPT prennent des valeurs intermédiaires. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par plusieurs auteurs (Chirinos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Spigno *et al.*, 2007).

II.2.1.4. Choix du ratio du solvant

Le volume de solvant, ou rapport masse de poudre/volume de solvant, est un facteur influençant sur l'extraction de polyphénols, c'est pour ça on a procédé à différentes extractions avec différents volumes de solvant. La figure N°10 montre les résultats de ces essais.

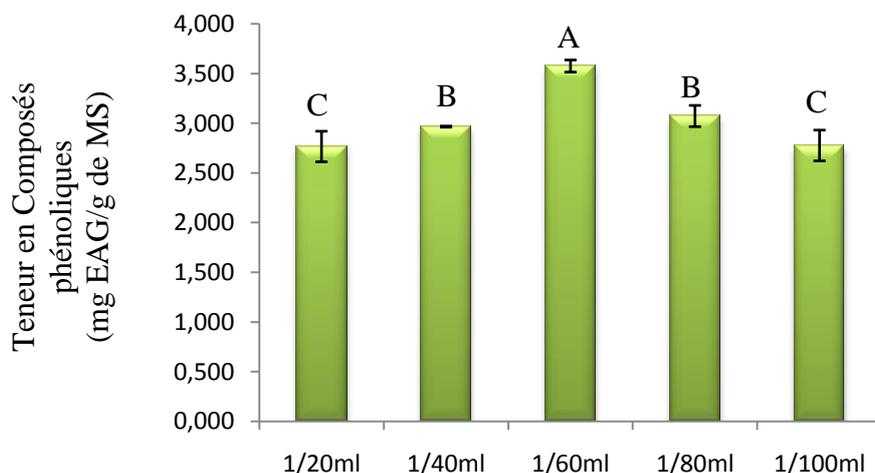


Figure N°10 : Effet du ratio sur la teneur en polyphénols extraite

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-C) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différents ratios Les résultats sont classés en ordre descendant : $A > B > C$.

D'après ces résultats et l'étude statistique faite, on conclue que le ratio idéal pour l'extraction optimale des polyphénols est aux environs de 1/60, qui est 1 g de poudre dans 60 ml de solvant, avec une teneur en polyphénols extraite de 3,57 mg EAG/g de MS. A l'aide du plan d'expérience Box-Behnken, le rapport m/v exacte sera précisément déterminé.

Ces résultats sont compatibles avec le principe du transfert de la matière, où la force de transmission durant ce transfert est le gradient de la concentration de soluté entre le solide et le liquide. Cette force devient importante lorsque le rapport solide/liquide utilisé est plus élevé (**Al-Farsi and Lee, 2008; Gaboriaud, 1996**).

Des résultats similaires sur l'effet du rapport solide/liquide sur l'extraction des polyphénols ont été rapportés pour les noyaux de dattes par (**Al-Farsi and Lee, 2008**) qui est 1g de poudre de noyaux de dattes dans 60ml de solvant.

II.2.1.5. Choix de l'intensité d'agitation

L'agitation influence aussi l'extraction de polyphénols, pour mettre en évidence cette influence, des extractions à différentes vitesses d'agitation ont été faites.

L'agitation mécanique des particules dans le solvant permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu. Elle a un effet toujours favorable sur l'opération, car elle permet de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface solide-liquide et d'augmenter le coefficient de transfert. Si l'agitation est très intense et/ou maintenue durant une longue période, elle peut favoriser des chocs entre les différentes particules et permettre ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans le milieu (**Dibert et al., 1989; Leybros**

and Fremeaux, 1990). Ce qui s'accorde avec les résultats trouvés dans notre étude, l'agitation doit être au maximum pour une extraction optimale en polyphénols.

II.2.1.6. Choix de la température

La sélection de la température d'extraction est l'une des étapes importantes de l'optimisation. L'augmentation de la température améliore l'extraction des polyphénols, en rendant les membranes cellulaires plus perméables, et augmente la solubilité et le coefficient de diffusion des composés à extraire. Elle diminue la viscosité du solvant ce qui facilite son passage dans les substrats solides. Cependant, les températures excessives peuvent causer la dégradation des composés phénoliques, ou cela peut provoquer une diminution de la sélectivité de l'extraction, ce qui limite les températures d'extraction à un certain seuil (**Careri et al., 2000**). Donc on a procédé à la sélection de la meilleure température, en réalisant une série d'extraction à différentes températures.

La teneur en PPT des extraits a augmenté progressivement avec l'augmentation de la température (20,40, 50, 60 et 70 °C), éventuellement en raison de l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques à des températures plus élevées. Ce qui est lié au taux de transfert de masse (Coefficient de diffusion) (**Ju and Howard, 2003**).

D'après les résultats obtenus et l'étude statistique faite, qui montre une différence significative entre l'effet des températures utilisées sur les teneurs en polyphénols extraite, allant de 1.93 à 2.95mg EAG/g de MS, on déduit que la température doit être proche de 70°C, pour une extraction optimale, mais le plan d'expérience Box-Behnken déterminera précisément l'idéale.

Ces résultats trouver dans notre étude sont concordants avec les résultats d'autres auteurs ayant travaillé sur le grignon d'olive (**Alu'datt et al., 2010**). Dont les résultats pour les teneurs en PPT extraite, augmentent progressivement avec l'augmentation de la température de 25 à 70°C, ou la teneur maximale en polyphénols totale était de 4,37mg EAG/g d'échantillon.

II.2.1.7. Choix du temps d'extraction

Le temps d'extraction est un autre paramètre principal dans la procédure d'extraction des composés phénoliques, il peut varier de quelques minutes à 24 heures (**Lapornik et al., 2005; Lee et al., 2005**).

Le temps pendant lequel le solvant et le matériel végétal sont mis en contact peut influencer la libération progressive de solutés à partir de la matrice végétale vers le solvant, et donc cela influence l'efficacité de l'extraction (**Michiels et al., 2012**). Par contre, un temps de contact prolongé

n'améliore pas toujours l'efficacité de l'extraction en favorisant l'oxydation des composés phénoliques (Santos-Buelga et al., 2012).

Dans notre cas, les temps d'extraction ont été de l'ordre de 10 minutes jusqu'à 50 minutes, les résultats sont représentés dans le graphe de la figure N°11.

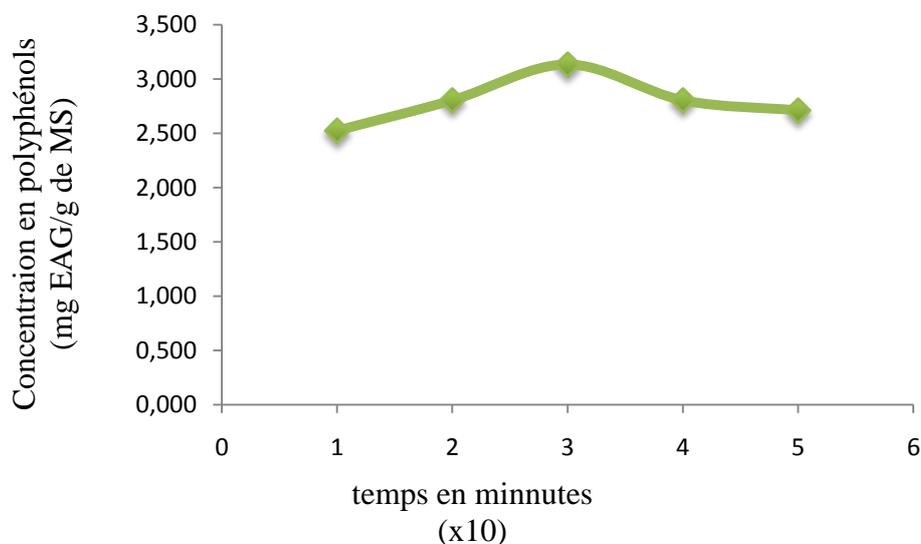


Figure N°11 : Effet du temps sur la teneur en polyphénols extraite.

La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures \pm écartype.

L'étude statistique révèle une différence significative, entre les teneurs en polyphénols extraites à différents temps d'extraction, qui varient entre 2,52 à 3,13mg EAG/g de MS. Par interprétation de ces résultats, le temps d'extraction doit être au voisinage de 30 minutes. Mais le plan d'expérience Box-Behnken déterminera précisément la durée exacte pour une extraction optimale des polyphénols.

Les résultats obtenus par d'autres auteurs ont montré une relation positive entre le temps d'extraction et le contenu phénolique total extraie à partir du grignon d'olive, éventuellement à cause de l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques sur une durée plus longue (Alu'datt et al., 2010).

II.2.2. Plan d'expérience Box-Behnken

Beaucoup de paramètres peuvent influencer l'efficacité de l'extraction des polyphénols, comme la méthode d'extraction, la nature et la concentration du solvant, la température d'extraction et le temps d'extraction (Banik and Pandey, 2008; Pinelo et al., 2005; Silva et al., 2007).

Quatre facteurs (X1, X2, X3 et X4) à trois niveaux (-1, 0 et +1) ont été appliqués pour optimiser l'extraction des polyphénols à partir de la poudre de noyaux d'olives. Les facteurs choisis dans la présente étude sont :

- La concentration du solvant (20, 40 et 60%) ;
- La température d'extraction (60,70 et 80°C) ;
- Le temps d'extraction (10, 30 et 50min).
- Le ratio poudre/solvant (1/40, 1/60 et 1/80).

L'analyse des résultats est présentée dans le tableau VI.

Tableau VI : Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expérience Box-Behnken de la poudre des noyaux d'olives.

Essai N°	Solvant (%v/v)	Température (°C)	Temps (min)	Ratio	Valeurs réelles TPC mg (d'EAG/g)	Valeurs prédites TPC mg (d'EAG/g)	Taux d'extraction des polyphénols
1	(-1)20	(0)70	(+1)50	(0)1/60	2,49	2,44	0,090
2	(0)40	(+1)80	(+1)50	(0)1/60	3,65	3,65	0,709
3	(0)40	(+1)80	(0)30	(+1)1/80	3,61	3,72	1,116
4	(-1)20	(-1)60	(0)30	(0)1/60	2,49	2,44	0,798
5	(0)40	(0)70	(+1)50	(-1)1/4	3,03	2,93	0,151
6	(+1)60	(0)70	(+1)50	(0)1/60	3,2	3,15	0,597
7	(+1)60	(0)70	(0)30	(-1)1/40	1,58	1,70	0,187
8	(+1)60	(+1)80	(0)30	(0)1/60	2,39	2,30	1,340
9	(0)40	(0)70	(-1)10	(+1)1/80	2,87	2,84	0,599
10	(+1)60	(-1)60	(0)30	(0)1/60	2,3	2,19	0,949
11	(0)40	(-1)60	(0)30	(-1)1/40	3,38	3,33	0,830
12	(-1)20	(0)70	(0)30	(-1)1/40	2,89	3,41	0,179
13	(0)40	(0)70	(0)30	(0)1/60	3,41	3,41	0,131
14	(-1)20	(0)70	(0)30	(+1)1/80	2,63	2,22	0,664
15	(0)40	(0)70	(+1)50	(+1)1/80	2,81	2,86	0,202
16	(0)40	(0)70	(+1)50	(+1)1/80	3,43	3,25	0,799
17	(0)40	(0)70	(0)30	(0)1/60	3,38	3,41	0,131
18	(0)40	(+1)80	(-1)10	(0)1/60	2,7	2,59	0,769
19	(-1)20	(0)70	(-1)10	(0)1/60	3,17	3,28	0,202

20	(-1)20	(+1)80	(0)30	(0)1/60	2,82	2,8	0,698
21	(0)40	(-1)60	(-1)10	(0)1/60	3,33	3,18	0,840
22	(0)40	(-1)60	(+1)50	(0)1/60	2,43	2,59	1,314
23	(+1)60	(0)70	(0)30	(+1)1/80	2,73	2,72	1,361
24	(0)40	(+1)80	(0)30	(-1)1/40	2,07	1,96	0,865
25	(0)40	(0)70	(0)30	(0)1/60	3,05	3,41	0,1311
26	(0)40	(-1)60	(0)30	(+1)1/80	1,71	1,88	1,294
27	(+1)60	(0)70	(-1)10	(0)1/60	1,72	1,83	1,123

Les résultats de la présente étude, montrent que les teneurs en composés phénoliques varient de 1,58 à 3,71mg EAG/g de MS Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (concentration du solvant, température, temps et ratio) sur le taux des polyphénols extrait,

II.2.2.1. Validation du modèle

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

II.2.2.2. Coefficient de corrélation

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de corrélation R^2 (Chan et al., 2009). Dans la présente étude, la valeur de R^2 est de 0,96, ce qui signifie qu'uniquement 0,04% des variations ne sont pas expliquées par le modèle. De plus, la valeur du coefficient de détermination ajusté est élevée ($R^2_{\text{ajusté}} = 0,90$), ce qui confirme la haute significativité du modèle.

La valeur du $R^2_{\text{ajusté}}$ (valeur du R^2 après élimination des coefficients inutiles du modèle) sera inférieure à celle de R^2 si le modèle contient beaucoup de termes inutiles (non significatifs) (El-Adawi et al., 2011).

L'analyse de la variance de la régression du modèle montre que le modèle 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 (Chin et al., 2010). Sachant que si dans un modèle, la P-value du manque d'ajustement est significatif ce modèle sera rejeté (Granato et al., 2010).

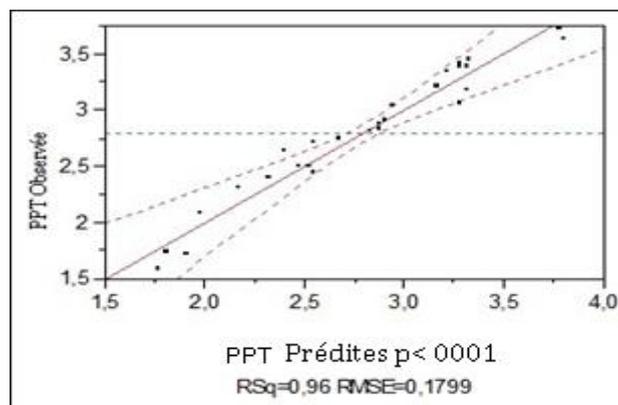


Figure N°12 : Plan de prédiction réelle de la poudre de noyaux d'olives étudiée

II.2.2.3. Effet des facteurs (coefficients)

L'analyse de la variance de la régression des coefficients consiste à analyser l'impact des variables (X_1 , X_2 , X_3 et X_4) à $p < 0.05$, afin de déterminer le degré d'influence des facteurs (concentration du solvant, température, temps et ratio) 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 représentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Estimation des coefficients de régression du modèle polynomiale de deuxième degré.

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	P-value
Constante	3,28	0,103842	31,59	<0,001*
Linéarité				
X1-concentration du solvant(20,60)	-0,214167	0,051921	-4,12	0,0014*
X2-température(60,80)	0,1383333	0,051921	2,66	0,0206*
X3-temps(10,50)	0,1408333	0,051921	2,71	0,0189*
X4-ratio(40,80)	0,1016667	0,051921	1,96	0,0739
Interaction				
X2-température*X4-ratio	0,8025	0,08993	8,92	<0,001*
X3-temps*X4-ratio	0,085	0,08993	0,95	0,3632
Quadratique				
X1-concentration du solvant*X1-concentration du solvant	-0,5675	0,077881	-7,29	<0,001*
X2-température*X2-température	-0,25125	0,077881	-3,23	0,0073*
X3-temps*X3-temps	-0,0075	0,077881	-0,10	0,9249
X4-ratio*X4-ratio	-0,27625	0,077881	-3,55	0,0040*

➤ Effet linéaire

Les résultats de la présente étude, montre que le facteur qui possède une influence hautement significative sur l'extraction des polyphénols de la poudre étudiée est la concentration du solvant (X_1), température (X_2) et le temps d'extraction (X_3) avec une probabilité de $P= 0,0014$; $0,020$ et $0,018$ respectivement, cependant l'impact est non significatif pour le facteur (X_4) à savoir le ratio.

Des variations marginales dans la composition du solvant peuvent provoquer des impacts significatifs sur la qualité et la quantité des composés extraits (**Luthria, 2008**). En effet plusieurs études ont montré l'importance de la concentration du solvant par rapport aux autres facteurs (**Chan et al., 2009**; **Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005**; **Uma et al., 2010**; **Yap et al., 2009**).

Selon (**Spigno et al., 2007**), les mélanges alcool-eau distillée donne une meilleure efficacité d'extraction des composés phénoliques comparant aux systèmes à solvant unique. En augmentant la proportion de l'eau distillée à l'éthanol, la polarité du solvant augmente, ainsi le système solvant sera capable d'extraire les polyphénols à haute polarité et ceux à polarité basse et également ceux à polarité moyenne (**Zhang et al., 2007**).

D'après les résultats trouver par (**Telli et al., 2010**), le temps d'extraction, si il combiné au bon type de solvant, il influence considérablement sur l'extraction des polyphénols, ce qui nous permet de dire que la prolongation du temps d'extraction accroît d'une manière significative le pouvoir d'extraction.

L'augmentation de la température accroît la solubilité et la diffusivité dans la solution et réduit sa viscosité. La chaleur facilite l'extraction aussi, car elle augmente la perméabilité des parois cellulaires. Selon (**Galvan D'Alessandro, 2013**; **Larrauri et al., 1997**), la température est le paramètre le plus influant sur la modification des polyphénols.

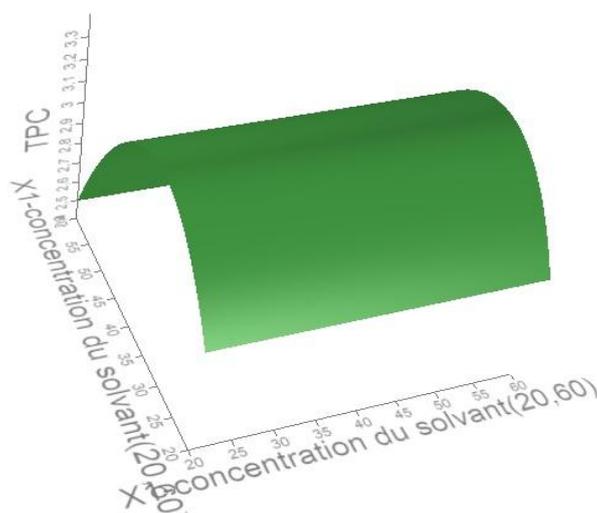


Figure N°13 : Surface de réponse de linéaire (concentration)

➤ Effet d'interaction

Les résultats obtenus indiquent que l'interaction ratio-température (X_4 - X_2) est significative sur l'extraction des polyphénols avec une probabilité $P=0,001$

Et que les interactions concentration du solvant-temps (X_1 - X_3) est non significatif avec la probabilité supérieure à 0,36.

En conclusion, l'ensemble des résultats des effets exercés par les facteurs considérés montrent que le volume du solvant est un facteur très significatif, ainsi que la température. Cela peut s'expliquer par les effets multiplicateurs du traitement préalable et le potentiel en composés extractibles élevés. En pénétrant plus profondément dans la matrice solide, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande de soluté, favorisant ainsi la libération des composés phénoliques. Le grand pouvoir d'imprégnation et de température élevée qui augmente considérablement la solubilité et le coefficient de diffusion des composés à extraire, faisant diminuer la résistance liée au transfert de matière interne (**Bonnaillie et al., 2012; Careri et al., 2000**).

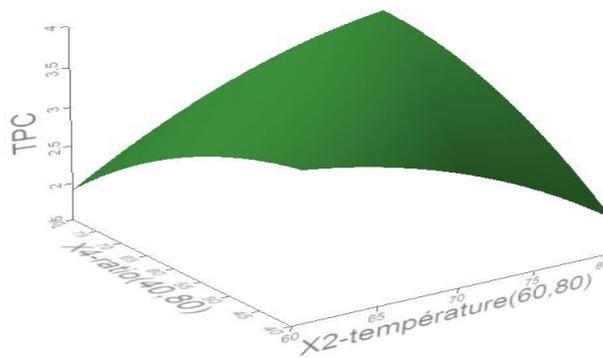


Figure N°14:Surface de réponse de l'interaction (Température-ratio)

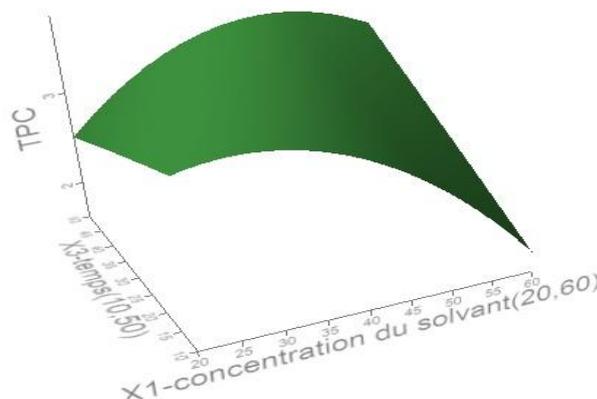


Figure N°15:Surface de l'interaction (concentration-temps)

➤ Effet quadratique

Les résultats de la présente étude (Tableau N°7), indique que les effets quadratiques X_1^2 (concentration-concentration) X_2^2 (température-température) et X_4^2 (ratio-ratio) sont hautement significatifs sur la teneur en polyphénols, extraite de la poudre de noyaux d'olives avec des probabilités respectives de <0,001; 0,0073 et 0,004 contrairement aux autres X_3^2 (temps-temps) qui est non significatif avec une probabilité de 0,9249.

Ces résultats montrent l'importance du solvant (concentration et ratio) ainsi que la température d'extraction,

La présence de sucres attachés aux polyphénols tend à rendre ces derniers plus polaires, donc l'utilisation de solvants aqueux favorise leur extraction (**Bradshaw et al., 2001; Rice-Evans and Packer, 2003**), ce qui explique l'influence de ces paramètres sur la teneur de polyphénols extraite, car un grand volume et une petite concentration de solvant signifient un pourcentage élevé en eau, qui se traduit par une polarité plus grande, ce qui favorise l'extraction de ces polyphénols attachés aux sucres.

II.2.2.4. Modèle mathématique

Lorsque les facteurs sont clairement identifiés et la réponse est connue, un plan d'expérience avec une liste d'expériences à réaliser est proposé afin de cerner au mieux le phénomène étudié. 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) (**Tinsson, 2010**).

Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan de Box-Behnken pour quatre 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 :

$$Y = 3,28 - 0,214167X_1 + 0,138333X_2 + 0,140833X_3 + 0,08025X_4 - 0,5675X_1^2 - 0,25125X_2^2 - 0,27625X_4^2 + 0,48$$

Avec ce modèle, le calcul de toutes les réponses dans le domaine d'étude sera possible. Il suffit d'attribuer des valeurs aux niveaux X_1 , X_2 , X_3 et X_4 pour obtenir immédiatement la teneur en polyphénols totaux.

II.2.2.5. Solution

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 sont obtenues au sein du domaine expérimental.

Tableau VIII : Conditions optimales d'extraction des polyphénols à partir de la poudre étudiée.

Variable	Valeur critique
Température (60,80)	70,628473
Concentration du Solvant (20,60)	33,443035
Temps (10,50)	24,026563
Ratio (1/40,1/80)	1/60
Valeur prévue de la solution	4,65±0,48

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 beaucoup plus affectée par la concentration du solvant, suivie respectivement par le temps et la température d'extraction. Pour avoir une teneur en composés phénoliques de l'ordre de 4.65mg EAG/g de poudre.

II.3. Dosage des antioxydants

II.3.1. Polyphénols totaux

La méthode utilisant le réactif deFolin-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 la poudre de noyaux d'olives est rapportée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par 1 gramme d'échantillon (mg EAG/g), en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure N°16.

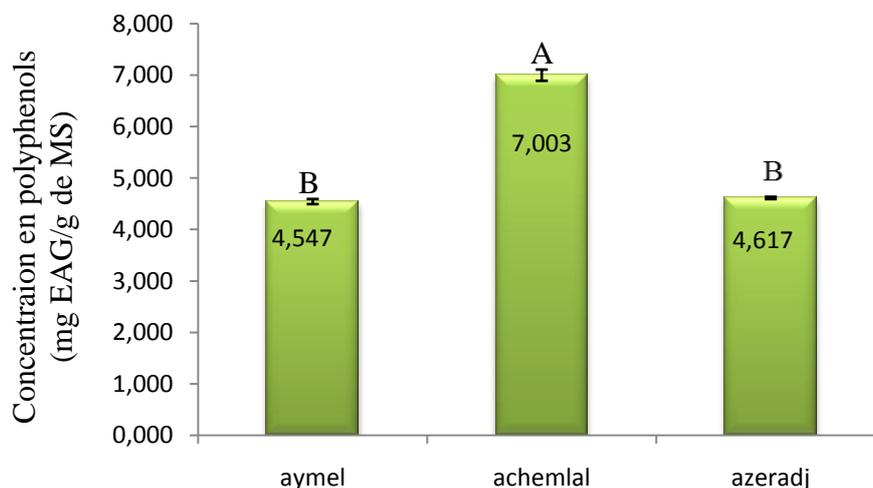


Figure N°16 : Histogramme représentatif des teneurs en polyphénols totaux des différentes variétés.

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-C) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés; les résultats sont classés en ordre descendant : $A > B > C$.

Le résultat de la présente étude, montre que la teneur en composés phénoliques des extraits étudiés est en moyenne de 4,54 mg d'EAG/g MS de poudre. Ce résultat est très proche de celui de l'intervalle de prédiction du plan d'expérience Box-Behnken estimé à $4.64 \pm 0,48$ mg EAG/g MS. L'étude statistique montre une différence significative entre la teneur en polyphénols des trois variétés étudiées, qui sont de 7,003mg EAG/g MS, enregistré pour la variété **Achemlal** qui est la plus riche en polyphénols, suivis par **Azeradj** avec une teneur de 4,617mg EAG/g et **Aymel** en derniers avec 4,54mg EAG/g de MS. Plusieurs études confirment cette variation, par l'influence de la variété du fruit et la saison de récolte sur la teneur en polyphénols (**Burda et al., 1990; Crisosto et al., 2010; Kennedy et al., 2001**).

Nos résultats sont confirmés par (**Elbir et al., 2014**) qui a trouvé des teneurs en polyphénols de 2,55 et 8,25mg EAG/g de poudre de noyaux de deux variétés différentes d'olives appeler « **Haouzia et Picholine** ». Comparé pour la pulpe d'olive qui détienne une concentration en PPT de 16,43mg EAG/g de matière sèche enregistrée par (**Nadour, 2015**).

II.3.2. Flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de la poudre étudiée, exprimés par mg d'équivalent de Quercétine (EQ)/g de l'échantillon en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions, est représentée dans la figure N°17.

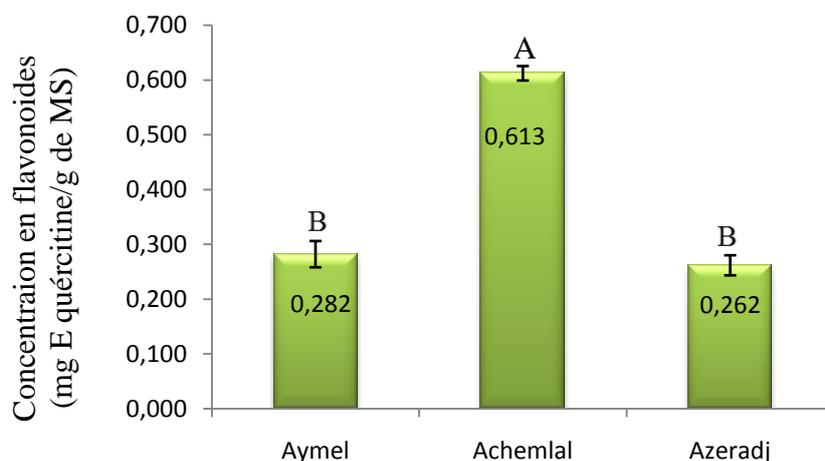


Figure N°17 : Histogramme représentatif des teneurs en flavonoïdes des différentes variétés.

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-C) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés; Les résultats sont classés en ordre descendant : $A > B > C$.

D'après le résultat obtenu dans cette étude, la teneur en flavonoïdes de la poudre des trois variétés étudiées est en moyenne de 0,386mg d'équivalent de quercétine/g de poudre.

Globalement, la variété **Achemlal** est la plus riche en flavonoïdes avec une teneur de 0,613mg EQ/g suivi par **Aymel** contenant 0,286 mg EQ/g et en dernier vient la variété **Azeradj** avec une concentration de 0,262mg EQ/g en flavonoïdes.

Les résultats de la présente étude sont proches de ce enregistré par (**Zaidi et al., 2009**) dans le grignon d'olive avec des teneurs de 0,24mg EQ/g de produit. Et de ce de (**Hannachi et al., 2013**) avec 0,17mg EQ dans 1g de poudre noyaux d'olives.

La présence de telles substances est en effet rapportée par de nombreux auteurs, a propos de l'olive et du grignon d'olive (**Cardoso et al., 2005; Nefzaoui, 1985; Ranalli et al., 2006**).

L'écart trouvé entre les résultats obtenus et les données des différents auteurs sont tout à fait justifiés. En effet les conditions d'extraction ainsi que les origines des échantillons et la saison de collecte régissent ces variations (**Ranalli et al., 2006**). Les différences peuvent aussi être attribuées à l'origine géographique ou aux facteurs climatiques.

II.4. Activités antioxydantes et anti-radicalaires

L'activité antioxydante de la poudre de noyaux d'olives étudiée est évaluée selon deux principes. Le premier, regroupe les tests de la réduction de chlorure ferrique, qui mesure la capacité antioxydante ou le pouvoir réducteur. Le deuxième inclut les tests scavenger vis-à-vis des radicaux DPPH* et ABTS*+, qui mesure le pouvoir antiradicalaire des différentes substances présentes dans les extraits.

II.4.1. Pouvoir réducteur

II.4.1.1. Réduction du chlorure ferrique

Le potentiel antioxydant de la poudre étudiée est estimé en utilisant la méthode de réduction du ferrocyanure de potassium. La présence des composés réducteurs (antioxydants) dans les extraits cause la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) du ferrocyanure de potassium pour donner du fer ferreux (Fe^{2+}) (Chung et al., 2002). La couleur jaune de ferrocyanure de potassium vire vers une couleur bleu verte, dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'extrait (Manian et al., 2008).

L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur (Ozsoy et al., 2008; Ribeiro et al., 2008).

Le résultat de l'évaluation du pouvoir réducteur du mélange étudié est représenté dans la figure N°18.

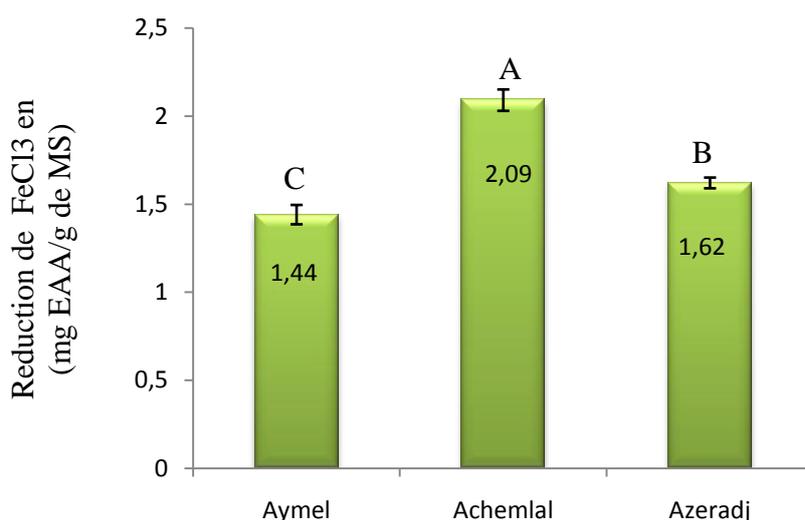


Figure N°18 : Pouvoir réducteur de la poudre étudiée.

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-C) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés; les résultats sont classés en ordre descendant : $A > B > C$.

D'après le résultat obtenu dans la présente étude, le pouvoir réducteur des extraits de poudre de noyaux d'olives à une concentration de 16,66mg/ml est de l'ordre de 2,09mg EAA/g de MS pour **Achemlal** et 1,62mg EAA/g de MS concernant **Azeradj** puis **Aymel** avec 1,44mg EAA/g de MS.

La réduction du chlorure ferrique est souvent utilisée comme indicateur d'activité des donneurs d'électrons qui est un mécanisme important pour l'action antioxydante des polyphénols (Yang et al., 2009).

D'après (Nadour, 2015) la pulpe d'olive détient une capacité de réduction du chlorure ferrique de 24mg d'équivalent de vitamine E par g de produit.

L'étude statistique montre l'existence d'une bonne corrélation entre la réduction de FeCl_3 avec les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes avec des coefficients de corrélation de l'ordre de $r=0,969$; $r=0,948$ respectivement (**Annexe N°13**).

II.4.2. Pouvoir antiradicalaire

II.4.2.1. Pouvoir anti- radical DPPH•

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) est un radical libre stable, utilisé pour évaluer la capacité d'un antioxydant naturel d'épurer un radical libre (free radical-scavenging). Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par le mélange étudié, est représenté dans la figure N°20.

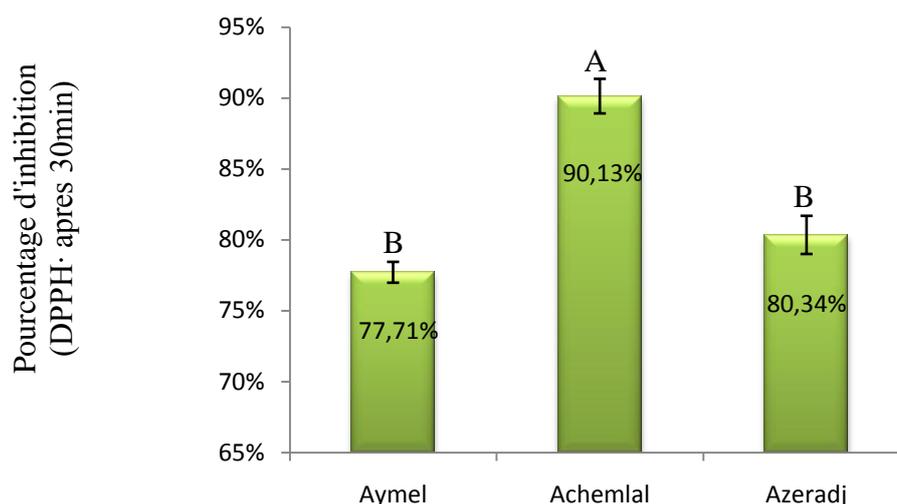


Figure N°19 : Pouvoir antiradicalaire *vis -à- vis* le radical DPPH• de la poudre étudiée.

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-C) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés; Les résultats sont classés en ordre descendant : $A > B > C$.

D'après le résultat obtenu, la capacité d'inhibition du radical DPPH• par les extraits de poudre des trois variétés de noyaux d'olives étudiés, à une concentration de 16,66mg/ml est de 90,13% pour **Achemlal** suivie par **Azeradj** avec 80,34%, puis **Aymel** en dernier à 77,71%.

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 sont de l'ordre de 0.984 et 0.967, respectivement (**Annexe N°13**).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec l'Acide ascorbique et l'Acide gallique avec des concentrations respectivement de l'ordre de 0,009mg/ml ; 0,006mg/ml \pm 0,001.

D'après (**Hannachi et al., 2013**) le noyau d'olive possède une capacité antiradicalaire de 12,14 mM TEAC.

Plusieurs études ont démontré que le pouvoir antiradicalaire est influencé par la méthode d'extraction, le solvant (nature et concentration), la température et le temps d'extraction (**Jalili et al., 2011; Lim et al., 2011; Stanisavljević et al., 2009**). Ces différences de résultats peuvent être attribuées non seulement au mode d'extraction utilisé mais aussi à la composition de notre échantillon.

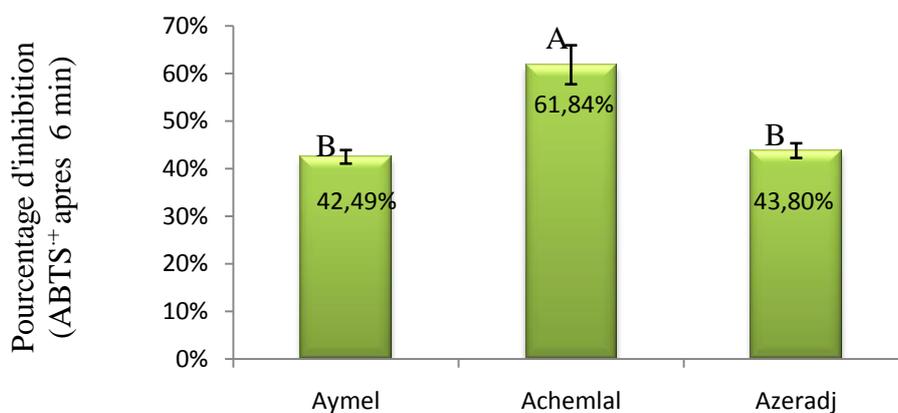
La neutralisation des radicaux libres inhibe l'oxydation des lipides qui peut être nuisible aux composants et aux fonctions cellulaires, ainsi la consommation des antioxydants naturels peut contribuer à la protection contre les maladies dégénératives induites par le stress oxydatif (**Lim et al., 2011**).

II.4.2.2. Pouvoir anti- radical cation ABTS^{•+}

L'ABTS «2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide) » est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons. La méthode est basée sur l'aptitude des molécules antioxydantes d'éteindre la longue durée de vie du radical cation ABTS^{•+} (**Kumaraswamy and Satish, 2008**).

L'obtention du radical cation ABTS^{•+} résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine ou horseradish peroxydase) en présence de H₂O₂ ou d'un oxydant (oxyde de manganèse ou persulfate de potassium) (**Arnao et al., 2001; Benavente-Garcia et al., 2000; Lien et al., 1999; Miller and Rice-Evans, 1997; Miller et al., 1996; Re et al., 1999**).

Le radical ABTS^{•+}, en contact avec un donneur de H[•] conduit à l'ABTS⁺ et à la décoloration de la solution à 734 nm (**Lien et al., 1999**). Le pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS^{•+} par le mélange étudié, est représenté dans la figure N°21.



La barre verticale représente l'écart-type.

La valeur représente la moyenne de 3 mesures \pm écart-type

Les valeurs avec les différentes lettres (A-B-C) sont significativement différentes (Tukey, $p < 0.05$) pour les différentes variétés; Les résultats sont classés en ordre descendant : A>B>C.

D'après le résultat obtenu, la capacité d'inhibition du radical ABTS⁺ par les trois extraits des poudres étudiées, après six minutes d'incubation est de 61,58% concernant la variété **Achemlal**, suivis par **Azeradj** avec 43,8% et **Aymel** vient en dernier possède 42,49%, à une concentration de 16,66 mg/ml.

D'après (**Hannachi et al., 2013**) le noyau d'olive possède une capacité antiradicalaire de 0,64 mM TEAC.

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 ABTS^{•+}, aussi bien avec la teneur en composés phénoliques qu'avec la teneur en flavonoïdes, dont les coefficients de corrélation correspondants sont de l'ordre de 0,999 et 0,993, respectivement (**Annexe N°13**).

D'après (**Manian et al., 2008**), les composés phénoliques de poids moléculaires élevés ont plus de capacité pour capter les radicaux libres (ABTS⁺) et que leur efficacité dépend du poids moléculaire, du nombre de noyaux aromatiques et de la nature de substitution des groupements hydroxyles.

II.5. Analyse statistique des résultats

II.5.1. Résultats de l'analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode d'analyse multi-variée permettant l'étude simultanée d'un grand nombre de variables dont l'information totale ne peut pas être visualisée à cause d'un espace à plus de trois dimensions. Cette méthode permettrait de préciser les relations entre les variables et les phénomènes à l'origine de ces relations (**Ayadi et al., 2008**).

L'analyse statistique des données phyto-chimiques a été effectuée sur une matrice de données constituée de cinq variables et trois variétés, soit 5 variables et 3 individus. Le logiciel statistique XLSTAT 2016 a été utilisé pour le traitement des données.

La figure N°21 montre la projection des trois variétés de noyaux d'olives étudiées (**Achemlal, Azeradj et Aymel**) dans le plan 1-2. Elle montre une bonne répartition des cultivars traduisant ainsi une diversité existante au sein des variétés étudiées ici.

L'analyse en composantes principales permet de déterminer deux groupes :

Groupe A : comprends les deux variétés **Aymel et Azeradj**.

Groupe B : comprends la variété **Achemlal**.

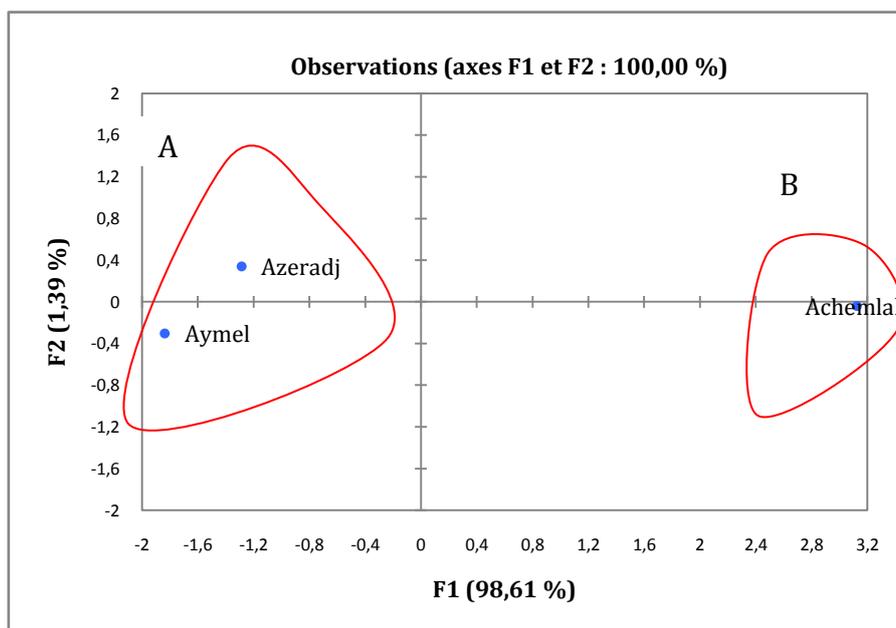


Figure N°21 : Distribution des variables dans le plan 1-2 révélée à partir de l'ACP chez les trois variétés de noyaux d'olives.

Pour mieux apprécier la diversité entre les trois variétés de noyaux d'olives selon la teneur en PPT, teneur en flavonoïdes, activité antioxydante « DPPH· et ABTS » et pouvoir réducteur « FeCl_3 », nous avons procédé à une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) sur la base de chacune de ces cinq variables et les résultats sont présentés dans le dendrogramme de la figure N°22.

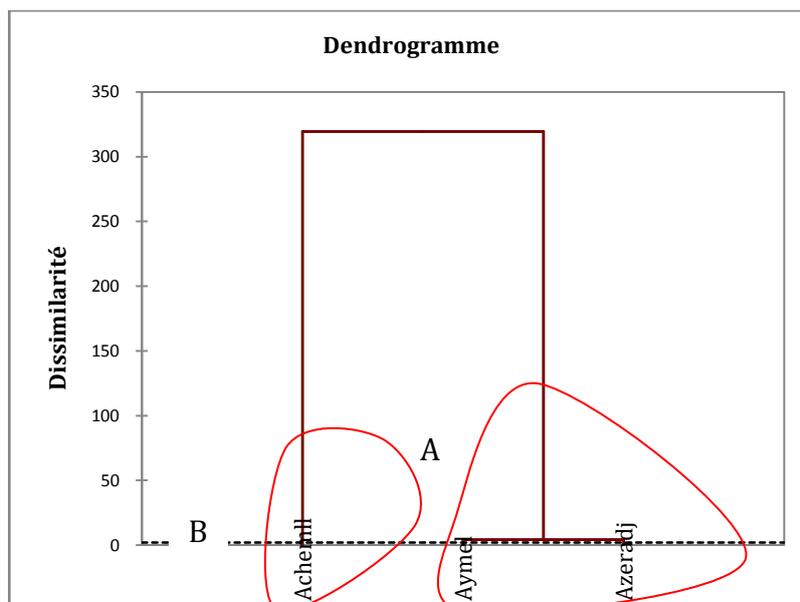


Figure N°22 : Dendrogramme de la classification hiérarchique des variétés de noyaux d'olives étudiées.

II.6. L'activité antibactérienne

Cette étude a pour but d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de noyaux d'olives étudiés *vis-à-vis* des souches bactériennes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique, car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous.

Pour cela l'éthanol a été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente pas d'effet considérable sur la croissance normale des souches microbiennes.

Les résultats de la présente étude indiquent l'absence de zones d'inhibition aux tours des disques d'antibiogrammes. Cela signifie que ces souches bactériennes étudiées ne présentent pas une sensibilité *vis-à-vis* des extraits phénoliques de la poudre de noyaux d'olives (**Annexe N°16**)

L'activité antibactérienne des substances actives d'origine végétale dépend surtout de la nature des bactéries Gram+ ou Gram- et aussi de la méthode d'extraction réalisée (**Basli et al., 2012**).

Selon (**Cowan, 1999**), qui explique que la toxicité des extraits envers les microorganismes est due aux différentes classes de polyphénols essentiellement les flavonoïdes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur les composés phénoliques. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (**Dhaouadi and Adhoum, 2010**).

Conclusion

Conclusion

Le modèle expérimental est divisé en deux parties. Des essais préliminaires sont effectués, selon le modèle classique d'extraction en variant un paramètre et fixant les autres. Ces essais préliminaires sont effectués sur la poudre de noyaux de la variété **Aymel**.

La présente étude a pour but d'optimiser l'extraction des antioxydants par le dosage des composés phénoliques des extraits de poudre de noyaux d'*Olea europea* L.

Le plan box-Benken a permis d'identifier les meilleurs paramètres d'extraction : Ethanol 33% à un volume de 60ml et à une température 71°C sous agitation, pendant un temps d'extraction de 24 min.

Les taux des composés phénoliques retrouvés, sous les conditions optimales, sont respectivement de l'ordre de 4,54; 4,617 et 7,003mg EAG/g pour **Aymel**, **Azeradj** et **Achemlal** de MS. Concernant les teneurs en flavonoïdes de l'extrait optimisé, quant à elles sont de l'ordre de 0,262mg EQ/g pour **Aymel**, 0,282mg EQ/g pour **Azeradj**, 0,613mg EQ/g pour **Achemlal**.

Le pouvoir réducteur, estimé par le test de réduction de chlorure ferrique, des extraits optimaux est de l'ordre de 1,44; 1,62 et 2,09mg d'Acide ascorbique/g respectivement pour les trois variétés **Aymel**, **Azeradj** et **Achemlal**. Le pouvoir anti radicalaire DPPH* et l'ABTS⁺, des variétés de noyaux d'olives étudiées à la concentration de 16,66 mg/ml, ont révélé des pourcentages d'inhibitions de l'ordre de 77,7% et 42,49% pour **Aymel**, 80,34% et 43,8% pour **Azeradj** 90,13% et 61,84% pour **Achemlal** respectivement.

L'activité antibactérienne des trois variétés de noyaux d'olives étudiés a été testée sur quatre souches bactériennes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Les résultats obtenus indiquent que les extraits phénoliques des noyaux d'olives n'ont pas d'effet antibactérien.

En termes de perspectives et dans le but de compléter ce travail dans l'avenir, il serait intéressant de :

- Utiliser des techniques d'analyse avancées (CCM, HPLC, CPG, ...) pour identifier les antioxydants de l'extrait.
- Déterminer l'activité antibactérienne vis-à-vis d'autres souches bactériennes.
- Étudier les autres activités biologiques (*in vivo*) de l'extrait optimal; anti-inflammatoire, antimutagène, anticancérigène...etc. de l'extrait optimal.
- Élargir l'échantillonnage pour l'ensemble du territoire national; et analyser l'effet de l'origine géographique sur la composition en antioxydant, et sur leur activité biologique.

Références
Bibliographiques

A.F.I.D.O.L., 2012. Association Française Interprofessionnelle de l'olive, section spécialisée olive de l'ONIDOL (Organisation Nationale Interprofessionnelle Des Oléagineux).

A.F.I.D.O.L., 2017. Française Interprofessionnelle de l'olive, section spécialisée olive de l'ONIDOL (Organisation Nationale Interprofessionnelle Des Oléagineux).

Al-Farsi, M.A., Lee, C.Y., 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry* 108, 977-985.

Ali, M.B., Hahn, E.-J., Paek, K.-Y., 2007. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules* 12, 607-621.

Alu'datt, M.H., Alli, I., Ereifej, K., Alhamad, M., Al-Tawaha, A.R., Rababah, T., 2010. Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chemistry* 123, 117-122.

Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M., 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73, 239-244.

Ayadi, I., Habib, H., Yasmine, D., 2008. International Water Resources Association. XIII th World Water Congress 1, Montpellier, France.

Banik, R., Pandey, D., 2008. Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology. *Industrial crops and products* 27, 241-248.

Barzana, E., Rubio, D., Santamaria, R., Garcia-Correa, O., Garcia, F., Ridaura Sanz, V., López-Munguía, A., 2002. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4491-4496.

Basli, A., Chibane, M., Madani, K., Oukil, N., 2012. Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* 10, 2-9.

Belaj, A., Trujillo, I., De la Rosa, R., Rallo, L., Gimenez, M., 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126, 64-71.

Belkacem, S., 2012. Phytoprotection de l'huile d'olive vierge (HOV) par ajout des plantes végétales (thym, ail, romarin). Université M'hamed Bougara de Boumerdès 8-36.

Belkheiri, N., 2010. Dérivés phénoliques à activités Antiathérogènes. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier 244.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry* 68, 457-462.

Bensemmane, A., 2009. Développons le secteur de l'Huile d'Olive en Algérie. *Filaha Innove*, 7-23.

Berset, C., 2006. Antioxydants phénoliques. Structure, propriétés, sources végétales. Les polyphénols en agroalimentaire 265.

Berthet, J., Amar-Costesec, A., 2006. Dictionnaire de biologie. De Boeck 1034.

Besnard, G., Bervillé, A., 2000. Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie* 323, 173-181.

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.) 7 : 35-45.

Borg, J., Reeber, A., Andrès, C., 2004. Biochimie métabolique: cours et QCM. Ellipses 240.

Boubekri, C., 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Université Mohamed Khider Biskra 160.

Bourgou, S., beji, R.S., Medini, F., Ksouri, R., 2016. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences* 28.

Bradshaw, M.P., Prenzler, P.D., Scollary, G.R., 2001. Ascorbic acid-induced browning of catechin in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 934-939.

Brand-williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci. Technol.* 28, 25–30.

Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc, Paris 1120.

Burda, S., Oleszek, W., Lee, C.Y., 1990. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 945-948.

C.O.I., 1998. Conseil oléicole international.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12, 564-582.

Cardoso, S.M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J.A., Renard, C.M., Coimbra, M.A., 2005. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 21-32.

Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., Musci, M., 2000. Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. *Journal of Chromatography A* 881, 449-460.

Catherine, A., Rice-Evans, Packer, L., 1997. Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker 545.

Chagnon, P., 2005. Les plans d'expériences (partie 2) Les modèles de régression. *Contrôles Essais Mesures* 11: 97-100.

Chan, S., Lee, C., Yap, C., Mustapha, W.A.W., Ho, C., 2009. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal* 16, 203-213.

Chin, Y.F., Salimon, J., Said, M., 2010. Optimisation of urea complexation by Box-Behnken design. *Sains Malaysiana* 39, 795-803.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y., 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology* 55, 217-225.

Chung, Y.-C., Chang, C.-T., Chao, W.-W., Lin, C.-F., Chou, S.-T., 2002. Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2454-2458.

Crisosto, C.H., Bremer, V., Ferguson, L., Crisosto, G.M., 2010. Evaluating quality attributes of four fresh fig (*Ficus carica* L.) cultivars harvested at two maturity stages. *HortScience* 45, 707-710.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., 2008. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. John Wiley & Sons.

Del Caro, A., Piga, A., Pinna, I., Fenu, P.M., Agabbio, M., 2004. Effect of drying conditions and storage period on polyphenolic content, antioxidant capacity, and ascorbic acid of prunes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4780-4784.

Dhaouadi, A., Adhoum, N., 2010. Heterogeneous catalytic wet peroxide oxidation of paraquat in the presence of modified activated carbon. *Applied Catalysis B: Environmental* 97, 227-235.

Dibert, K., Cros, E., Andrieu, J., 1989. Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *Journal of food engineering* 10, 199-214.

Dicko, M.H., Gruppen, H., Traoré, A.S., Voragen, A.G., van Berkel, W.J., 2006. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 1, 20-37.

El-Adawi, H., Abdel-Fattah, Y., El-Wahab, A.A., 2011. Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from 'milk thistle' seeds. *African Journal of Biotechnology* 10, 9804-9811.

Elbir, M., Amhoud, A., Mbarki, M., Visioli, F., 2014. Antioxidant activity of a crude preparation rich in phenolic compounds from the olive stones of two Moroccan cultivars, a preliminary study. *Current Topics in Nutraceuticals Research* 12, 9.

Enneb, H., Belkadhi, A., Cheour, F., et Ferchichi, A., 2015. Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*. 20(2): 788-93

Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga, C., 2003. Polyphenol extraction from foods. *Methods in polyphenol analysis* 1-16.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bourouai, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdely, C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* 331, 372-379.

Faostat, 2013. Statistical Databases (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Site web : <http://faostat.fao.org/>.

- Faucher, J., 2006.** Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Institut National Polytechnique de Toulouse 198.
- Gaboriaud, R., 1996.** Physico-chimie des solutions: cours et problèmes corrigés. Masson 208-228.
- Galvan D'Alessandro, L., 2013.** Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-produits. Lille 1. 28.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J., 2005.** Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1370-1373.
- Gómez-Caravaca, A., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2006.** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 41, 1220-1234.
- Goupy, J., 2006.** Introduction aux plans d'expériences- 5ème édition DUNOD.
- Goupy, J., Creighton, L., 2006.** Introduction aux plans d'expériences-3ème édition. Dunod 336.
- Granato, D., Branco, G.F., de Araújo Calado, V.M., 2010.** Withdrawn: Experimental design and application of response surface methodology for process modelling and optimization: A review. *Food Research International*.
- Green, P., Wickens, G., 1989.** The Olea europaea complex. The Davis and Hedge Festschrift: plant taxonomy, phytogeography and related subjects. Edinburgh, University Press.
- Gülçin, I., 2012.** Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 3:345-91
- Habauzit, V., Horcajada, M.-N., 2008.** Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochemistry Reviews* 7, 313-344.
- Hannachi, H., Elfalleh, W., Marzouk, S., 2013.** Oil, protein, antioxidants and free radical scavenging activity of stone from wild olive trees (*Olea europaea* L.). *Pak. J. Pharm. Sci* 26, 503-510.
- Harborne, J., 1989.** General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry* 1, 1-28.
- Harborne, J.B., 1990.** Constraints on the evolution of biochemical pathways. *Biological Journal of the Linnean Society* 39, 135-151.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., 2004.** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* 2, 3-6.
- Hopkins, W.G., 2003.** Physiologie végétale. De Boeck Supérieur 276.
- Jalili, A., Alipour, S., Sadegzadeh, A., 2011.** Antioxidant and antiradical activities of phenolic extracts from Juglans regia hulls and shells. *Int. Res. J. Plant Sci* 1, 282-289.
- Ju, Z.Y., Howard, L.R., 2003.** Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5207-5213.

Kennedy, J.A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E.J., Jones, G.P., 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5348-5355.

Kim, J.-M., Chang, S.-M., Kim, I.-H., Kim, Y.-E., Hwang, J.-H., Kim, K.-S., Kim, W.-S., 2007. Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from mulberry leaves. *Biochemical Engineering Journal* 37, 271-278.

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, 146-153.

Kühnau, J., 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World review of nutrition and dietetics*. Karger Publishers 117-191.

Kumaraswamy, M., Satish, S., 2008. Antioxidant and anti-lipoxygenase activity of *Thespesia lampas* Dalz & Gibs. *Advances in Biological Research* 2, 56-59.

Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A.G., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering* 71, 214-222.

Larrauri, J.A., Rupérez, P., Saura-Calixto, F., 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1390-1393.

Lee, B., Jung, J., Choi, Y., 2005. Optimization of microwave-assisted extraction process of *Rehmannia Radix preparata* by response surface methodology. *Food Engineering Progress* 9, 283-290.

Léger, C.L., 2006. Anti-oxydants d'origine alimentaire: diversité, modes d'action anti-oxydante, interactions. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 13, 59-69.

Leybros, J., Fremeaux, P., 1990. Extraction solide-liquide. I. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés* 2, J2780. 2781-J2780. 2721.

Lien, E.J., Ren, S., Bui, H.-H., Wang, R., 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free radical biology and medicine* 26, 285-294.

Lim, D.-H., Choi, D., Choi, O.-Y., Cho, K.-A., Kim, R., Choi, H.-S., Cho, H., 2011. Effect of *Astragalus sinicus* L. seed extract on antioxidant activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 17, 510-516.

Liu, Q., Yang, X., Zhang, L., Majetich, G., 2010. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Folium eucommiae* and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 2503-2511.

Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93, 47-56.

Łojkowska, E., Hołubowska, M., 1992. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Journal of Phytopathology* 136, 319-328.

Loussert, R., Brousse, G., 1978. L'olivier: techniques agricoles et productions méditerranéennes. Maisonneuve et Larose, Paris, 460.

Luthria, D.L., 2008. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry* 107, 745-752.

Maarouf, A., 2000. Dictionnaire botanique 129.

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques.

Macheix, J., Fleuriet, A., Sarni-Manchado, P., 2006. Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 390-399.

Mafart, P., Béliard, E., 1992. Food industry engineering. Volume II. Separation techniques. Technique et documentation-Lavoisier.

Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., Manian, S., 2008. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry* 107, 1000-1007.

Mata, A., Proença, C., Ferreira, A., Serralheiro, M., Nogueira, J., Araújo, M., 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* 103, 778-786.

Mendil, M., 2009. L'oléiculture: Experiences algériennes. *Filaha Innove* 4, 6, 23.

Mendil, M., Sebai, A., 2006. Catalogue des Variété Algériennes de l'Olivier. Ministère de l'agriculture et du développement rural, ITAF Alger, Algeria 98.

Michiels, J.A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommès, J., 2012. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry* 130, 986-993.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews* 52, 673-751.

Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry* 60, 331-337.

Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A., 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters* 384, 240-242.

Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., Surbled, M., 1998. Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle. *COLLOQUES-INRA*, 31-44.

Naczki, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 41, 1523-1542.

Nadour, M., 2015. Extraction, caractérisation des polysaccharides et des polyphénols issue des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides a visée alimentaire. Université Mouloud Mammeri de TiziOuzou.

Nefzaoui, A., 1984. Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Étude FAO production et santé animales 43.

Nefzaoui, A., 1985. Valorisation des résidus lignocellulosiques dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis. Application aux grignons d'olive. PhD thesis, Université Catholique de Louvain-la-Neuve.

Niaounakis, M., Halvadakis, C.P., 2006. Olive processing waste management: literature review and patent survey, vol. 5, 2nd ed. Elsevier.

Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur, P., 1995. Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'olivier (*Olea europaea* L.) 15, 31-37.

Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N., 2008. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. Food Chemistry 110, 571-583.

Penchev, P., Angelov, G., Condoret, J.-S., 2010. Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). Revue de génie industriel 5, 115-123.

Pietta, P.-G., 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products 63, 1035-1042.

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M.J., 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 2111-2117.

Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fonzo, V., 2006. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 434-440.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine 26, 1231-1237.

Ribeiro, S., Barbosa, L., Queiroz, J., Knödler, M., Schieber, A., 2008. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. Food Chemistry 110, 620-626.

Ribéreau-Gayon, P., Gautheret, R.J., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod Paris 254.

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in plant science 2, 152-159.

Rice-Evans, Catherine.A., Packer, L., 2003. Flavonoids in health and disease. CRC Press 545.

Robards, K., 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. Journal of Chromatography A 1000, 657-691.

Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66, 401-436.

Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolanos, J., 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology* 99, 5261-5269.

Roginsky, V., Lissi, E.A., 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92, 235-254.

Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., Gonzalez-Paramas, A.M., 2012. Extraction and isolation of phenolic compounds. *Natural products isolation*, 427-464.

Savova, M., Kulusheva, T., Stourza, A., Seikova, I., 2007. The use of group contribution method for predicting the solubility of seed polyphenols of *Vitis vinifera* L. within a wide polarity range in solvent mixtures. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 42, 295-300.

Schauenberg, P., Paris, F., 2005. Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes.

Silva, E., Rogez, H., Larondelle, Y., 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 55, 381-387.

Sousa, A., Ferreira, I.C., Calhella, R., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., 2006. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'. *Bioorganic & medicinal chemistry* 14, 8533-8538.

Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering* 81, 200-208.

Stanisavljević, I., Stojičević, S., Veličković, D., Veljković, V., Lazić, M., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of *Echinacea* (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 17, 478-483.

Tao, L., Lambert, J., 2014. Polyphenols in Human Health and Disease. Antioxidant and Pro-Oxidant Activities of Green Tea Polyphenols in Cancer Prevention 1, 1191-1198.

Telli, A., Mahboub, N., Boudjeh, S., Siboukeur, O., Moulti-Mati, F., 2010. Optimisation des conditions d'extraction des polyphenols de Dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L) Variété GHARS. *Annales des Sciences et Technologie* 2, 107-114.

Tinsson, W., 2010. Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques. Springer Science & Business Media 532.

Uma, D., Ho, C., Wan Aida, W., 2010. Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana* 39, 119-128.

Virginie, G., Espérance, M.S., Guévara, N., Reine, B.-A.G., Pascal, A.D., Dominique, S.C., 2015. study and evaluation of granulometry influence on the natural polyphenols kinetic extraction from *Pterocarpus erinaceus* acclimated in Benin]. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 12, 325.

Yang, X.-m., Yu, W., Ou, Z.-p., Liu, W.-m., Ji, X.-l., 2009. Antioxidant and immunity activity of water extract and crude polysaccharide from *Ficus carica* L. fruit. *Plant Foods for Human Nutrition* 64, 167-173.

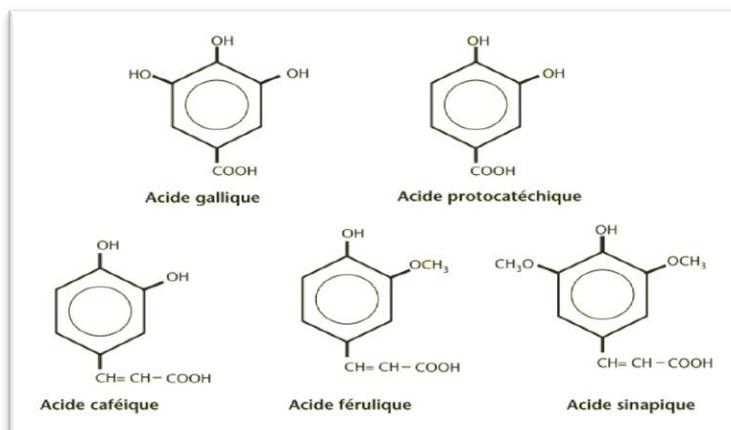
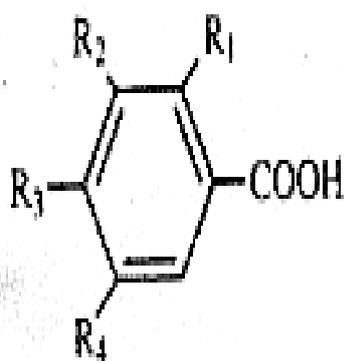
Yap, C., Ho, C., Aida, W.W., Chan, S., Lee, C., Leong, Y., 2009. Optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola* L.) residues. *Sains Malaysiana* 38, 511-520.

Zaidi, F., Hassissene, N., Allouache, H., Kichou, M., Ourdani, S., Rezki, K., Belal, M., Grongnet, J., Youyou, A., 2009. Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *Revue de Médecine Vétérinaire* 160, 67.

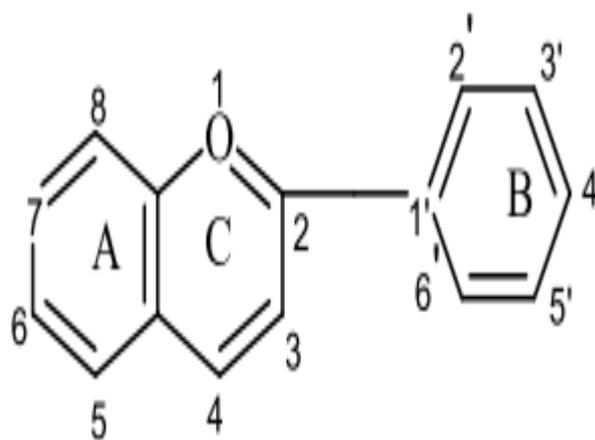
Zhang, Z.-S., Li, D., Wang, L.-J., Ozkan, N., Chen, X.D., Mao, Z.-H., Yang, H.-Z., 2007. Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology* 57, 17-24.

Zohary, D., Spiegel-Roy, P., 1975. Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science* 187, 319-327.

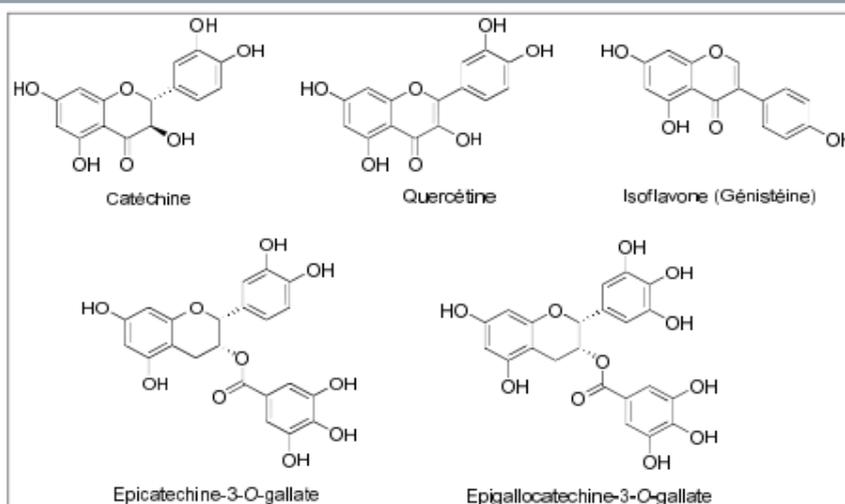
Annexes



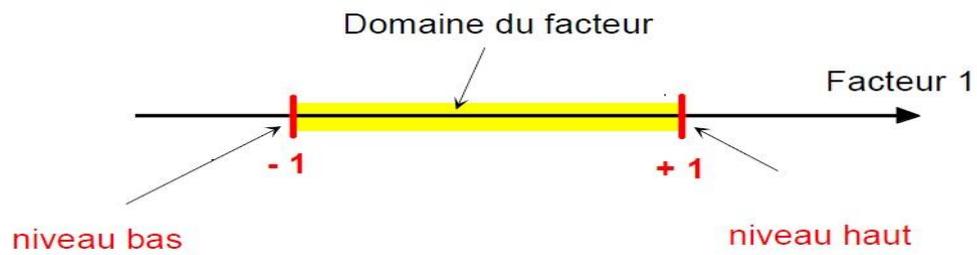
Annexe N°1 : Structure de base de quelques acides phénoliques (Léger, 2006).



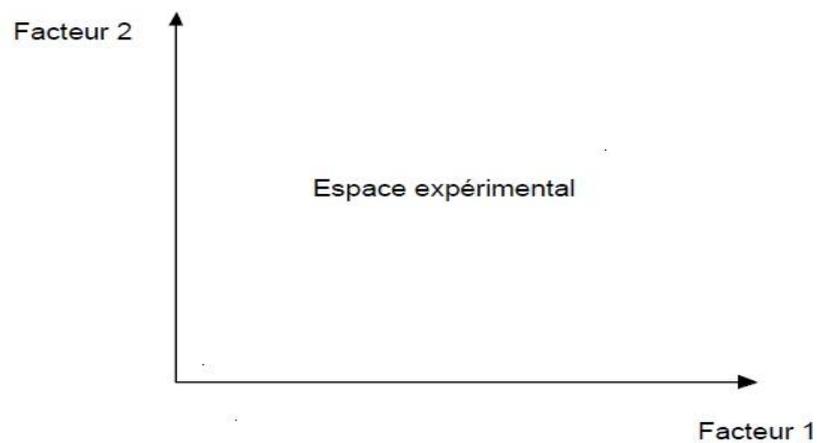
Annexe N°2 : Structure de base des flavonoïdes (Léger, 2006).



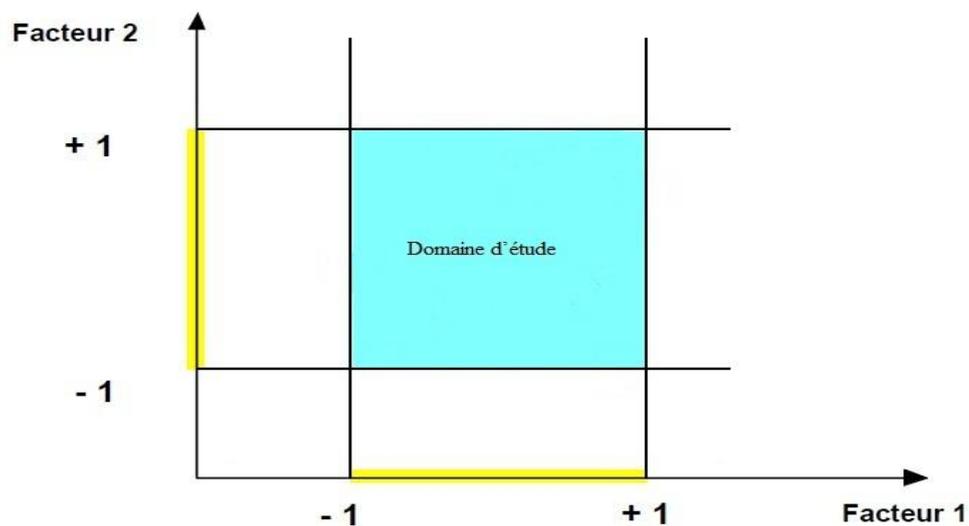
Annexe N°3 : Structure de quelques flavonoïdes (Belkheiri, 2010).



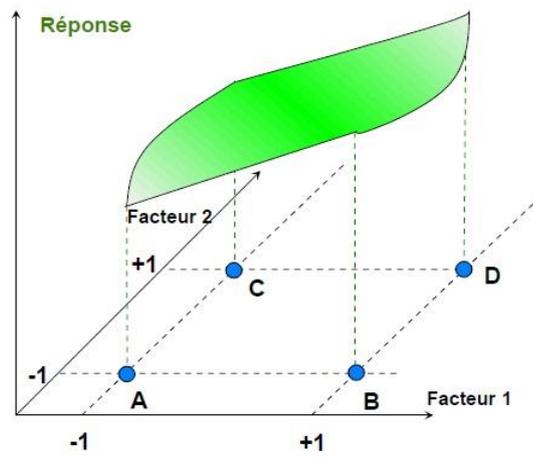
Annexe N°4 : Domaine du facteur et les niveaux haut et bas (Goupy, 2006).



Annexe N°5 : Espace expérimentale (Goupy, 2006).



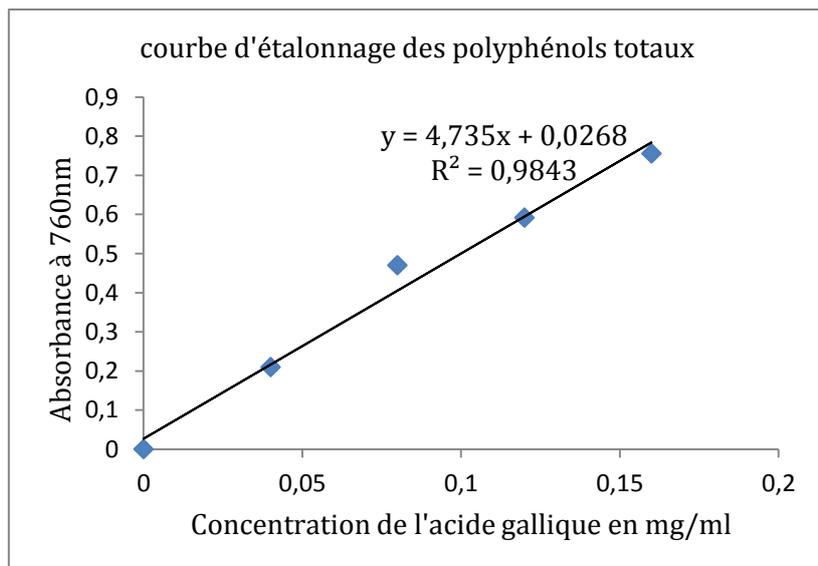
Annexe N°6: Domaine d'étude défini par la réunion des domaines des différents facteurs (Goupy, 2006).



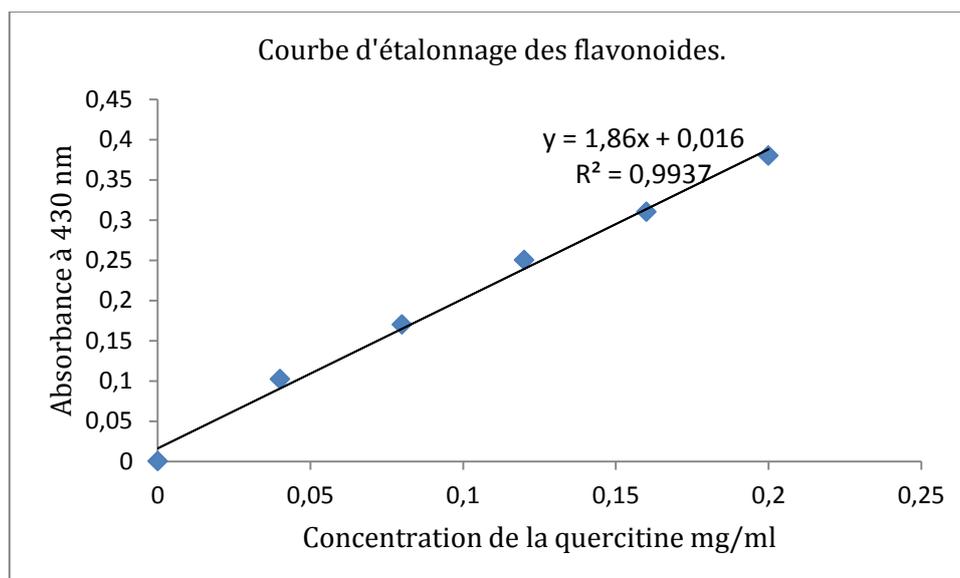
Annexe N°7 : Surface de réponse (Goupy, 2006).

Essai N°	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4
1	-1	0	+1	0
2	0	+1	+1	0
3	0	+1	0	+1
4	-1	-1	0	0
5	0	0	+1	-1
6	+1	0	+1	0
7	+1	0	0	-1
8	+1	+1	0	0
9	0	0	-1	+1
10	+1	-1	0	0
11	0	-1	0	-1
12	-1	0	0	-1
13	0	0	0	0
14	-1	0	0	+1
15	0	0	-1	-1
16	0	0	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	+1	-1	0
19	-1	0	-1	0
20	-1	+1	0	0
21	0	-1	-1	0
22	0	-1	+1	0
23	+1	0	0	+1
24	0	+1	0	-1
25	0	0	0	0
26	0	-1	0	+1
27	+1	0	-1	0

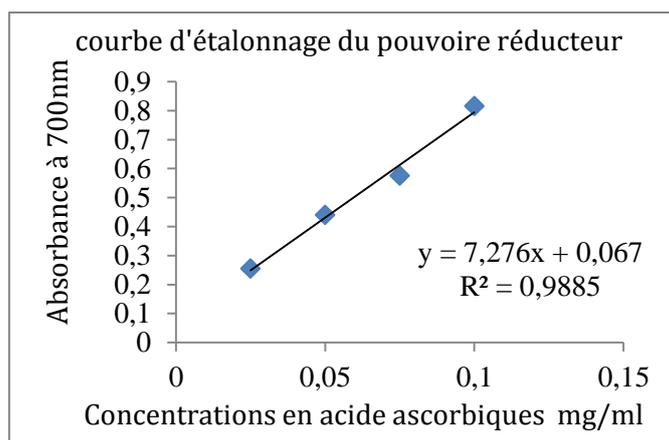
Annexe N°8 : Tableau récapitulatif des expériences du plan box behnken pour 4 facteurs (Goupy, 2006).



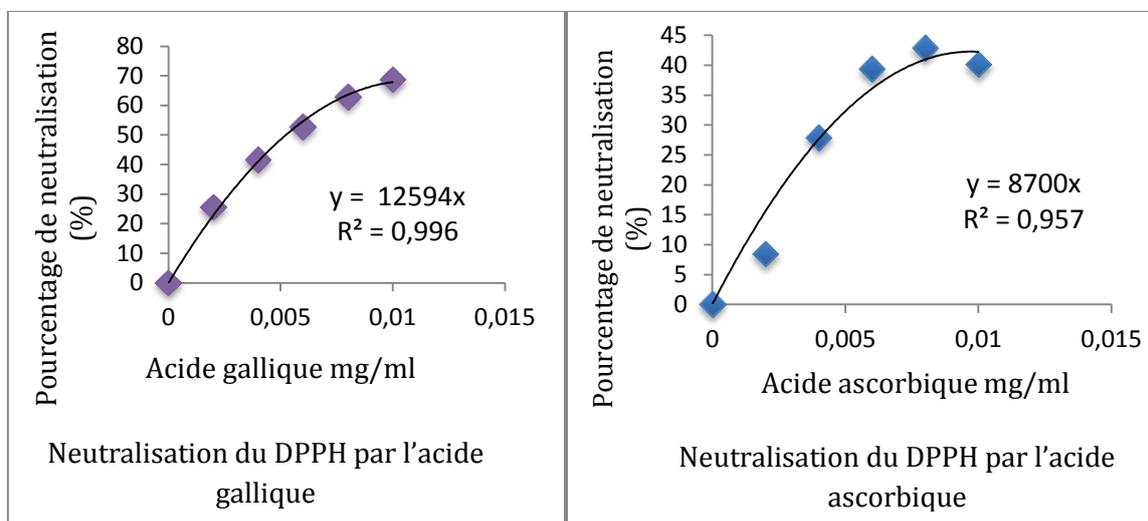
Annexe N°9 : courbe d'étalonnage des polyphénols totaux



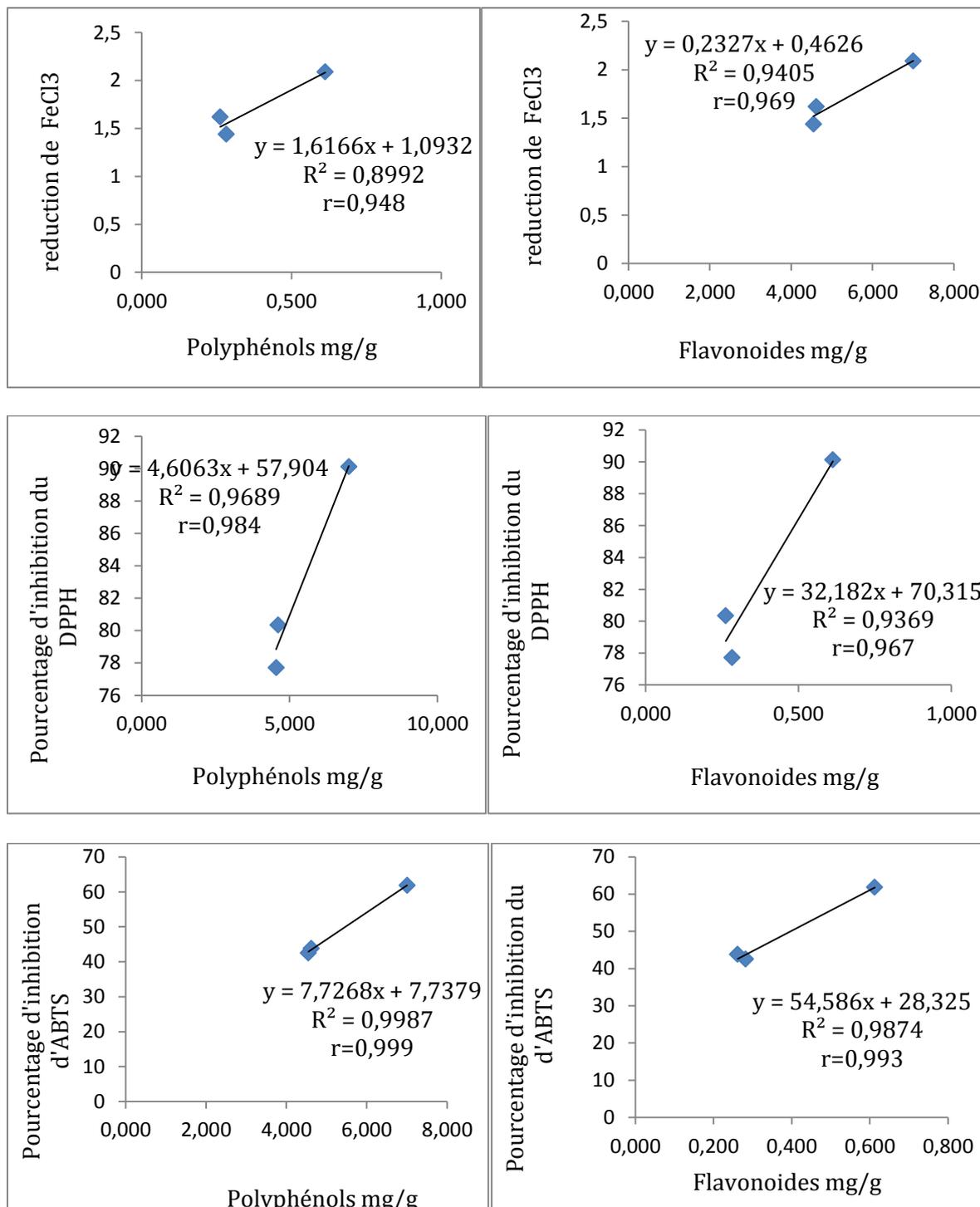
Annexe N°10 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes



Annexe N°11 : Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur



Annexe N°12 : Courbes d'étalonnages utilisés pour étudier l'activité anti-radicalaire



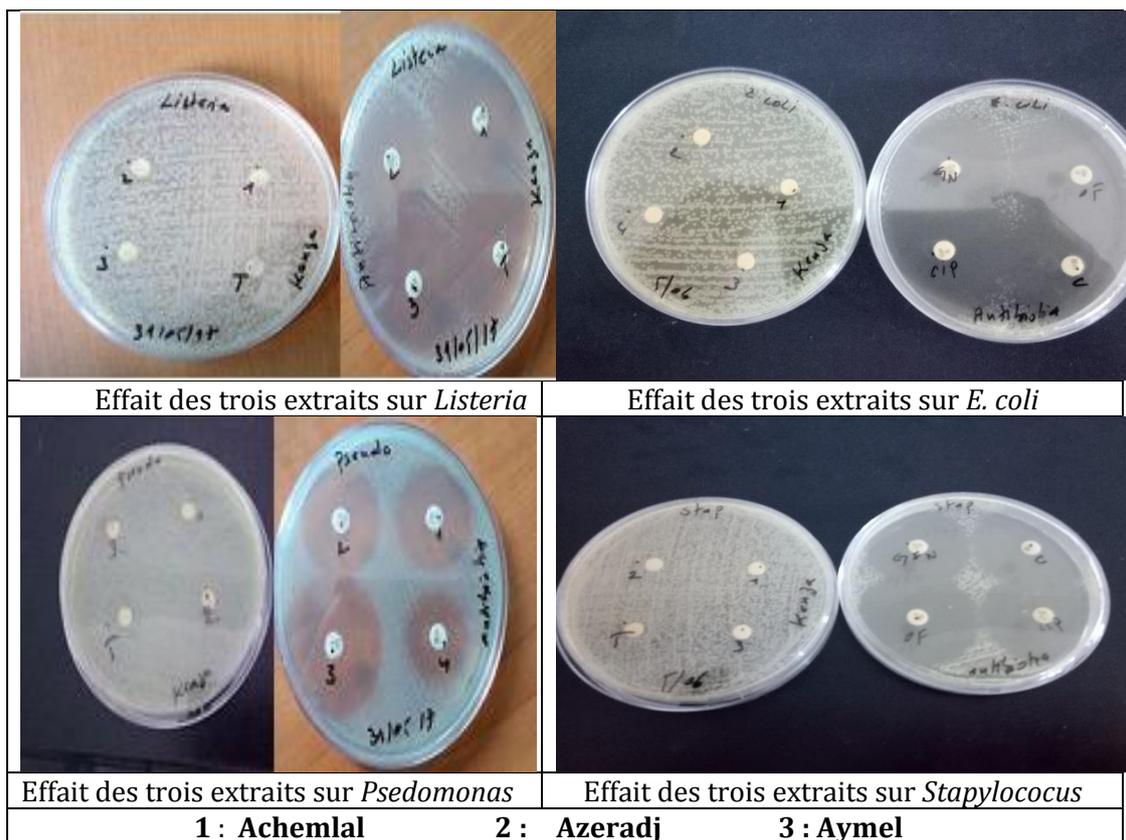
Annexe N°13 : Courbes de corrélation des antioxydants avec les activités antioxydantes

Nom du produit	Marque	Pays de fabricant
Acide gallique monohydrate	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
Acide quercétine	Riedel-de Haën	Germany
Méthanol	GPR RECTAPUR	France
Ethanol	SIGMA-ALDRICH	Germany
Acétone	SIGMA-ALDRICH	Germany
Folin-Ciocalteu 1/10	BIOCHEM Chemopharma	France
Carbonate de sodium decahydrique à 7,7 %	SIGMA-ALDRICH	Germany
Chlorure d'aluminium à 2%	BIOCHEM Chemopharma	USA
ferricyanure de potassium (1%)	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
Acide trichloroacétique (10%).	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
Chlorure de fer	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
di-hydrogénophosphate de potassium à M/15	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
di-sodium hydrogénophosphate	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
acide sulfurique 0,6 M	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
phosphate de sodium 28 mM	BIOCHEM Chemopharma	Quebec
molybdate d'ammonium 4 mM	SIGMA-ALDRICH	Germany
DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)	SIGMA-ALDRICH	Germany
Persulfate de potassium 2,45 mM	SIGMA-ALDRICH	Germany

Annexe N°14 : Solvant et réactifs utilisés au cours du travail.

Matériel	Appareils
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bêchers ✓ Burette graduée ✓ Cuve en quartz ✓ Epprouvettes graduées ✓ Pipettes graduée ✓ Tubes à essais ✓ Erlenmeyer ✓ Entonnors ✓ Fioles 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bain-marie (MEMMERT) ✓ Balance de précision (SARTORIUS) ✓ Micropipettes ✓ Plaque magnétique agitatrice (VELP SCIENTIFICA) ✓ Réfrigérateur (SAMSUNG) ✓ Spectrophotomètre (RAYLEIGH) ✓ Vortex (VELP SCIENTIFICA) ✓ Etuve ventilée (MEMMERT) ✓ Tamiseur électrique (RETSCH)

Annexe N°15 : Matériel et appareil utilisé au cours du travail.



Annexe N°16 : Résultats des tests antibactériens des extraits de poudre de noyaux d'olive

Préparation du milieu de culture Muller-Hinton	Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boites de Pétri
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 1,182mg de DPPH dans 50ml d'éthanol
Préparation de la solution d'ABTS	Dissoudre 1,182mg d'ABTS dans 50ml De méthanol.

Annexe N°17 : Préparation de quelques solutions

Résumé

La présente étude est portée sur l'optimisation de l'extraction des antioxydants des composés phénoliques des extraits des poudres de noyaux d'*Olea europea* L. En utilisant la méthode de surface de réponse développée par le plan BBD. Les conditions expérimentales optimales permettant une maximisation de l'extraction des polyphénols du noyau d'olive sont : le solvant (éthanol) à une concentration de 33% (v/v) pour un temps de 24minute à température de 71°C.

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 trois variétés de noyaux d'olives (**Achemlal**, **Azeradj** et **Aymel**). Dont les résultats obtenus indiquent des teneurs en PPT de 7,003; 4,67 et 4,54mg EAG/g de MS et de 0,22; 0,28 et 0,61mg EQ/g de MS pour les flavonoïdes, respectivement, avec une différence significative à $P \leq 0,05$. Une teneur de 1,44; 0,62 et 2,09mg EAA/g de MS Pour le pouvoir réducteur. En dernier les pourcentages d'inhibition Sont de l'ordre de 77,7%; 80,34% et 90,13% pour le DPPH et de 42,49%; 43,8% et 61,84% pour l'ABTS^{·+} respectivement.

L'activité antibactérienne des trois variétés de noyaux d'olives étudiées, à été réalisé sur des souches bactériennes de références (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

Mots clés : activité antioxydante, extraction, optimisation, noyau d'olive, polyphénols, box behnken.

Abstract

The present study focuses on the optimization of extraction of antioxidants by the determination of the phenolic compounds of the extracts of the powders of *Olea europea* stone using the response surface method developed by the BBD plan.

The optimal experimental conditions for maximizing the extraction of polyphenols from the olive stone are: the solvent (ethanol) at a concentration of 33% (v / v) for a time of 24 minutes at a temperature of 71 ° C.

A quantification of total polyphenols (PPT) and flavonoids as well as the evaluation of the antioxidant activity (anti-radical and reducing power) carried out on three varieties of olives (**Achemlal**, **Azeradj** and **Aymel**). The results obtained indicate a PPT content of 7,003; 4,67 and 4,54 mg EAG / g DM and 0,22; 0,28 and 0,61mg EQ / g DM for flavonoids, with a significant difference at $P \leq 0.05$ between these varieties. A content of 1,44; 0,62 and 2,09mg EAA / g DM for reducing power. At latter, the inhibition percentages were of the order of 77,7%; 80,34% and 90,13% for the DPPH and 42,49%; 43,8% and 61,84% for the ABTS^{·+} respectively.

The antibacterial activity of the three varieties of olive stones studied, were carried out on bacterial strains of references (*Listeria*, *Staphylococcus*, *E.coli* and *Pseudomonas*).

Key words: antioxidant activity, extraction, optimization, olive stone, polyphenols, box behnken.