

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Béjaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-chimique

## Mémoire de Fin de Cycle

En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master en Biologie option Biochimie appliquée

### Thème

**Extraction, dosage et séparation par CCM des composés phénoliques des feuilles d'*Olea Europaea* des variétés « Chemlal et Aymel », et purification d'oleuropeine.**

Proposé par :

M<sup>elle</sup> BENYAHIA Amel

Membres du jury :

Président : Mr Hammoum H.  
Promoteur : M<sup>me</sup> ZAIDI R.  
Examinatrice : Melle Ouanas S.

Année : 2009-2010

# Remerciements

*Mes remerciements vont vers :*

*Le président, Mr Hammoum qui a accepté de présider ce jury.*

*Ma promotrice, Mme Zaidi qui par sa bonne humeur m'a épaulé et a toujours été présente à mes sollicitations.*

*L'examinatrice, Melle Ouanas qui a accepté d'examiner et d'évaluer mon travail.*

*A Mr Zaidi, Melle Meziani et Melle Amari qui m'ont aidé à élaborer ce travail.*

*Ainsi que toute personne ayant participé de près ou de loin à ce travail.*

# Dédicace

*Je dédie ce travail à mes très chers parents pour toute l'affection qu'ils m'ont donnée et leur soutien moral.*

- ✓ *A ma grand-mère*
- ✓ *A mes frères et sœurs*
- ✓ *A mes deux petits neveux*
- ✓ *Mes oncles et tantes*
- ✓ *Mes cousins et cousines*
- ✓ *Tous mes amis et tous ceux qui me sont chers.*

*Amel*

## Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

### Partis bibliographique

<b>Chapitre I : Généralités sur l'olivier.....</b>	<b>3</b>
--	----------

I.1.L'olivier.....	3
--------------------	---

I.2.Situation botanique .....	3
-------------------------------	---

I.3. Les sous espèces <i>d'Olea europaea</i> .....	4
--	---

<b>Chapitre II : Les composés phénoliques.....</b>	<b>5</b>
--	----------

II.1. Définition .....	5
------------------------	---

II.2. La biosynthèse des composés phénoliques.....	5
--	---

II.3. Localisation au niveau cellulaire et tissulaire.....	6
--	---

II.4. Classification des composés phénoliques .....	6
---	---

II.5. Intérêt des composés phénoliques .....	10
--	----

II.6. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier .....	11
---	----

II.7.L'activité antimicrobienne des feuilles d'olivier.....	12
---	----

<b>Chapitre III : Les méthodes d'extraction et dosage des composés phénoliques.....</b>	<b>14</b>
---	-----------

III.1. Extraction des composés phénoliques.....	14
---	----

III.2.Les facteurs influençant l'extraction des composés phénoliques.....	14
---	----

III.2.1. La conservation.....	15
-------------------------------	----

III.2.2. Choix du solvant d'extraction.....	15
---	----

III.2.3. Temps d'extraction.....	16
----------------------------------	----

III.2.4. Nombre d'étapes d'extraction.....	16
--	----

III.2.5. La température.....	16
------------------------------	----

III.2.6. Le pH.....	16
---------------------	----

III.3. La chromatographie sur couche mince .....	17
--	----

III.3.1. Le choix de l'éluant (la phase mobile) .....	17
III.3.2. Les réactifs chimiques utilisés pour la révélation.....	19
III.3.3. Avancés de la chromatographie .....	21

### **Partis pratique**

<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>22</b>
1. Matériel végétal.....	22
1.1. Origine de l'échantillon.....	22
1.2. Préparation du matériel végétal.....	22
1.2.1. Séchage.....	22
1.2.2. Broyage.....	22
1.2.3. Tamisage.....	22
2. Extraction des composés phénoliques .....	23
3. Dosage des composés phénoliques.....	24
3.1. Dosage des phénols totaux.....	24
3.2. Dosage des flavonols.....	24
3.3. Dosage des esters tartriques.....	24
4. Séparation et mise en évidence par CCM.....	25
4.1. Systèmes d'élution.....	25
4.2. Préparation de la plaque.....	25
4.3. Dépôt de l'échantillon.....	25
4.4. Développement de la plaque.....	26
4.5. Détection des taches .....	26
4.6. Révélation.....	26

**Résultats et discussions**

<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>27</b>
1. Résultats.....	27
1.1. Résultats du dosage.....	27
1.2. Résultats de la CCM.....	30
2. Discussion.....	32
3. Purification du composé majoritaire « l'oleuropeine ».....	35
<b>Conclusion.....</b>	<b>37</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>38</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>51</b>

Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure de l'oleuropeine.....	11
<b>Figure 2</b> : Poudre de feuilles d'olivier des variétés « Chemlal » et « Aymel » .....	22
<b>Figure 3</b> : Protocole d'extraction des composés phénoliques.....	23
<b>Figure 4</b> : Développement de la plaque CCM.....	26
<b>Figure 5</b> : Teneurs en phénols totaux (en pourcentage d'échantillon).....	27
<b>Figure 6</b> : Teneurs en flavonols (en pourcentage d'échantillon).....	28
<b>Figure 7</b> : Teneurs en esters tartriques (en pourcentage d'échantillon).....	29
<b>Figure 8</b> : CCM des extraits (dépôt de 20 $\mu$ l).....	30
<b>Figure 9</b> : CCM des extraits Système 1.....	30
<b>Figure 10</b> : CCM des extraits Système 2.....	31
<b>Figure 11</b> : Profil chromatographique des deux systèmes d'élutions.....	34
<b>Figure 12</b> : Purification d'Oleuropeine.....	35
<b>Figure13</b> : CCM de l'oleuropeine pure.....	36

Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Classification réorgée de l'espèce <i>Olea europaea</i> .....	3
<b>Tableau II:</b> Classification des composés phénoliques .....	7
<b>Tableau III :</b> Composés phénoliques les plus importants et groupes de substances correspondantes.....	9
<b>Tableau IV :</b> Les principaux solvants par caractère polaire croissant .....	18
<b>Tableau V :</b> La polarité relative des principales familles de molécules organiques.	18
<b>Tableau VI:</b> Réactifs chimiques pour la révélation des plaques CCM.....	20
<b>Tableau VII :</b> Teneurs en phénols totaux des deux variétés de feuilles d'olivier....	27
<b>Tableau VIII :</b> Teneurs en flavonols des deux variétés de feuilles d'olivier.....	28
<b>Tableau IX :</b> Teneurs en esters tartriques des deux variétés de feuilles d'olivier.....	29

**Liste des abréviations :**

**CCM** : La Chromatographie sur Couche Mince.

**E1** : Essai1.

**E2** : Essai2.

**E3** : Essai3.

**FOA** : Feuilles d'olivier de variété « Aymel ».

**FOC** : Feuilles d'olivier de variété « Chemlal ».

**GC-MS** : La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.

**HPLC** : La Chromatographie Liquide à Haute Performance.

**LC-MC** : Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse.

**Le pH** : Le potentiel d'Hydrogène.

**NST** : Naturstoff.

**PEG** : Polyéthylenglycol.

**Rf** : Le front de migration.

**Subsp** : Sous-espèce.

**UV** : Ultra-violet.

## **Introduction :**

L'olivier (*Olea europaea*) est l'un des arbres fruitiers les plus importants dans les pays méditerranéens, il recouvre ainsi environ 8 millions d'ha ce qui représente environ 98% de la récolte du monde, d'où sa grande importance sociale et économique, il est aussi cultivé dans les régions d'Europe du sud, et dans beaucoup de régions du monde où les conditions climatiques sont aussi favorables que celles régnant dans les pays méditerranéens. L'importance de l'olivier est telle qu'il arrive au 24<sup>ème</sup> rang des 35 espèces les plus répandues dans le monde (**Breton et al., 2006**).

Ce fut en 1854, après avoir été utilisé comme traitement contre la fièvre du paludisme que les chercheurs s'intéressèrent aux feuilles d'olivier (**Lee-Huang et al., 2003**); en effet, ces feuilles contiennent de nombreux composés phénoliques qui exercent des activités intéressantes d'où leur utilisation en phytothérapie. Les substances physiologiques principales des feuilles d'olivier sont : l'hydroxytyrosol, tyrosol, acide caféique, acide p-coumarique, acide vanillique, vanilline, oleuropeine, lutéoline, diosmetin, rutine, verbascoside, luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside, et diosmetin-7-glucoside (**Bastoni, 2001; Tasioula-Margari et Ologeri, 2001**).

Les travaux menés sur les feuilles d'oliviers ont montré que ces dernières sont dotées de propriétés biologiques importantes, une activité antioxydant (**Somova et al., 2003; Skerget et al., 2005 ; Lee et al., 2009**), antimicrobienne (**Bisignano et al., 1999 ; Yahiaoui-Zaidi et al., 2008**) et sont aussi considérés comme étant un produit hypotensif (**Khayyal et al., 2002**).

Les travaux menés précédemment ont montré que les extraits bruts de feuilles d'oliviers présentent une activité anti-*Pectobacterium*. L'objectif de cette étude était de fractionner les différents constituants et de purifier le composé majoritaire.

Nous détailleront dans la partie expérimentale :

- ❖ L'extraction des composés phénoliques des feuilles d'olivier.
- ❖ Dosage de quelques composés phénoliques des feuilles d'olivier.
- ❖ Séparation par CCM des composés phénoliques des feuilles d'olivier.
- ❖ Et enfin, purification de l'oleuropeine, composé majeur des feuilles d'olivier.

## **Chapitre I : Généralités sur l'olivier :**

### **I.1.L'olivier :**

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen, de 6 à 8 m de hauteur, à tronc tortueux et à écorce grisâtre, crevassée. Les feuilles, blanc argenté à la face inférieure, vert grisâtre à la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces, lancéolées et ont 7.5 cm de long (**Ross et al., 2005**). Les fleurs, petites et blanches, à quatre pétales, sont réunies en grandes grappes dressées. Les fruits, olive, sont des drupes ovoïdes, vertes puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme (**Ghedira, 2008**).

### **I.2. Situation botanique (Ghedira, 2008) :**

La classification de l'espèce *Olea europaea* est présentée dans le tableau I.

<b>Règne</b>	<b>Plante</b>
<b>Embranchement</b>	Magnoliophita
<b>Sous embranchement</b>	Magnoliophytina
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous-classe</b>	Dialyptales
<b>Ordre</b>	Lumiales
<b>Famille</b>	Oleaceae
<b>Genre</b>	<i>Olea</i>
<b>Espèce</b>	<i>Olea europaea</i> L

---

**Tableau I :** Classification récoregée de l'espèce *Olea europaea*.

### I.3. Les sous espèces d'*Olea europaea* :

L'olivier méditerranéen, *Olea europaea* L a longtemps été subdivisé en deux variétés, *variété europaea* pour l'olivier domestique, et la *variété sylvestris* pour l'oléastre (olivier sauvage). Cette subdivision est cependant discutable, divers travaux ayant montré l'absence de frontière entre les populations sauvages et les formes cultivées, aussi bien sur le plan génotypique que phénotypique (**Breton et al., 2006**), (**long et al., 2010**).

Il existe cinq autres sous-espèces d'*Olea europaea* (**Green et al., 2002**):

- ❖ *Olea europaea subsp. cerasiformis* (Madère; sous-espèce tétraploïde).
- ❖ *Olea europaea subsp. cuspidata* (Afrique du Sud jusqu'au Sud de l'Égypte, et du Sud de l'Arabie jusqu'en Chine).
- ❖ *Olea europaea subsp. guanchica* (Canaries).
- ❖ *Olea europaea subsp. laperrinei* (Massifs montagneux du Sahara : Hoggar (Algérie), Aïr (Niger), et Jebel Marra (Soudan)).
- ❖ *Olea europaea subsp. maroccana* (Haut Atlas (Maroc); sous-espèce hexaploïde).

## Chapitre II : Les composés phénoliques :

### II .1. Définition :

Avec environ 9000 structures naturelles élucidées à ce jour, les polyphénols constituent une famille importante de métabolites secondaires de faible poids moléculaire du règne végétal (**Akowauh et al, 2004**), c'est un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes. Les composés phénoliques sont caractéristique des végétaux (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Qu'est ce que les composés phénoliques ? Ce sont des composés qui ont un ou plusieurs groupes d'hydroxyles attachés directement à un cycle aromatique. Le phénol est une structure sur laquelle le groupe entier est basé, le cycle aromatique est représenté par le benzène (**Vermerris et Nicholson, 2006**). Les polyphénols sont habituellement trouvés sous forme d'esters ou glycosides plutôt qu'en forme libre (**Vermerris et Nicholson, 2006**). Il est généralement admis que les humains ingèrent environ 1 gramme de polyphénols par jour (**Akowah et al., 2004**).

### II. 2. La biosynthèse des composés phénoliques :

En tenant compte de ce qu'a été rapporté par (**Bruneton ,1999**), les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

- ❖ La voie la plus courante, est celle qui, via l'acide shikimique, conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques acétophénones, lignanes et lignines, coumarine, etc.
- ❖ L'autre voie part de l'acétate et conduit à des  $\beta$ -cétoestérs de longueur variable « les polyacétates » qui engendrent par cyclisation, des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, orcinols, depsidones xanthines, quinones, etc.

### **II .3. Localisation au niveau cellulaire et tissulaire:**

Les composés phénoliques s'accumulent principalement dans deux sites, d'une part, la paroi cellulaire où sont présentes les lignines, et d'autre part, dans la vacuole. Des flavonoïdes pourraient également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique mais toujours à très faible concentration. A l'échelle tissulaire, on observe également des repartitions très inégales des différents composés phénoliques. Ainsi les anthocyanes et les pigments de type flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux en particulier les épidermes de fruits et des feuilles (**Sarni et Cheynier, 2006**).

### **II .4. Classification des composés phénoliques :**

Les composés phénoliques vont de molécules simples, comme les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tanins (**Salunkhe, 1990**). Ces composés peuvent être classifiés de différentes manières.

Une classification à été établie par (**Swain et Bate-Smith, 1962**). Ils ont regroupé les composés phénoliques en « les communs » et « les moins communs ».

**Harborne et Simmonds (1964)** ont classé ces composés dans des groupes basés sur le nombre de carbones dans la molécule (Tableau II).

<b>Structure</b>	<b>Classe</b>
C6	Phénols simples
C6-C1	Acides phénoliques
C6-C2	Acides phénylacétiques et les acétophénones
C6-C3	Acides, aldéhyde et alcool cinnamiques
C6-C3	Coumarines iso coumarines et chromones
C15	Chalcone, aurones dihydrochalcones
C15	Flavanes
C15	Flavones
C15	Flavonones
C15	Flavononols
C15	Anthocyanidines
C15	Anthocyanines
C30	Biflavonyles
C6-C2-C6 ; C6-C2-C6	Benzophenones, xanthones, stilbenes
C6-C10 ; C14	Quinones
C18	Betacyanines
Lignane ; Neolignane	Dimères et oligomères
Lignine	Polymères
Tannins	Oligomères ou polymères
phlobaphènes	Polymères

---

**Tableau II:** Classification des composés phénoliques (**Harborne et Simmonds, 1964**).

En se basant sur la structure moléculaire et le nombre d'atome de carbone **Ribereau-Gayon (1968)**, en distingue quatre groupes :

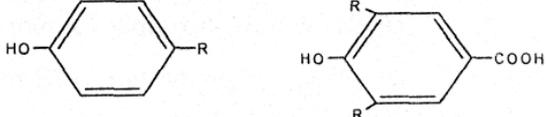
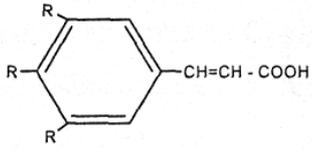
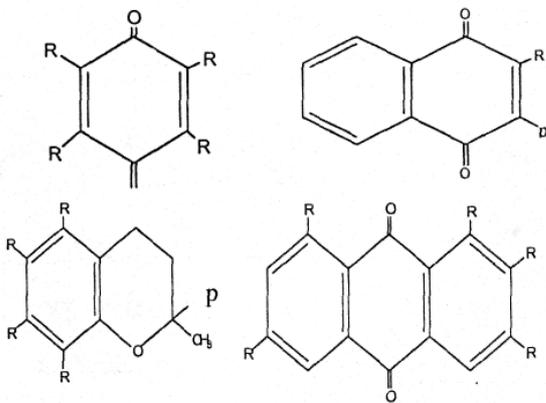
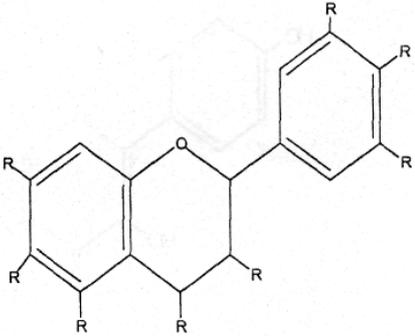
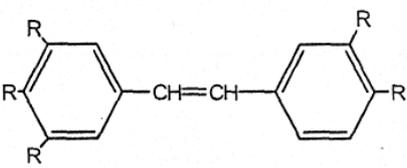
- ❖ Acides benzoïques, acides cinnamiques et coumarines.
- ❖ Flavones, flavanols et derives.
- ❖ Chalcones, dehydrochalcones et aurones.
- ❖ Anthocyanes.

**Delaveau (1988)**, a regroupé les polyphénols en cinq catégories :

- ❖ Acides phenols.
- ❖ Flavonoïdes.
- ❖ Anthocyanes
- ❖ Tannins.

**Richter (1993)**, a établi la classification indiquée dans le tableau III :

## Chapitre II : Les composés phénoliques

Groupe de substances	Formule générale	Caractéristiques structurales
Phénols simple		Structure en $c_6 c_2$ , $c_6 c_1$ ou $c_6$ à la suite de la dégradation de la chaîne latérale.
Acides phénolcarboxylique		Structure en $c_6 c_3$ , unique ou répétée.
Autres phénols substitués y compris polyphényl-quinones anthra-quinones.		Structure en $c_6 c_2$ , $c_6 c_1$ ou $c_6$ , des unités isoprène complètent la structure.
Flavonides		Structure en $c_6 c_3 c_6$ , chaînes latérales rallongées par des unités additionnelles en $c_2$ .
Stilbènes		Structure en $c_6 c_2 c_6$ , un carbone latérale est associé au second au second cycle en $c_6$ .

**Tableau III** : Les composés phénoliques les plus importants et groupes de substances correspondantes (Richter, 1993).

## II. 5. Intérêt des composés phénoliques :

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir:

- ❖ dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites, etc.).
- ❖ dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature, soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux.
- ❖ dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles, etc.) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules, etc.) et des produits qui en dérivent par transformation.
- ❖ dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées, etc.) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini.
- ❖ dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Jean-Jacques Macheix et al., 2005**).

## II. 6. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier :

Les constituants chimiques des feuilles d'olivier sont principalement des substances secondaires, parmi lesquelles : les Flavonoïdes (lutéoline, quercétine...), les secoiridoïdes (oleuropeine, ligstroside...), les acides phénols tel que l'acide caféique, acide coumarique et chlorogénique (Ryan et al., 2002 ; Khan et al., 2007).

L'oleuropeine est le principal composé phénolique des feuilles d'olivier (Ryan et al., 2002) ainsi que d'autres composés étroitement liés tels que le 10-hydroxyoleuropeine, le ligstroside et le 10-hydroxyligstroside, tous ces composés sont des esters de tyrosol d'acide élénolique qui sont encore hydroxylés et glycosylés. On attribue à l'oleuropeine une action hypotensive, il est aussi responsable de la saveur amère des olives (Esti et al, 1998). Il est présent à raison de 5 à 7 mg/g de feuilles fraîches (Perrin, 1992).

Heimler (1996) a identifié cinq types de flavonoïdes : lutéoline, quercétine, lutéoline-7-glucoside, lutéoline-4-glucoside et apigénine, grâce au pouvoir inhibiteur de ces composés, l'olivier acquière une résistance aux microorganismes et aux attaques d'insectes, ces composés ont également une propriété antioxydante qui permet de limiter le vieillissement de la peau chez l'Homme (Ait Baddi et al., 2003).

- L'Oleuropeine

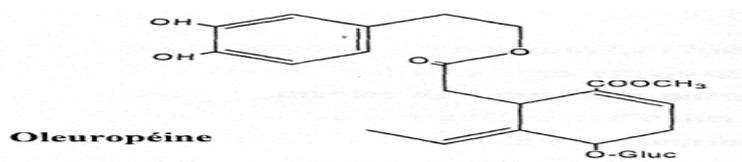


Figure 1 : Structure de l'oleuropeine (Ryan et Robards, 1998).

### II.7.L'activité antimicrobienne des feuilles d'olivier :

Les feuilles d'olivier sont connues pour leur résistance naturelle aux microorganismes et aux insectes (**Ait Baddi, 2003**), (**Yahiaoui-Zaidi et al., 2010**).

**Maestro Duran et al (1994)**, ont découvert l'une des raisons qui explique ce phénomène, en observant l'activité antimicrobienne de molécules appartenant à un vaste groupe de composés phénoliques, parmi ces molécules figurent l'*oleuropeine* et certains groupes de flavonoïdes (**Visioli et Galli, 1994**). La plupart de ces composés exercent une activité antimicrobienne contre toute une gamme de germes parmi lesquels les bactéries Gram<sup>+</sup> (exemple : les *Lactobacillus*), en effet, ces composés inhibent la croissance de ces microorganismes, attaquent la viabilité des cellules végétatives et les spores bactériennes (**Maestro Duran et al., 1994 ; Esti et al., 1998**).

**Bisignano et al (1999)**, ont démontrés que les secoiridoïdes (*oleuropeine* et ses dérivés), empêche ou retarde le taux de croissance d'une gamme de bactéries et de champignons. Ces données montrent que, outre l'emploi potentiel de ses principes actifs comme additifs alimentaires ou dans des programmes intégrés de prise en charge de parasites, « *Olea europaea* » peut être considéré comme une source potentielle d'agents antimicrobiens prometteurs pour le traitement des infections des systèmes gastro-intestinal ou respiratoire de l'homme.

**Tranter et al (1993)** ont montré que la présence de basses concentrations d'*oleuropeine* a retardé la croissance de *Staphylococcus aureus* en milieu NZ amine. Une augmentation de la concentration d'*oleuropeine* a eu comme conséquence une diminution de la quantité de glucose assimilé et par conséquent, la quantité de lactate produit. En outre, l'*oleuropeine* a empêché la sécrétion d'un certain nombre d'exoprotéines. L'addition d'*oleuropeine* pendant la phase exponentielle n'a semblé avoir aucun effet sur la croissance de *Staphylococcus aureus* dans NZA+.

L'oleuropeine stimule la formation d'oxyde nitrique, substance à forte action vasodilatatrice et antibactérienne (**Visioli et al., 1998 ; Calabrese et al., 2002**). Leurs données montrent que pendant l'injection d'endotoxine, l'oleuropeine renforce la réponse des macrophages, ayant pour résultat une plus haute production d'oxyde nitrique, étant jugé bénéfique pour la protection des cellules et de l'organisme.

Outre les effets antimicrobiens, les composés phénoliques des feuilles d'olivier exercent également une activité antioxydant (**Visioli et al., 1998 ; Visioli et al., 2000; Garcia - Alonso et al., 2004**) et anti-inflammatoires (**Raj Narayana et al., 2001 ; Petroni et al., 1997**).

## Chapitre III : Les méthodes d'extraction et dosage des composés phénoliques :

### III.1. Extraction des composés phénoliques :

Le but de l'extraction est de faire diffuser les composés phénoliques de la matière végétale dans la phase liquide (**FAO/IAEA, 2000 ; Escribano-bailon et Santos-buelga, 2003**).

**Mompon et al (1998)**, ont mis en évidence deux modes d'extraction, liquide-liquide et solide-liquide, au cours de l'extraction liquide-liquide, les solvants agissent selon des mécanismes proches de ceux qui interviennent dans les réactions de synthèse organique, il s'agit principalement d'interactions moléculaires entre le solvant et le soluté, par contre l'extraction solide-liquide met en jeu des mécanismes plus complexes et moins bien connus. En effet le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide- liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et le soluté doit ressortir du solide. La plus part des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion.

### III.2. Les facteurs influençant l'extraction des composés phénoliques :

Les conditions et l'état de l'échantillon au moment de l'extraction représentent un paramètre important lors de l'extraction (**Scalbert, 1992**). Le type de solvant, pH, température et le nombre d'étapes d'extraction sont en effet les principaux facteurs influençant l'extraction (**Escribano-bailon et Santos-buelga, 2003**). D'après **Mompon et al (1998)**, le temps d'extraction, la température et le pH doivent être soigneusement contrôlés en raison des risques de dégradation en particulier l'hydrolyse des fonctions esters.

### III.2.1. La conservation :

L'extraction des composés phénolique des matériaux végétaux est en corrélation négative avec la durée de conservation par différentes méthodes, le mieux serait de procéder si possible à une extraction de l'échantillon à l'état frais. Cependant l'utilisation d'un matériel végétal frais n'est pas toujours possible, ce dernier doit être conservé, pour une extraction et une analyse ultérieure; ainsi différentes méthodes de conservation sont utilisées dont le séchage à l'air ambiant, à l'étuve, la congélation, et enfin la lyophilisation (**Scalbert, 1992**).

### III.2.2. Choix du solvant d'extraction :

Pour le processus d'extraction, un solvant approprié est exigé (**FAO/IAEA, 2000**). Dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires, les solvants d'extractions jouent un rôle capital en assurant le transfert de la phase du produit à extraire (**Mompon et al., 1998**), la composition du solvant influe sur les propriétés physiques telle la densité et la viscosité qui , à leur tour, peuvent influencer sur la diffusion et le taux d'extraction ( **Cacace et Mazza , 2001**). Selon **Marcus (1998)**, la polarité représente l'ensemble des propriétés moléculaires responsables des forces d'interactions entre le solvant et le soluté. En effet, l'eau est le solvant universel utilisé pour l'extraction (**Scalbert, 1992 ; Murphy Cowan, 1999**), et l'ajout d'une certaine quantité d'eau aux différents solvants organiques améliore l'efficacité d'extraction (**Scalbert, 1992**). Généralement le méthanol aqueux (50%) et l'acétone aqueux (70%) sont les plus utilisés, l'acétone s'est avéré selon divers chercheurs être le meilleur pour l'extraction des composés phénoliques des feuilles d'arbre (**Scalbert, 1992 ; FAO/IAEA, 2000**).

### III.2.3. Temps d'extraction :

La teneur en polyphénols varie selon le temps d'extraction (**Lapornik et al., 2005**), en règle général la teneur en polyphénols augmente considérablement avec l'augmentation du temps d'extraction.

### III.2.4. Nombre d'étapes d'extraction :

L'efficacité de l'extraction augmente avec le nombre d'étapes d'extraction (**Esribano-bailon et Santos-buelga, 2003**). **Ribereau et Gayon (1968)** suggèrent d'épuiser à plusieurs reprises le tissu végétal pour avoir une extraction satisfaisante. Des rendements quantitatifs sont obtenus seulement quand 3-5 extractions séquentielles de la matière végétale originale sont effectuées (**Esribano-bailon et Santos-buelga, 2003 ; Avallone et al., 2005**).

### III.2.5. La température :

La température augmente le degré d'extraction par augmentation du coefficient de solubilité et de diffusion des composés phénoliques (**Spigno et Defaveri, 2005**), cependant l'extraction très longue à une température trop élevée peut mener à la dégradation et à la perte de composés phénoliques (**FAO/IAEA, 2000**) car ces derniers présentent une sensibilité à la chaleur. Une température de 60°C est recommandée comme la limite maximale à ne pas dépasser (**Cacace et Mazza, 2003**).

### III.2.6. Le pH :

Le pH du milieu détermine le degré de solubilité des composés phénoliques (**Esribano-bailon et Santos-buelga, 2003**). Nombreux sont les polyphénols extractibles en milieu aqueux basique (**Mompon et al., 1998**). Cependant, l'extraction des anthocyanes nécessite un solvant légèrement acide (**Ribereau et Gayon, 1968 ; Esribano-bailon et Santos-buelga, 2003**) car ces pigments sont instables en milieu neutre ou légèrement alcalin (**Ribereau et Gayon, 1968**).

### III.3. La chromatographie sur couche mince :

Du fait de ses faibles contraintes techniques, de son emploi simple et de son coût relativement modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimique d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés (Levine, 1990).

#### III.3.1. Le choix de l'éluant (la phase mobile) :

Le choix de l'éluant est essentiel. Il n'est pas toujours fourni avec le mode opératoire et il est important de savoir le choisir. L'éluant est souvent un mélange de plusieurs (2 ou 3) solvants dans des proportions bien établies. Ce choix dépend de la polarité. Le tableau IV présente le classement des principaux solvants par caractère polaire croissant (Levine, 1990) :

### Chapitre III : Méthodes d'extraction et dosage des composés phénoliques

Ether de pétrole Cyclohexane Tétrachlorure de carbone Benzène Toluène	<i>Solvants apolaires</i>
	↓
Dichlorométhane Ether diéthylique Chloroforme Acétate d'éthyle Pyridine	<i>Caractère polaire croissant</i>
	↓
Acétone Ethanol Méthanol Eau Acide acétique	<i>Solvants polaires</i>

**Tableau IV :** Principaux solvants à caractère polaire croissant (**Levine S.G. 1990**).

Pour pouvoir comparer, voici à titre indicatif la polarité relative des principales familles de molécules organiques par ordre croissant de polarité :

Alcanes Dérivés halogénés Cétones, aldéhydes, éthers et esters	<i>Familles de molécules apolaires</i>
	↓
Amides Amines	<i>Caractère polaire croissant</i>
	↓
Alcools Phénols Acide carboxyliques	<i>Familles de molécules polaires</i>

**Tableau V :** La polarité relative des principales familles de molécules organiques (**Levine S.G. 1990**).

### **III.3.2. Réactifs chimiques utilisés pour la révélation :**

L'utilisation de réactifs chimiques en solution, vaporisés sur les chromatogrammes, permettent de compléter les observations faites visuellement sous les lampes UV à 254 nm (extinction de la fluorescence) et 366 nm (fluorescence propre). En effet, un choix adapté de réactifs permet non seulement de mettre en évidence des constituants ou classes de constituants présents dans un extrait (criblage général), mais offre en plus une méthode simple et rapide pour localiser un composé particulier dans un mélange (extrait, fraction enrichie,...). L'utilisation d'un réactif polyvalent est particulièrement adaptée pour réunir rationnellement les fractions primaires récoltées suite à une séparation préparative ou semi-préparative. Le Tableau V donne un aperçu sur quelques révélateurs utilisés en CCM.

### Chapitre III Méthodes d'extraction et dosage des composés phénoliques

Réactif : subst. révélées	Mode d'utilisation
<b>Godin (1954) : réactif polyvalent</b>	Mélanger en part égales une solution éthanolique de vanilline à 1% et une solution aqueuse d'acide perchlorique à 3%, vaporiser le mélange sur la plaque puis une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10%. Après chauffage intense. les composés organiques apparaissent sous forme de taches colorés.
<b>Chlorure de fer : tanins, polyphénols</b>	Préparer une solution de FeCL3 à 10% dans un mélange MeOH-H2O, (1 :1) et la vaporiser sur la plaque. Les polyphénols apparaissent sous forme de taches de couleur ( <b>Wagner et Bladt, 1996</b> ).
<b>NST/PEG : flavonoïdes</b>	Vaporiser successivement une solution méthanolique de déphénylboryloxy-éthylamine à 1% et une solution éthanolique de PEG 4000 à 5% sur la plaque. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes orange, jaunes, bleues et vertes à 366 nm ( <b>Wagner et Bladt, 1996</b> ).
<b>Dragendorff : alcaloïdes</b>	Préparer une solution contenant 0.85g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'acide tartrique dans 40 ml d'eau (=A) et une solution contenant 16g de KI dans 40 ml d'eau (=B), mélanger extemporanément 5ml de A, 5 ml de B, 100ml d'eau et 20 g d'acide tartrique, vaporiser le mélange sur la plaque. Les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches orange ( <b>Wagner et Bladt, 1996</b> ).
<b>Acétate de plomb : coumarines</b>	Vaporiser une solution aqueuse d'acétate de plomb à 5% sur la plaque. Les coumarines apparaissent sous forme de taches fluorescentes vertes à 366 nm ( <b>Wagner et Bladt, 1996</b> ).

**Tableau VI:** Réactifs chimiques pour la révélation des plaques CCM (**Wagner et Bladt, 1996**).

### III.3.3. Avancés de la chromatographie :

Le système analytique de la chromatographie liquide à haute performance « HPLC » est une technique de résolution chromatographique utilisée pour la séparation, quantification et l'identification simultanée des composés phénoliques . C'est en effet, grâce à cette technique que **Zuo et son équipe (2002)** ont pu révéler la présence de la plus part des acides benzoïques et phénoliques sous forme conjugués dans les baies.

**Karadeniz et al (2000)**, ont utilisé cette technique pour la détermination quantitative des acides phénols et de flavonols glycosides des raisins. De plus le verbascoside, la rutine et luteoline-7-glucoside ont été détectés par cette technique (**Amiot et al., 1995**). Cependant, l'HPLC ne fournit pas souvent une séparation suffisante, pour cette raison la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) demeure la méthode de choix (**Zuo et al., 2002**).

La chromatographie sur papier a joué un rôle très important dans de nombreux domaines de la chimie biologique, car elle permet une bonne séparation, l'étude des composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes ont bénéficié tout spécialement de cette technique (**Ribereau-Gayon , 1968**).

Des études récentes recommandent l'application de la méthode de chromatographie en phase liquide couplée au spectrométrie de masse (LC-MC) pour l'identification de certains composés phénoliques de l'olive (**Ryan et al., 2002**). Selon **Robard (2003)**, cette technique peut fournir des données suffisantes pour l'analyse complète de structure, mais plus généralement elle est employée pour déterminer la masse moléculaire et pour établir la distribution des substituants sur le(s) noyau(x) phénolique(s).

## **Matériel et méthodes :**

### **1. Matériel végétal :**

#### **1.1. Origine de l'échantillon :**

Notre travail a été effectué sur deux variétés de feuilles d'olivier : « Aymel » et « Chemlal » provenant de la ferme pelote A/Mira Tazmalte, wilaya de Bejaïa.

Date du prélèvement des feuilles : 03/03/2010.

#### **1.2. Préparation du matériel végétal :**

##### **1.2.1. Séchage :**

Le séchage des feuilles s'est fait à l'aire libre et à l'abri de la lumière.

##### **1.2.2. Broyage :**

Les feuilles ainsi séchées sont réduites en poudre à l'aide d'un broyeur.

##### **1.2.3. Tamisage :**

La poudre de feuilles obtenue par broyage et tamisée à l'aide d'un tamis de 0.5 mm de diamètre et conservée dans un bocal en verre fermé et à l'abri de la lumière.



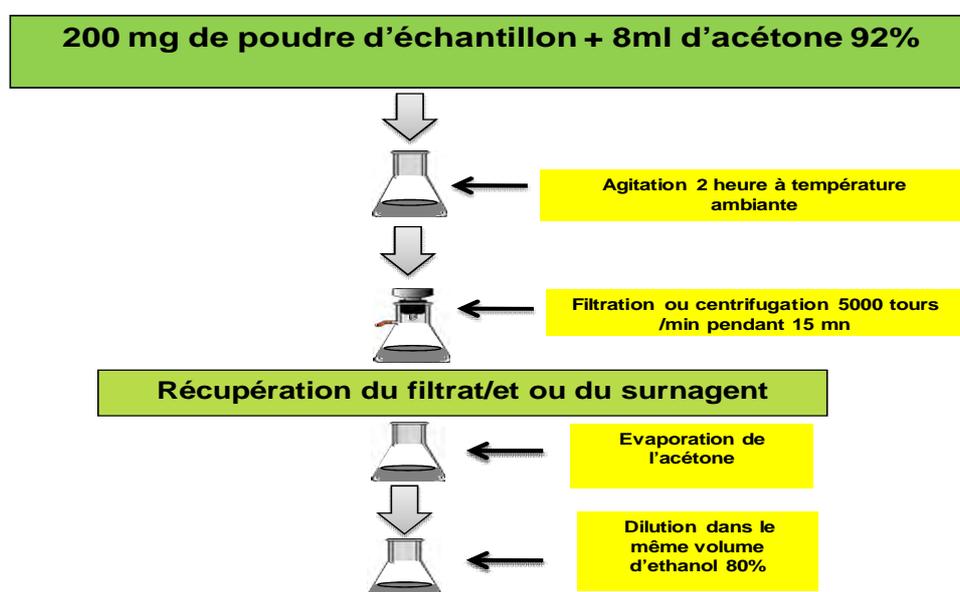
**Figure 2 :** Poudre de feuilles d'olivier des variétés « Chemlal » et « Aymel ».

## 2. Extraction des composés phénoliques :

L'extraction a été réalisée suivant la méthode proposée par (Oomah *et al.*, 2006) qui repose sur la méthode de Glories (Cacasse et Mazza, 2001).

Solvant utilisé : acétone 92%.

200 mg ( $200 \pm 0.9$ ) d'échantillon sont extraits avec 8 ml du solvant (acétone 92%) pendant 2 heures sous agitation magnétique et à température ambiante, l'extrait est filtré sous vide à travers des creusets filtrant en verre fritté de porosité 3 ou centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 mn. Le filtrat et /ou le surnageant récupéré est mesuré, il est en suite laissé à l'air libre ou sous hôte pour une évaporation totale de l'acétone, l'extrait est ensuite dilué dans le même volume d'éthanol 80%.



**Figure 3 :** Protocol d'extraction des composés phénoliques selon (Oomah *et al.*, 2006) .

### **3. Dosage des composés phénoliques :**

Le dosage a été effectué selon la méthode rapportée par **Oomah (2006)**.

#### **3.1. Dosage des phénols totaux :**

150  $\mu$ L d'éthanol HCl 2% additionné à 100  $\mu$ L d'extrait.

L'absorbance est mesurée à 280 nm contre un blanc et les concentrations sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la catéchine, les résultats sont exprimés en équivalent de catéchine (annexe 2) puis en pourcentage.

#### **3.2. Dosage des flavonols :**

150  $\mu$ L d'éthanol HCl 2% additionné à 100  $\mu$ L d'extrait.

L'absorbance est mesurée à 360 nm contre un blanc et les concentrations sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine, les résultats sont exprimés en équivalent de quercétine (annexe 2) puis en pourcentage.

#### **3.3. Dosage des esters tartriques :**

150  $\mu$ L d'éthanol HCl 2% additionné à 100  $\mu$ L d'extrait.

L'absorbance est mesurée à 320 nm contre un blanc et les concentrations sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide caféique, les résultats sont exprimés en équivalent d'acide caféiques (annexe 2) puis en pourcentage.

## **4. Séparation et mise en évidence par CCM :**

### **4.1. Systèmes d'élution**

Deux systèmes d'élution solvants ont été utilisés :

- ❖ Système (1) : Eau, méthanol, dichloromethane (1.5ml/15ml/85ml) (V/V/V) **(L'huillier, 2007)**.
- ❖ Système (2) : Chloroforme, méthanol, eau distillé, acide acétique (60ml/30ml/8ml/6ml) (V/V/V/V) **(Long et al., 2010)**.

L'éluant est préparé dans une cuve (100ml) et laissé saturer.

### **4.2. Préparation de la plaque :**

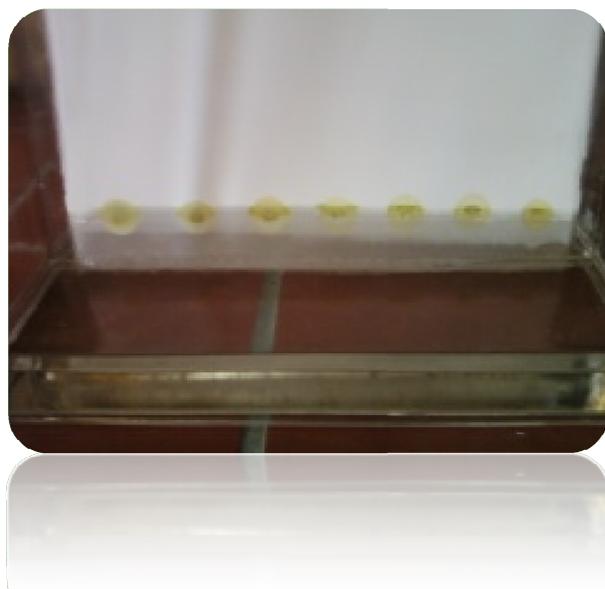
- ❖ Nettoyage des plaques à l'aide de méthanol.
- ❖ Étalage du gel de silice jusqu'à obtention d'une couche mince de 0.5 mm d'épaisseur.
- ❖ Séchage des plaques à l'air libre.
- ❖ Avant chaque utilisation, les plaques sont activé à l'étuve et à 110°C /30 mn.

### **4.3. Dépôt de l'échantillon :**

- ❖ 20 et 30 µL des deux extraits sont respectivement déposés à 2 cm du bord inférieur de la plaque à l'aide d'une micropipette.

#### 4.4. Développement de la plaque :

- ❖ La plaque est placée verticalement dans la cuve.
- ❖ migration dans le système d'élution.
- ❖ Séchage à l'aire libre.



**Figure 4 :** Développement de la plaque CCM.

#### 4.5. Détection des taches :

- ❖ Les taches sont détectées par observation sous lampe UV.

#### 4.6. Révélation :

- ❖ L'intégralité de la plaque vaporisée avec de la vanilline sulfurique préparée avant chaque utilisation. Après séchage à l'air libre (environ 2min), la plaque est mise dans une étuve réglée à 110° pendant 5 mn.

**Résultats et discussions :**

**1. Résultats :**

L'extraction des composés phénoliques effectuée sur les feuilles d'olivier des deux variétés « Aymel » et « Chemlal » a permis un rendement de 46,87%.

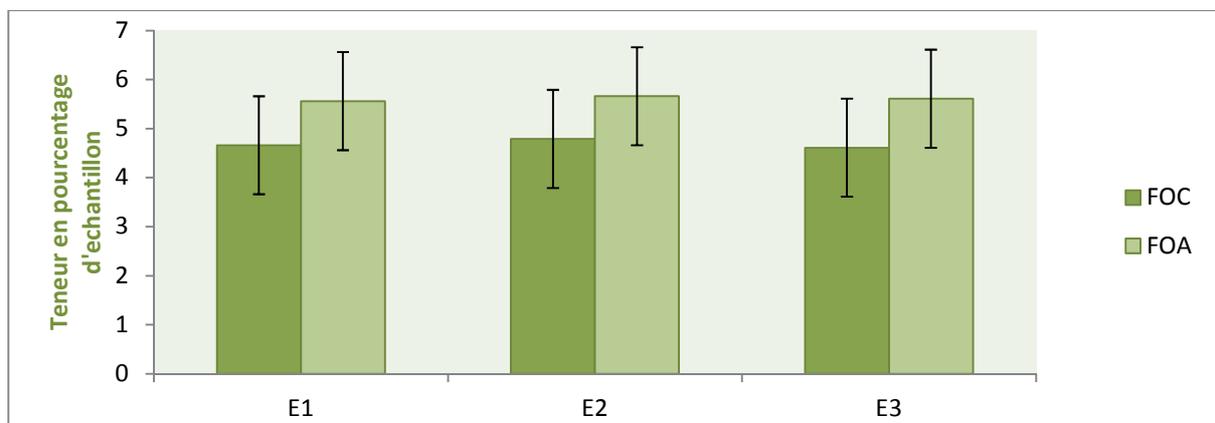
**1.1 Le dosage :**

**❖ Phénols totaux :**

Le dosage des phénols totaux (figure 5) indique que la variété « Aymel » est plus riche, elle correspond à 5.61% contre une teneur de 4.68% pour la variété « Chemlal ».

variété	solvant	Acétone 92%
Aymel		<b>5.61%</b>
Chemlal		<b>4.68%</b>

**Tableau VII :** Teneurs en phénols totaux des deux variétés de feuilles d'olivier.



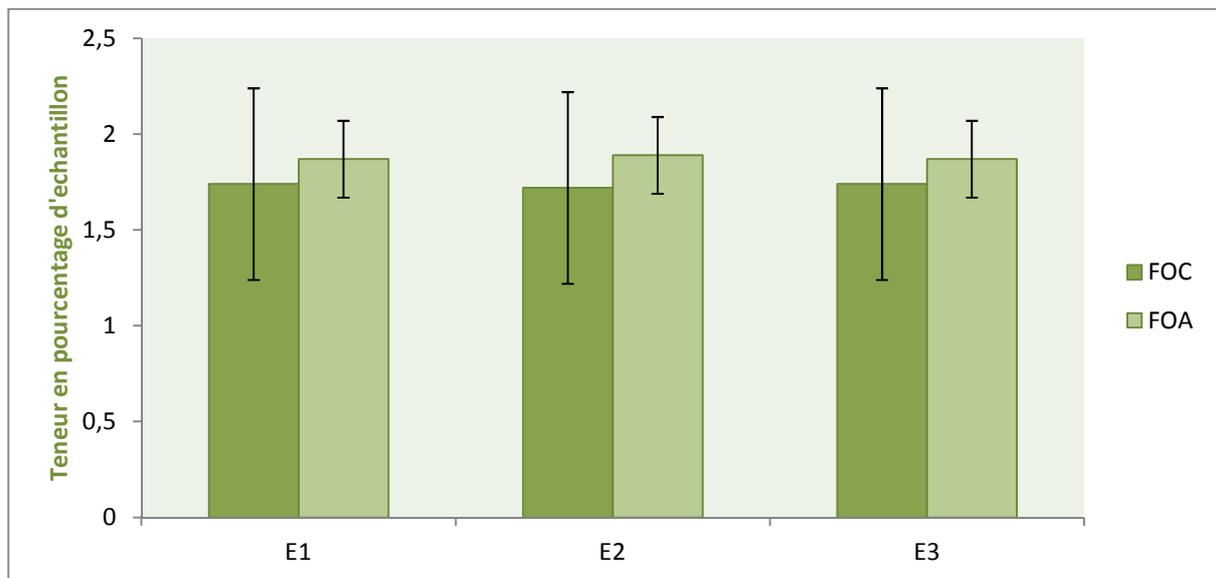
**Figure 5 :** Teneurs en phénols totaux (en pourcentage d'échantillon).

❖ **Dosage des flavonols :**

Le dosage des flavonols (figure 6) indique que la variété « Aymel » est plus riche, elle correspond à 1.87% contre une teneur de 1.73% pour la variété « Chemlal ».

variété	solvant	Acétone 92%
Aymel		<b>1.87%</b>
Chemlal		<b>1.73%</b>

**Tableau VIII :** Teneurs en flavonols des deux variétés de feuilles d'olivier.



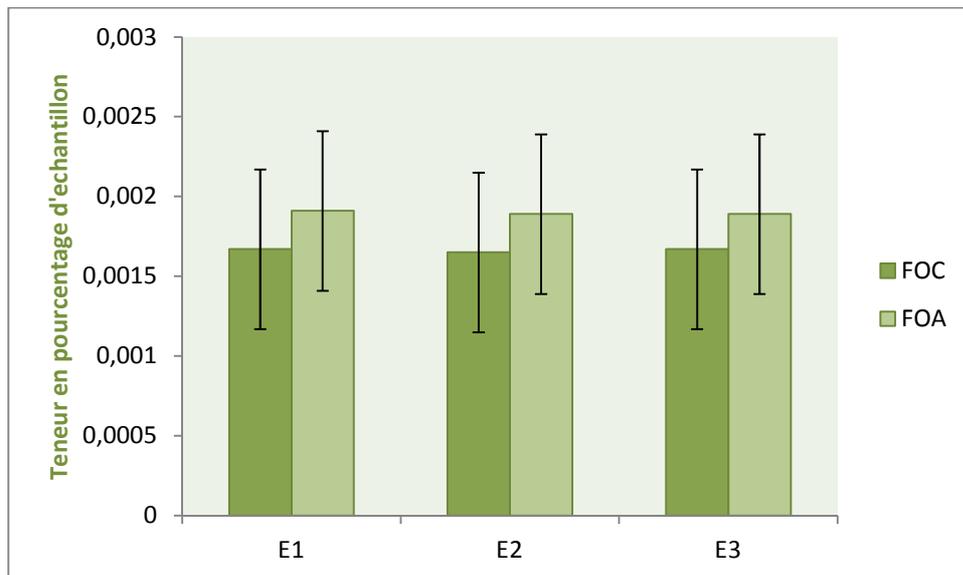
**Figure 6 :** Teneurs en flavonols (en pourcentage d'échantillon).

❖ **Dosage des estères tartriques :**

Le dosage des estères tartriques indique que les feuilles d'olivier sont faiblement riches en ces derniers (figure 7), on note aussi que la variété « Aymel » est plus riche avec 0.00189% contre une teneur de 0.00166% pour la variété « Chemlal ».

variété	solvant	Acétone 92%
Aymel		<b>0.00189%</b>
Chemlal		<b>0.00166%</b>

**Tableau 8 :** Teneurs en esters tartriques (en pourcentage d'échantillon).



**Figure 7 :** Teneurs en estères tartriques (en pourcentage d'échantillon).

**Résultats de la CCM :**

Le profil chromatographique des deux extraits (Aymel, Chemlal) a permis de montrer la présence de plusieurs fractions à des Rf différents :

- ❖ Dépôt de 20  $\mu$ l d'extrait, système 2 (chloroforme/méthanol/eau distillé/acide acétique) aux proportions (60/30/8/6) (V/V/V/V).

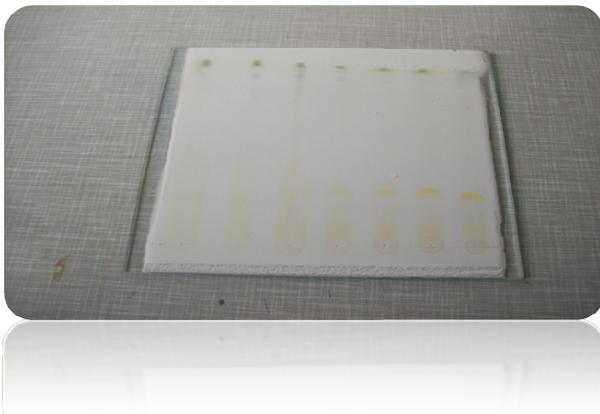
Après révélation : Pas de séparation.



**Figure 8 :** CCM des extraits (dépôt de 20 $\mu$  l).

- ❖ Dépôt de 30  $\mu$ l, système (1) (eau distillé /méthanol/dichloromethane) aux proportions (1.5/15/85) (V/V/V):

Après révélation : Ce système a permis de révéler 5 fractions à des Rf différents.



**Figure 9 :** CCM des extraits Système 1(eau distillé /méthanol/dichloromethane).

- ❖ Dépôt de 30  $\mu$ l, système (2) (chloroforme/méthanol/eau distillé/acide acétique) (V/V/V/V).

Après révélation : Ce système a permis de révéler 8 fractions à des Rf différents.



**Figure 10 :** CCM des extraits Système (2) (chloroforme/méthanol/eau distillé/acide acétique).

## **2. Discussion :**

Les résultats du dosage des composés phénoliques des deux variétés de feuilles d'olivier ont révélé l'existence de différentes fractions phénoliques et sont en accord avec les données rapportés par **(Martin-garcia et al, 2003 ; Renalli et al, 2006)**.

Les teneurs en phénols des extraits testés sont de l'ordre de 4,68 % à 5,61% en phénols totaux, 1.73 % à 1.87% en flavonols et de 0.00166% à 0.00189% en esters tartriques et sont légèrement inférieurs à ceux rapportés par **(Martin-garcia et al, 2003)**, Elles sont aussi légèrement plus faible que les travaux fait précédemment.

Le profil chromatographique effectué sur les extraits de feuilles d'olivier de variétés « Aymel » et « Chemlal » a permis de révéler plusieurs taches, ces taches apparaissent pour la variété « Aymel » ainsi que la variété « Chemlal » :

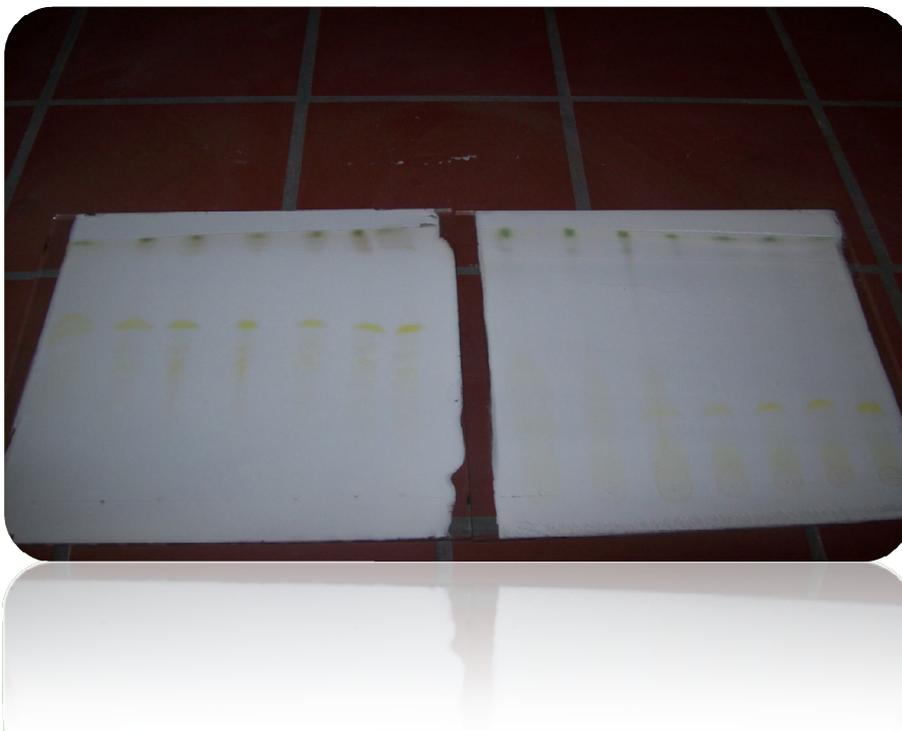
**Le Système (1)** (eau distillé /méthanol/dichloromethane) **(L'huillier, 2007)**, a permis de révéler 4 fractions à des Rf différents ;

- ❖ Fraction 1 : de couleur jaune claire, Rf=0.095 peut correspondre à de la rutine **(pharmacopée européenne, 2008)**.
- ❖ Fraction 2 : de couleur jaune orangé, Rf=0.26 correspond a de l'oleuropeine **(pharmacopée européenne, 2008)**.
- ❖ Fraction 3 : de couleur bleu gris, Rf = 0.904 pouvant correspondre à des anthocyanes **(Mamyrbékova-Békro , 2007)**
- ❖ Fraction 4 : de couleur vert feuille Rf=0.968 (fraction non identifiée).

**Le Système (2)** (chloroforme/méthanol/eau distillé/acide acétique) développé par **Long, (2010)** a permis de révéler 8 fractions à des Rf différents ;

- ❖ Fraction 1 : de couleur jaune visible à la lumière du jour, Rf=0.3125 pouvant correspondre à des flavonoïdes d'après leurs couleurs jaunes.
- ❖ Fraction 2 : de couleur jaune et de grande proportion, Rf=0.418 correspondant à de la rutine(en comparaison avec la couleur obtenu par le système1).
- ❖ Fraction 3 : de couleur jaune, Rf=0.468 pouvant correspondre à des flavonoïdes (**Markham, 1982**).
- ❖ Fraction 4 : de couleur jaune, Rf=0.550 pouvant correspondre à des flavonoïdes (Markham, 1982).
- ❖ Fraction 5 : de couleur jaune orangé, Rf= 0,625 correspondant à l'oleuropeine (**Long, 2010**).
- ❖ Fraction 6 : de couleur bleu grise, Rf= 0.906 pouvant correspondre à des anthocyanes.
- ❖ Fraction 7 : de couleur vert gris, Rf= 0.937 (fraction non identifiée).
- ❖ Fraction 8 : de couleur verte, Rf= 0.981 (fraction non identifiée).

Les deux systèmes d'élutions ont permis de révéler l'oleuropeine, néanmoins le système développé par **Long, (2010)** permet de révéler d'autres taches. En tenant compte des résultats obtenus nous pouvons retenir le système d'élution décrit par **Long, 2010** pour la suite des travaux.

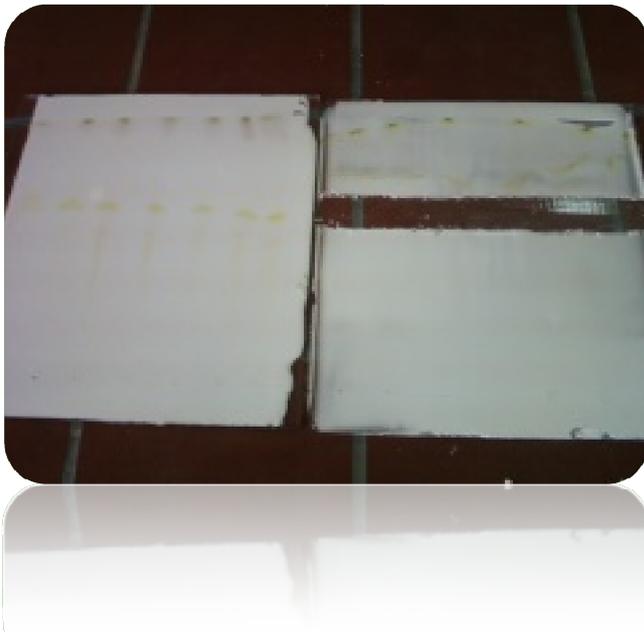


**Figure 11** : Profil chromatographique des deux systèmes d'élutions.

### 3. Purification du composé majoritaire « l'oleuropeine » :

Le système d'élutions 2 nous a permis de donner une meilleur séparation, c'est donc ce système qu'on utilisera pour l'étape de purification d'oleuropeine.

Cette étape consiste en une application de la CCM sans révélation chimique, qui sera suivie par la récupération de la fraction d'oleuropeine à l'aide d'une spatule (figure 12).



**Figure 12 :** Purification d'Oleuropeine.

Un extrait pur d'oleuropeine de couleur jaunâtre est obtenu dans un volume réduit de méthanol après élimination de la silice par centrifugation à 5000 tours /min pendant 15 mn.

La CCM effectuée sur cet extrait pur a montré un profil avec une seule fraction caractérisée par une couleur jaune typique de l'oleuropeine (Figure 13). Ce composé purifié est conservé au frais et sera utilisé comme standard pour des travaux ultérieurs et sera soumis à une panoplie de test biologiques.



**Figure13** : CCM de l'oleuropeine pure.

### Conclusion :

L'objet de notre étude s'est porté sur les polyphénols contenus dans les feuilles d'olivier des deux variétés « Aymel » et « Chemlal », les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent que ces deux variétés de feuilles représentent une source particulière riche en polyphénols avec des teneurs qui varient entre 4.68% à 5.61% en phénols totaux et une supériorité notée pour la variété « Aymel ».

La méthode d'extraction utilisée est une méthode récente et intéressante car elle est rapide, simple et donne de bons résultats.

La CCM effectuée sur les extraits de feuilles d'olivier a permis de révéler un nombre intéressant de fractions dont l'oleuropeine (principe amers de l'olive), connu comme étant le principal composé phénolique de ces dernières. Ce composé a une large gamme d'effets dont une activité antimicrobienne contre toute une gamme de germes (bactéries et champignons).

Afin de pouvoir étudier ces effets sur les *Pectobacteriums*, nous avons purifié une quantité importante d'oleuropeine qui sera utilisée comme standard pour des travaux ultérieurs.

Cependant l'optimisation de la méthode d'extraction utilisée reste envisageable à l'avenir.

Certes l'oleuropeine est un composé majoritaire il serait également important de séparer et purifier les autres fractions afin de tester séparément les propriétés antimicrobiennes de toutes les molécules présentes dans l'extrait brut des feuilles d'olivier.

A:

**Ait Baddi G, Hafidi M , Merlin G, Revel J.C., (2003).**Caractérisation et identification des polyphénols lors du traitement des déchets d'huileries d'olives par compostage. *Agrochimica* ,161-171.

**Akowauh G.A ., Zhari. I ., Norgyati. I ., Sadikun.A et Khamsah S.M (2004).** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry* , 559-566.

**Amiot M J, Tacchini M, Aubert S Y, olezek W., (1995).** Influence of cultivar, maturity stage, and storage condition on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

**Avallone R., Plessi M., Baraldi M et Monzani A (1997) .** Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*) : protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*,166-172.

B :

**Bastoni L, Bianco A, Piccioni, F, Uccella N., (2001)** . Biophenolic profile in olives by nuclear magnetic resonance. *the online catalog of the National Agricultural Library*.

**Bate smith , swain ., (1962).** **Flavonoid** In comparative biochemistry *academic press*. 705-809.

**Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R., (1999).** On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm. Pharmacol* .**51**: 971-4.

**Breton C , f Médail, C Pinatel, A Bervillé., (2006).** De l'olivier à l'oléastre : origine et domestication de l'Olea europaea L. dans le Bassin méditerranéen, *Cahiers Agricultures*. Volume 15, Numéro 4, 329-36

C:

**Cacace J.E et Mazza G (2001)** . Extraction à l'eau sulfurée des anthocyanines et d'autres composés phénoliques du cassis. *Biochemical Systematic and Ecology*. **33** : 225-238.

**Calabresse G (2002)**. Effet de l'huile d'olive vierge extra sur la santé. *Olivae* , **93** : 19-23.

D:

**Delaveau p. (1988)**. Polyphénols et tannins dans l'alimentation. *Cha. Nut. Diet* . **2** :137-139.

E:

**Esribano-Balon M, Santos-Buelga C (2003)**. method in polyphenol analysis. *Royal Society of Chemistry, Cambridge*.1-16.

**Esti M, Cinquanta L, La Notte E (1998).** Phenolic compounds in different olive varieties. *J. Agric. Food Chem.* **46** :32-35.

F:

**FAO/IAEA (2000).** Quantification of tannins in tree foliage. Laboratory manual for FAO/IAEA co-ordinated research projection “use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants and on tanniniferous tree foliage”.*Animal Production and Health Sub-Programme.*1-25.

G:

**Garcia-alonso M.,De Pascual-Teresa S .,Santos-buelga C.et Rivas-Gonzalo J.C.(2004).**Evolution of the antioxydant propertiens of fruit .*Food Chimistry*,**84**:\_3-18.

**Ghedira K (2008).** L'olivier. *Phytothérapie Springer*, Volume 6, Number 2, 83-89(7).

**Green K, Thurston M (2002).** Physical Education and Health Promotion: A Qualitative Study of Teachers' Perceptions, *Health Education*, 102 (3), 113-123.

H:

**Harborne JB, Simmonds NW (1964).** The natural distribution of the phenolic aglycones. In: Biochemistry of phenolic compounds. *New York: Academic Press.* 77-127.

**Heimler D, Cimato A ,Alessandri S , Sani G, Pieroni A (1996)** .Seasonal trend of flavonoids in olive leaves .*Agr.MED* . **126**: 05-209.

J:

**Jean-Jacques Macheix (2005).** Les composés phénoliques des végétaux :

Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. 192p

K :

**Karadeniz F, Durst RW, Wrolstad RE (2000)** . Polyphenolic composition of raisins. *J Agric Food Chem.* (11):5343-50.

**Khan M, Panchal S, Vyas N ( 2007).** *Olea europaea*. *Phytopharmacol Review.* **1**: 11-48.

**Khayyal MT, el-Ghazaly MA, Abdallah DM, Nassar NN, Okpanyi SN, Kreuter MH (2001).** Effet hypotensif de l'extrait de feuille d'olivier (*Olea europaea*) sur l'hypertension induite par L-NAME chez les rats. *FEMS Microbiol Lett.*(1):9-13.

L:

**Lapornik B., Protsek M., Golc Wondra A (2005).** Comparison of extract prepared from plant by-product using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering.* **71**: 214-222

**Lee O, Lee B, Kim Y, Shetty K, Kim Y (2008).** Radical Scavenging-Linked Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Diverse Types of Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Food Science.* 519-525.

**Lee-Huang, Sylvia; Zhang, Li; Huang, Philip Lin; Chang, Young-Tae; Huang, Paul L2003 .** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical & biophysical research communications.* 1029-1037.

**Levine S.G. 1990** - Identification of Unknowns by Melting Point and Thin-Layer Chromatography in Combination - *J. Chem. Ed.*, 67, p. 972.

**Lhuillier D (2006)**. The Couette flow of dense and fluid-saturated granular media. *European Journal of Mechanics B/ Fluids*. 960-970.

**Long H.S ,Tilney, Van Wyk (2010)**. The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (Oleaceae). *African journal of biotechnology*.

**M:**

**Maestro Duran , Leon Cabello R, Ruiz Gutiérrez V (1994)**. Phenolic Compounds from olive (*Olea europaea*). *Grasas Y aceites*. 4: 265-269.

**Mamyrbékova-Békro J (2007)**. Influence de l'acide salicylique sur l'activité des polyphénoloxydases et l'accumulation des composés phénoliques chez le manioc (*Manihot esculenta Crantz*). *afrique scieces*. Vol.3, N2.

**Martín García A, Moumen A, Yáñez Ruiz D, Molina Alcaide E (2005).** Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves, *Unidad de Nutrición Animal*

**Mojca Škerget, Petra Kotnik, Majda Hadolin, Andreja Rižner-Hraš, Marjana Simonič, Zeljko Knez (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem.* **2**: 191-198.

**Mompon B., Lemaire B., Mengal P et Surbled M (1998).** Extraction des Polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. *Polyphénols* . 31-43.

**Murphy Cowan M (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* **12** : 564-582.

O :

**OOMAH D (2003).** les plantes curatives, isolation, caractérisation et l'évaluation des métabolites secondaires dérivés des plantes pour utilisation dans le domaine de la santé humaine. *Bulletin IBP.1* :1-4.

P:

**Perrin L.J.(1992).** Les composés mineurs et les anti oxygènes naturels de l 'olive et de son huile. *R.F.C.39* :25-32.

**Petroni A.,Blasevich M., Salami M., Montedoro G.F. et Galli C . (1997).** Inhibition of Leukocyte lokotriene B4 production by an olive oil-derived phenol indentifie by Masse spectrometry .*Thrombosis Research.*\_2:151-160

R:

**Raj Narayana K., Sripal Reddy M., Chaluvadi M .R. et Krishna D .R. (2001).** Bioflavonoids classification , pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential .*Indian journal of Pharmacology.*

**Ribereau Gayon P (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques . *Les composés phénoliques des végétaux.* p5

**Richter G (1993).** Composés phénoliques. *Le métabolisme des végétaux* .p319

**Robards K (2003).** Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*.**1000**: 657-691.

**Ross K, Shoemaker D( 2005).** Species delimitation in native South American fire ants. *Molecular Ecology* .14: 3419–3438

**Ryan D., Antolovich M., Hert T ., Prenzler P.D.Lavee Shimen .et Robartds K . (2002).**Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardy's mammoth. *J .Agric Food Chem*.**23**:6716-672.

**Ryan, D., and Robards, K. (1998).** Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123: 31R - 44R

## S:

**Salunkhe, DK, 1990.** Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC press.

**Sarni-Manchado P et Cheynier.V (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Science et technologie*.

**Scalbert A(1992).**Quantitative methods for the estimations of tannins in plants tissues. *Plant polyphenols. Plenum Press*,259-280.

**Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A.(2003).** Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *J Ethnopharmacol.* 84:299-305.

**Spigno G., De Faveri D.M (2005) .** Antioxidants from grape stolks and marc: influence of extraction procedure of yield, purity and antioxydants power of the extracts. *Journa of Food Engineering*,1-9.

## T:

**Tasioula-Margari, M.; Ologeri, O (2001).** Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC/MS. *J. Food Sci.*66, 530-534.

**Tranter H S., S C Tassou., G J Nychas .(1993).** The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 253–259.

V:

**Vermerris W, Nicholson R (2006).** Phenolic Compound Biochemistry. USA: Springer. 151-153.

**Visioli F ., et Galli C .(1994).** Oleuropein protect low density lipoprotein from oxidation .Life Science . **24**,1965-1971.

**Visioli F., Bellomo G et Galli C (1998).** Free radical-scavenging properties of olive polyphenols biochemical. *Research Communication* .**1**:60-64.

**Visioli F., Galli C ., Bornet F ., Mattei A., Patelli R ., Galli G ., Caruso D . (2000)** .Olive oil phénolics are dose-dependently absorbed in humans .*F.E.B.S. Letters* , **468**,159-160.

W:

**Wagner et Bladt (1996).** Plant Drug Analysis .*A Thin Layer Chromatography Atlas*.

Z:

**Zaidi-Yahiaoui R, F. Zaidi et A. Ait bessai (2008)** . Infulence of gallic and tannic acids on enzymatic activity and growth of pectobacterium chrysanthemi, *Africa journal of biotechnology* . vol 7 **(4)** 482-486.

**Zaidi-Yahiaoui R, Ladjouzi R, Benallaoua S (2010)**, Pathogenic variability within biochemical groups of *Pectobacterium carotovorum* isolated in Algeria from seed potato tubers. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology* .Vol. 1 **(1)** :001–009.

**Zuo Y., Wang C et Zhan J (2002)**. Separation, characterisation, and quantitation of benzoic and phenolics antioxidants in American cranberry fruits by GC-MS. *J. Agric. Food Chem* , **50** : 3789-3794.

**Annexe 1 :**

**Préparation des solutions :**

❖ **Ethanol HCl 2% :**

800ml d'éthanol pure, ajout de 20 ml d'HCl 37% et ajusté jusqu'à 1000 ml avec de l'eau distillé.

❖ **Vanilline sulfurique :**

1g de vanilline dans 100 ml d'éthanol à 95% puis ajouter 2 ml d'acide sulfurique

## Annexe 2 :

## Les courbes d'étalonnage :

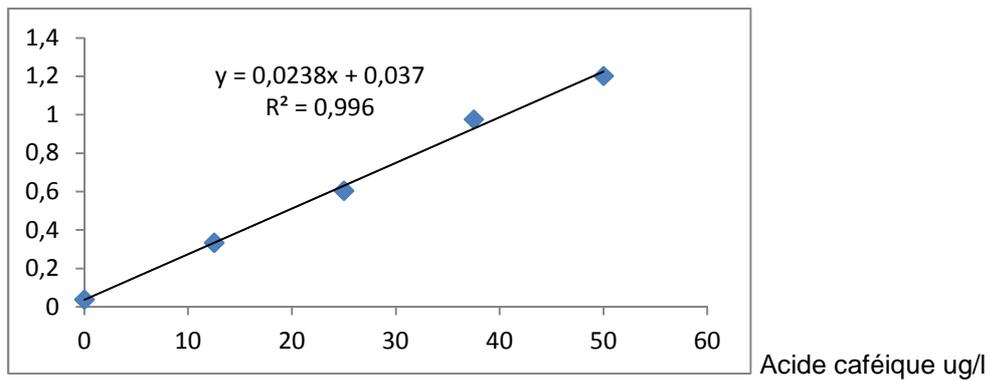


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des enstères tartriques

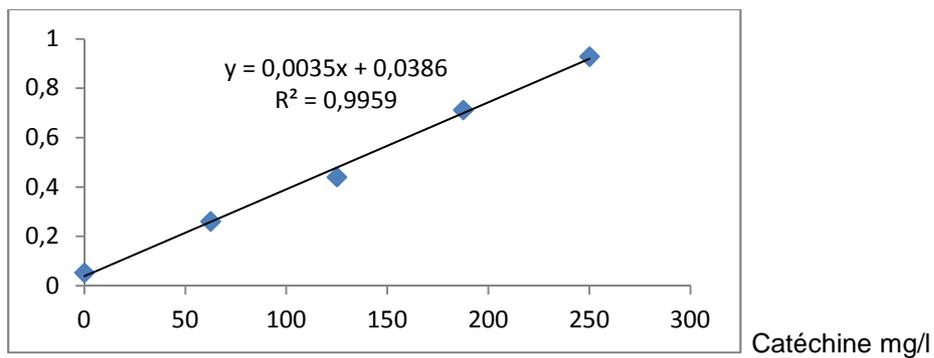


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des phénols totaux

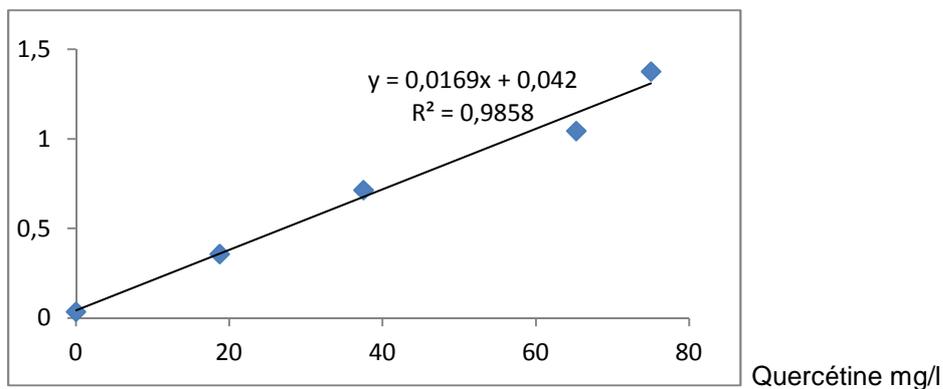


Figure 3 : Courbe d'étalonnage des Flavonols

## Résumé :

Les travaux menés sur les feuilles d'oliviers ont montré que ces dernières sont dotées de propriétés biologiques importantes, elles contiennent de nombreux composés phénoliques qui exercent des activités intéressantes.

L'objet de notre étude s'est porté sur les polyphénols contenus dans les feuilles d'olivier des deux variétés « Aymel » et « Chemlal », les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent que ces deux variétés de feuilles représentent une source particulière riche en polyphénols, fractionner les différents constituants contenue dans les feuilles d'olivier et de purifier le composé majoritaire « l'oleuropeine ».

Nous avons détaillé

- ❖ L'extraction des composés phénoliques des feuilles d'olivier.
- ❖ Dosage de quelques composés phénoliques des feuilles d'olivier.
- ❖ Séparation par CCM des composés phénoliques des feuilles d'olivier.
- ❖ Et enfin, purification de l'oleuropeine, composé majeur des feuilles d'olivier.