



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn khaldoun –Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (D04)
Filière : : Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie microbienne

Présenté par :

M^{elle} CHEDJARA Kamar

Mr ACED Salah Eddine

Mr BOUHAOUS Oussama Yazid

Thème

**Evaluation des activités biologiques des composés
phénoliques issus des feuilles d'olivier (*Olea europea L.*)**

Soutenu publiquement le 27-09-2020

Devant le Jury:		Grade
Président	M ^{me} MAKHLOUFI C	MCA
Promoteur	M ^{me} BENARABA R	MCA
Co-promoteur	M ^{me} ABDELLAH	Ingénieur de recherche
Examineur	M ^{me} MEDJBER	MCB

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous rendons grâce et louange à d'ALLAH qui nous a donné la patience, la santé, la force et la persévérance pour la réalisation de ce modeste ouvrage.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à notre promotrice Madame BENARABA R d'avoir proposé et dirigé ce travail, nous la remercions infiniment pour ses conseils judicieux et son attention qu'elle a apporté pour la réalisation de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également à notre Co-encadreur Madame ABDELLAH F, pour son aide et ses conseils très précieux et pour nous avoir fait l'honneur d'être notre Co-promotrice.

Nous tenons à remercier profondément Madame MAKHLOUFI C pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

Aussi, nous tenons à remercier profondément Madame MEDJEBER N d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous n'omettons pas de citer ici et de remercier Melle ABDALLAH F. Ingénieur au sein du laboratoire d'amélioration et de valorisation des productions animales locales de la faculté des sciences de la matière.

Nos sincères remerciements sont adressés à nos professeurs qui tout au long de notre parcours universitaires, ont mené à bien leur tâche d'enseignants et qui ont pu transmettre aisément leurs connaissances, nous disons merci d'avoir implanté en nous cet amour et cette soif de la science et du savoir



Dédicaces

Dieu merci

Je dédie ce travail

A Ma Chère Mère BENCHIHA LAHOUARIA

Les mots me manquent pour exprimer toute ma reconnaissance pour tout ce que Tu as fait pour mon bonheur et ma réussite. Que Dieu te protège et t'accorde-le Bonheur, la santé et la longue vie. Pour ton grand amour, ta tendresse et tes Longues prières qui m'ont été le meilleur gage de réussite, je t'offre ce travail.

A Mon Cher Père MOUHAMED

*Nulla expression ne peut traduire le noble sentiment que j'ai à ton égard,
Pour l'amour que tu m'as toujours porté,
Pour ta patience et ta générosité,
Pour ton soutien moral et matériel que tu as consentis en ma faveur,
Je te dédie ce travail en témoignage de ma grande reconnaissance et mon grand
Amour*

A Mahonorable sœur TAMANI, A qui, je porte le plus grand amour pour la collaboration et l'aide qu'elle n'a pas cessée de m'apporter.

*Que dieu vous protège et vous offre tout le bonheur que vous méritez pour
Votre avenir.*

A mes amies, ma famille

Mes proches et mon entourage, qui n'ont pas arrêté de me pousser et de me soutenir.

*Qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus sincère gratitude.
J'espère que j'étais à la hauteur de ce que vous attendez de moi.*

A toi Bachir mon confident

A mes chères amies Yazid et Abdellah

Enfin je dédie ce travail à tous mes amis

*Abdou, Zakaria, moussa, Younes, Nassim, Hamada, Oussama, Mahdi et Youcef
Et à tout ceux qui m'ont soutenu et m'ont aidé durant mes études et que je n'ai pas cité*

Salah

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce travail réalisé grâce à l'aide d'Allah le tout puissant

*A ma maman qui m'a soutenu et encouragé durant tous les années d'études et qui sans elle,
ma réussite, n'aura pas eu lieu*

A mon cher père, pour son encouragement, son soutien surtout pour son amour et son sacrifice

A mes frères Salah Eddine et Ahmed

A ma chère sœur Sondous

A ma grand-mère, mes oncles que dieu leur donne une longue et heureuse vie

*Et mes chers amis Oussama Salah Youcef Walid qui ont toujours encouragé et à qui je
souhaite plus de succès*

YAZID

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à mes chers parents qui m'ont doté d'une éducation digne;

À ma mère pour son affection, ses encouragements et ses sacrifices;

À mon père pour son soutien et la confiance qu'il m'a accordé.

L'amour qu'ils m'ont donné a fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

À la mémoire de ma chère grand-mère, ceci est ma profonde gratitude pour son éternel amour, que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse lui offrir.

À mes frères et sœurs, cousins (es) et amis (es).

À ma grand-mère, mes oncles et mes tantes, que Dieu leur donne une longue et heureuse vie.

Et à mes collègues dans ce travail pour leur patience et compréhension tout au long de ce projet...

Kamar

LISTE DES ABREVIATIONS

AG : Acide gallique

ALCL₃ : Trichlorure d'aluminium

CE50 : Concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50 % la concentration initiale de ferricyanure de potassium

CI50 : Concentration d'antioxydants Requisite pour diminuer la concentration de DPPH initiale de 50 %

DO: Densité optique

DPPH: 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

EAA : Equivalence en Acide Ascorbique

EAG : Equivalent en acide gallique

EQ : équivalence en quercitrine

FeCl₃: chlorure de fer

FRAP: *Ferric Reducing antioxidants power*

K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium

K₂HPO₄: Phosphate de potassium dibasique

KH₂PO₄: Phosphate de potassium monobasique

MCH : extrait de la variété chemlal issue de la méthode de la macération

MS : extrait de la variété sigoise issue de la méthode de macération

Na₂CO₃: Carbonate de sodium

RFC: Réactif de Folin Ciocalteu

SCH : extrait de la variété chemlal issue de la méthode de la sonication

SS : extrait de la variété sigoise issue de la méthode de la sonication

TCA: Acide Trichloracétique

Vit C: Vitamine C

LISTE DES FIGURES

Figure N°01 : Feuilles d'olivier	02
Figure N°02 : Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale.....	09
Figure N°03 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire (DPPH•) et un antioxydant (AH).....	15
Figure N°04 : Rendements de l'extraction des composés phénoliques des feuilles d'olivier.....	18
Figure N°05 : Teneur en composés phénoliques totaux des feuilles d'olivier.....	19
Figure N°06 : Teneur en flavonoïdes des feuilles d'olivier	21
Figure N°07 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles d'olivier exprimé enCE50.....	22
Figure N°08 : Capacité de piégée du radicale libre des extraits des feuilles d'olivier et L'antioxydant standard exprimé en CE50.....	24

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°01 : Composition chimique global des feuilles d'olivier.....	03
Tableau N°02 : Composition des feuilles d'olivier en composés bioactifs.....	04
Tableau N°03 : Matériel et produits chimiques utilisés.....	08

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Description, classification d'*Olea europea L*

Annexe II : Résultats numériques

Annexe III : Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques

Annexe IV : Courbes d'étalonnage pour l'évaluation de l'activité antioxydante

LISTE DES ABREVIATIONS.....	<i>i</i>
LISTE DES FIGURES.....	<i>ii</i>
LISTE DES TABLEAUX.....	<i>iii</i>
LISTE DES ANNEXE.....	<i>iv</i>
INTRODUCTION	

SOMMAIRE

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.Historique	02
I.2.Variétés de l'olivier en Algérie	02
I.3.Composition chimique des feuilles d'<i>Olea europaea L.</i>.....	02
I.4.Propriétés thérapeutiques des feuilles d'olivier	05
I.4.1.Activité antioxydante	05
I.4.2.Activité antimicrobienne	05
I.4.3Activité hypoglycémiant.....	05

II. ETUDE EXPERIMENTAL

II.1. Objectifs du travail.....	07
II.2. Lieu et durée du travail	07
II.3 Matériel et produits chimiques	08
II.4 Matériel végétal	08
II.5. Procédure expérimentale.....	09
II.5.1 Préparation du matériel végétal	10
II.5.2 Préparation des extraits à partir des feuilles d'<i>olea europea</i>	10
II.5.2.1. Technique d'extraction par macération	10
II.5.2.2. Technique d'extraction par sonication	11

II .5.3. Analyse quantitative des échantillons	11
II 5.3.1 Calcul des rendements d'extractions	11
II 5.3.2. Dosage des polyphénols	12
II 5.3.3. Dosage des flavonoïdes	13
II 5.4. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits d'<i>Olea europaea L.</i>	14
II 5.4.1. Test de réduction de fer FRAP (<i>FerricReducingAntioxidant Power</i>)	14
II 5.4.2. Evaluation de la capacité de piéger le radical libre DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	15

III. Résultats et discussions

III.1. Rendements d'extraction	18
III.2. Quantification des composés phénoliques	19
III.3.3. Teneur en flavonoïdes	21
III.3 Evaluation de l'activité antioxydante	22
III.3.1. Le pouvoir réducteur des extraits des feuilles d'olivier	22
III.3.2. Le pouvoir piégeur du radical libre DPPH•	24

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité tous les produits utilisés par les hommes pour soulager leurs maux ont trouvé leur origine dans le règne végétal, ce dernier représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives dotées de multiples intérêts mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces Composés, on retrouve les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Aires et al. 2013**).

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée et la plus originale du bassin Méditerranéen où elle compte 3139 espèces réparties dans près de 150 familles parmi les quelles 653 espèces sont endémiques, soit un taux de 12,6 %. (**Tani, et al .2010**). Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, l'olivier (*Olea europaea* L.) est largement distribué surtout dans le centre de l'Algérie, Cette plante adaptogène qualifiée a fait l'objet de plusieurs recherches scientifiques, l'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Par ailleurs, les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles qui sont connues par leur vertu bénéfique pour la santé humaine. La feuille d'olivier possède une structure moléculaire complexe, composée de polyphénols, d'esters et d'oleuropéine. On ne trouve cette molécule que dans deux autres végétaux : l'arganier et le troène. Ces substances bioactives stimulent le système immunitaire et possèdent des propriétés antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiennes qui les rendent très convoitées dans les domaines de la santé et l'industrie agro-alimentaire (**Aouidi f. 2012**).

L'objectif de cette présente étude est l'évaluation *in-vitro* de l'activité antioxydante des extraits phénoliques issus des feuilles de deux variétés d'olivier (chemlal et sigoise) et ceci dans une optique de valorisation pour un développement durable du secteur oléicole en Algérie.

Partie Bibliographie

1-Historique

L'olivier est un arbre connu en Grèce vers au moins 3500 av J-C, les feuilles de cette plante sont utilisées depuis cette époque pour désinfecter les blessures (**Larousse ,2001**). Cet arbre apparait dans l'histoire comme symbole de force, de longévité, de paix, foi et fertilité (**Lallas et al. 2011**).

2-Variétés de l'olivier en Algérie :

L'oléiculture algérienne est caractérisée par une large gamme de variétés :

- **-Chemlal** : C'est la variété la plus dominante en Algérie, elle représente près de 45% du patrimoine oléicole nationale.
- **Sigoise** : C'est une variété auto-fertile, elle représente 20% du verger oléicole national. Généralement, elle se localise à l'Ouest du pays allant de Oued Rhiou jusqu'à Tlemcen.
- **Azeradj et Bouchouk**: Accompagnent généralement les peuplements de Chemlal dont Azeradj améliore la pollinisation. Elle présente un gros fruit destiné à la conserverie et même à la production d'huile
- **Limli** : représente 8% du verger oléicole national, elle se rencontre dans la région d'Oued Soummam (**Boukhari .2014**).

3-Composition chimique des feuilles d'*Olea europaea L*

Les feuilles d'olivier sont considérées comme l'emplacement primaire du métabolisme des plantes aux niveaux des produits de base et des produits secondaires de plante.



Figure N°01 : Feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tels que les tannins) et principalement par des polysaccharides (telles que cellulose, et hémicellulose). La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations (Nefzaoui , 1995).

Tableau01. Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g) selon plusieurs auteurs. (Boudhrioua *et al.* 2009)

Substance	Teneur (En %)
Eau	46,2-49,7 a
Protéines	5,0-7,6 a
Lipides	1,0-1,3 a
Minéraux	2,8-4,4 a
Carbohydrates	37,1-42,5 a
Fibres brutes	18,0 b
Cellulose	11,4 b
Hémicellulose	13,3 b
Lignine	14,2 b
Polyphénols totaux	1,3-2,3 b
Tannins solubles	0,3 b
Tannins condensés	1,0 b

a. correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse fraîche des feuilles d'olivier.

b. correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier.

Les composés bioactif

La composition des feuilles d'olivier en composés bioactives change selon son origine, condition climatique, le mode de séchage, le temps et les types de solvants d'extraction et les conditions de stockage (Altiok .2010).

La feuille d'olivier est caractérisée par sa richesse en polyphénols totaux flavonoïde et en oleuropéine, le tableau suivant présente les principaux composés bioactifs des feuilles d'olivier (Gracia *et al.* 2008)

Tableau 02: Composition des feuilles d'olivier en composés bioactifs (Gracia *et al.*2008)

Famille chimique	Constituants chimique
Acide phénolique	Acide caféique Acide cinameique Acide p coumarique verbascosid
Flavonoïde	Apigénine Hesperidine Quercétine
Triterpens	Acide oléanolique Acide masilinique Acide hydroxy-oléanolique
Secoiridoïdes	Ligustroside aglycone Oleuropeine (Oleuropéoside) oléoside, diméthylester oléoside 11-déméthyl-oleuropéoside <i>Oleuropeine aglycone</i>

(Gracia *et al.* 2008)

4-Propriétés thérapeutiques des feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier présentent plusieurs activités biologiques dont on peut citer :

4.1. Activité antioxydante

Les feuilles d'olivier possèdent une forte capacité à piéger les radicaux libres par rapport aux différentes parties de l'arbre d'olivier, Les composés phénoliques des feuilles d'olivier dont l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol ont montré un pouvoir antioxydant important, ils sont capables de piéger les espèces réactives de l'oxygène(ERO) et les espèces réactives de l'azote ce qui permet la protection d'ADN contre les lésions (**De la Puerta et al.2001**).Les flavonoïdes des feuilles d'olivier exercent aussi une activité antioxydante via leurs groupes hydroxyles. Cette action est également due à la présence de triterpènes.

4.2. Activité antimicrobienne

Les extraits de feuilles d'olive présentent une activité antimicrobienne relativement élevée contre *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les composés phénoliques des feuilles d'olivier ont également été évalués contre plusieurs microorganismes qui sont des agents causaux d'infections intestinales et respiratoires humaines, y compris des bactéries Gram positive et gram négative et des champignons (**Sudjana et al. 2009**).

4.3. Activité hypoglycémiant

Les propriétés hypoglycémiantes de l'extrait des feuilles d'olivier peuvent être expliquées par deux mécanismes de l'oleuropéoside, il augmenterait l'utilisation périphérique du glucose et favorise la libération d'insuline induite par le glucose (**Al-azzawie et al. 2006**).

Matériel et méthodes

II. Matériel et Méthodes

II.1. Objectifs du travail

L'objectif de cette étude a été dédié à :

- ✓ Optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles d'olivier (*Olea europea L*) de deux variétés différentes par le biais de différentes techniques d'extractions (macération et sonication) en utilisant un seul solvant (Ethanol 70%).
- ✓ Détermination de la teneur totale en composés phénoliques et en flavonoïdes.
- ✓ Evaluation l'activité antioxydant par la méthode de réduction du radical libre DPPH et par la méthode du test FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).
- ✓ Comparaison entre les activités des extraits issus des deux variétés.

II.2. Lieu et durée du travail :

L'étude expérimentale de ce travail, a été menée au sein du laboratoire de recherche : Amélioration et de Valorisation des productions animales locales *Université Ibn Khaldoun-Tiaret*(LAVPAL). Durant la période allant du 5 janvier au 12 mars 2020.

II.3 Matériel et produits chimiques :

Le tableau ci-dessous regroupe le matériel et les produits chimiques requis pour l'exécution de ce travail :

Matériel et appareillage	Produits chimiques et réactifs
Agitateur magnétique (IKAMAG)	Acide gallique (C ₇ H ₆ O ₅ ; PM=170,12g/mol)
Balance analytique (OHAUS)	Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃ ;PM=106 g/mol)
Broyeur	Cloture de fer III (FeCl ₃ ; PM=162,2g/mol)
Etuve (OHAUS)	2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle (DPPH•),(C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆ ; PM= 394,32 g/mol)
Micropipettes	Ethanol pur
Sonicateur (BANDELIN)	Ferricyanure de potassium, K ₃ [Fe ₊₃ (CN) ₆] ; PM= 329,26 g/mol
Spectrophotomètre (OPTIZEN 1418V)	Quercétine (C ₁₅ H ₁₀ O ₇ ; PM=302,236 g/mol)
Tamis (0.5 mm)	Réactif de Folin-ciocalteau (PM=188,14g/mol, 2N)
Vortex (Techno KARTEL)	Trichlorure d'aluminium (AlCl ₃ ; PM=133,34g/mol)

Tableau N°03: Matériel et produits chimiques utilisés

II.4 Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé au cours de notre étude provient de deux régions différentes de la wilaya de Tiaret (ouest algérien) ; variété chemlal de la région de Ksar Chelala ; variété sigoise de la région de Rechaiga, les feuilles ont été récoltées en décembre 2019. Elles ont été soigneusement lavées, séchées, et broyées

II.5. Procédure expérimentale :

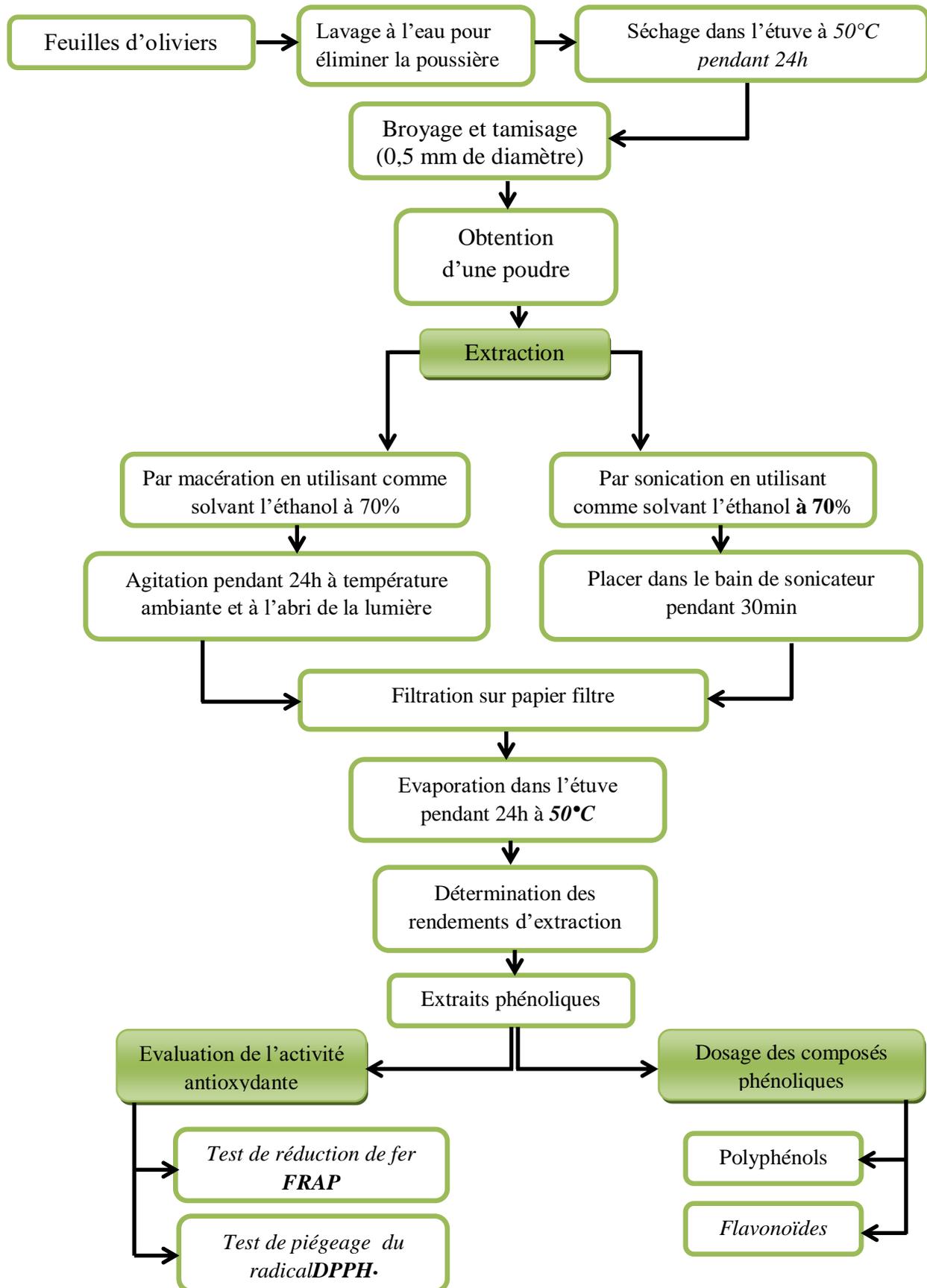


Figure N°02 : Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale

II.5.1 Préparation du matériel végétal :

Après la récolte, les feuilles des deux variétés d'*Olea europea L* ont été nettoyées à l'eau pour éliminer les poussières puis étalées et séchées avec du papier absorbant. Elles ont ensuite été mises dans l'étuve à 50°C. Les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un mortier puis tamisées dans un tamis (taille des particules 0,5 mm) deux poudres ont été obtenues par la suite à partir desquelles les extractions ont été réalisées.

II.5.2 Préparation des extraits :

Plusieurs méthodes d'extraction peuvent être utilisées pour obtenir des extraits de composés naturels. Dans notre étude nous avons choisi deux méthodes ; l'extraction par la macération et par la sonication, les deux techniques sont caractérisées par leur simplicité et leur facilité

II.5.2.1. Technique d'extraction par macération :

II.5.2.1.1. Principe

Le but de cette méthode est d'extraire les composés actifs d'un solide en le laissant séjourner dans un liquide. Pour cette raison, le solvant (son volume dépend de sa capacité d'absorption) doit traverser la barrière de l'interface solide/liquide, ensuite dissoudre le composé actif présent à l'intérieur et le conduire vers l'extérieur. L'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté se fait par dialyse ou par diffusion (**Lumbu et al. 2005**),

II.5.2.1.2. Mode opératoire

Selon la méthode décrite par **Boubakeur et al. (2017)**, en y apportant une légère Modification : pour optimiser un bon rendement d'extraction, l'éthanol 70% a été utilisé comme solvant.

10g de poudre ont été mis à macérer dans 100ml d'éthanol à 70%. Sous agitation magnétique à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24h. Le macérant résultant a été soumis à une filtration sur du papier-filtre, ensuite le filtrat a été séché dans l'étuve pendant 24h à 50°C. L'extrait sec obtenu au final a été conservé à une basse température (-20°C) pour les futures expérimentations.

II.5.2.2. Technique d'extraction par sonication :

II.5.2.2.1. Principe

Cette extraction est aussi appelée extraction assistée aux ultrasons, cette méthode est efficace, simple et peu coûteuse, elle a pour avantages d'augmenter le rendement et d'accélérer la cinétique, cependant son effet reste lié à la nature de la matrice végétale. Elle permet également d'utiliser une large gamme de solvants (Kiriamiti. 2003).

II.5.2.2.2. Mode opératoire

10g de matériel végétal broyé (poudre) ont été mélangés avec 100ml d'éthanol à 70% dans un flacon allant à l'appareil sonicateur. Ce dernier est déjà rempli de détergent, il est mis en marche pendant 30min. le produit résultant est soumis à une filtration sur du papier filtre. Le filtrat obtenu est séché dans l'étuve pendant 24h à 50°C afin d'obtenir un extrait sec qui sera ensuite conservé à une température de -20°C pour les prochaines expérimentations (Kiriamiti.2003).

II .5.3. Analyse quantitative des échantillons

II 5.3.1 Calcul des rendements d'extractions :

Le poids sec ou net de l'extrait final est calculé par la différence entre le poids de la boîte de Pétri contenant le filtrat et son poids à vide. Le rendement de l'extraction est calculé en pourcentage selon la formule suivante :

$$R\% = (P_{ext} / P_{éch}) \times 100$$

Avec :

R : Rendement en pourcentage (%)

P ext : Poids de l'extrait sec en g

P éch : Poids de la poudre mise à l'extraction en g

II 5.3.2. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols solubles dans les différents extraits est effectué par la méthode du **Folin-Ciocalteu**. (Singleton *et al.* 1999).

5.3.2. A. Principe :

Le principe de dosage des polyphénols totaux repose sur la réduction de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) du réactif de Folin-ciocalteu dans un milieu alcalin par les polyphénols en un mélange bleu d'oxyde de tungstène et de molybdène. l'intensité de la coloration bleu est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans l'échantillon et qui présente un maximum d'absorption à une longueur d'onde $\lambda = 760\text{nm}$.

5.3.2. B. Mode opératoire

500 μl de chaque extrait (à des concentrations croissantes variant de 0.125 à 0.5 mg/ml) sont mélangés avec 500 μl de réactif de **Folin-ciocalteu**, après incubation de 5min à l'abri de la lumière, 1,5 ml de Na_2CO_3 à 7,5 % ont été additionnés. Le mélange obtenu est mis en incubation encore une fois pendant 30min à température ambiante et à l'abri de la lumière également, les absorbances sont ainsi mesurées par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760nm contre un blanc qui contient les mêmes composants à l'exception de l'extrait testé qui a été remplacé par l'eau distillée.

Une courbe d'étalonnage linéaire a été réalisée en parallèle en utilisant l'acide gallique comme étalon, et qui a été soumis aux mêmes étapes expérimentales que les échantillons d'extraits des deux variétés de feuilles d'olivier.

Les teneurs en composés phénoliques ont été exprimées en mg EAG/ g du poids sec de l'extrait, toutes les mesures sont faites en triplicata, les résultats ont été obtenus selon la formule suivante :

$$C = (c \times D \times V) / m$$

Avec :

C : Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/ g d'extrait)

c : Concentration de l'échantillon calculée.

D : Facteur de dilution.

V : Volume du solvant en ml utilisé pour l'extraction

m : Masse de l'échantillon en g utilisée dans l'extraction

II 5.3.3. Dosage des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées ré pondues chez les végétaux, L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits d'*Olea europaea L* a été réalisée selon la méthode décrite par (Rezzaghi .2012) en y apportant de légères modifications

II 5.3.3.A. Principe :

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des flavonoïdes à se complexer avec le Trichlorure d'aluminium (AlCl₃).Il en résulte la formation de complexes jaunâtres avec les atomes, d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. Ces complexes présentent une absorption maximale à 430 nm.

II 5.3.3.B. Mode opératoire :

1ml de l'échantillon à différente concentration variant de 0.5 à 2 mg/ml a été mélangé avec 1 ml de chlorure d'aluminium. Le mélange a été incubé à température ambiante et l'obscurité pendant 30min. l'absorbance est lue à 430nm.

Une courbe d'étalonnage établie par la quercitine comme flavonoïde référent favorise la quantification des flavonoïdes. La teneur en ces composées exprimée en microgramme d'équivalent de Quercitine par gramme d'extrait de feuilles (mg EQ/g). Les résultats ont été obtenus selon l'équation suivante :

$$C = (c \times D \times V) / m$$

Avec :

C : Teneur en flavonoïdes exprimée en mg Equivalent quercétine par g d'extrait.

c: Concentration de l'échantillon calculée.

D : Facteur de dilution.

V : Volume de solvant en ml utilisé pour l'extraction

m: Masse de l'échantillon en g utilisé dans l'extraction

II 5.4. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits d'*Olea europaea* :

Dans la présente étude, l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits des feuilles d'*Olea europaea*. à été mise en évidence par deux techniques chimiques à savoir : le pouvoir réducteur et le test de DPPH•.

II 5.4.1. Test de réduction de fer FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) :

Le test de pouvoir réducteur du fer (Ferric reducing antioxidant power, FRAP) est un test simple, rapide et reproductible.

II 5.4.1.A. Principe

Ce test permet de mesurer le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans les extraits par leur capacité de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}) (**Oyaizu .1986**).

II 5.4.1.A. Mode opératoire :

500 μ l de chaque extrait à différentes concentrations (de 1 à 0.0625 mg/ml) ont été mélangés avec 500 μ l de tampon phosphate 0,2M (pH=6,6) et 500 μ l d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Les mélanges ont été incubés pendant 20min à 50°C. Ensuite, 500 μ l d'acide trichloracétique (TCA) à 10% ont été ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 300rpm pendant 10min. 1ml de surnageant a été récupéré et combiné avec 1 ml d'eau distillée et 500 μ l d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1%. Les absorbances sont mesurées à 700 nm contre un blanc préparé de la même manière, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée (**Amarowicz et al. 2004**).

Le contrôle positif est déterminé par deux solutions d'antioxydant référent : l'acide gallique, et l'acide ascorbique (vit C) dont les absorbances ont été mesurés dans les mêmes conditions que les échantillons. Si l'absorbance augmente cela correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés qui est exprimé par les valeurs de concentrations effectives à 50% (CE50) qui a été définie comme étant la quantité d'antioxydant nécessaire pour donner 0.5 à 700nm. La CE50 la plus faible correspond à l'activité la plus importante.

II 5.4.2. Evaluation de la capacité de piéger le radical libre DPPH• (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) :

5.4.2. A. Principe :

Le DPPH• (1,1 Diphényl 2 PycrilHydrazil) est un radical libre stable de couleur violette intense, généralement utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante (Blois.1958) ; (Brand *et al.*1995).

En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH• (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine(DPPH₂) de couleur jaune (figure N°03) Cette décoloration met en évidence le pouvoir antiradicalaire d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (Molyneux .2004).

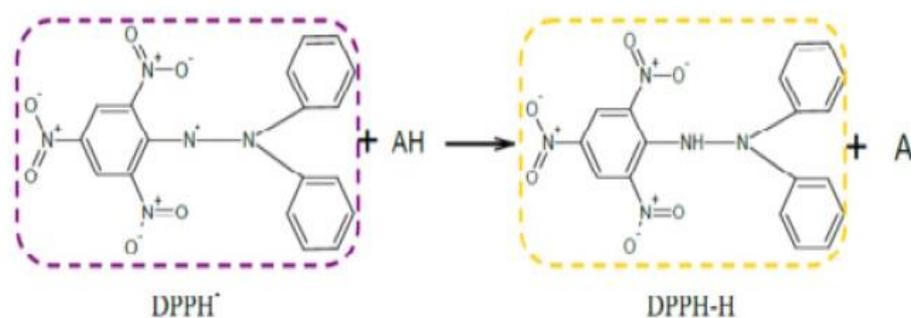


Figure N°03 Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire (DPPH•) et un antioxydant (AH)•

II 5.4.2.B. Mode opératoire :

L'effet anti-radicalaire de nos extraits sur le radical libre DPPH• a été mesuré par la méthode décrite par (Sanchez- Moreno *et al.* 1998).

Un volume de 750 µl des solutions de DPPH• à (4 mg/100ml) a été mélangé avec 750 µl des solutions d'extraits des feuilles d'olivier (de 1 à 0.015 mg/ml) et des antioxydants standards (acide gallique, et vitamine C) à différentes concentrations de (6.25 à 100µl/ml). Les mélanges ont été incubés pendant 50min à l'obscurité et à température ambiante.

L'absorbance a été lue à 517 nm. Les valeurs de CI50 ont été déterminées graphiquement par la régression exponentielle des extraits et des solutions standards (**Voir Annexe IV.2**)

CI50 est définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50 d'effet piègeur du radical DPPH. La valeur de CI50 la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Rendements d'extraction

Les rendements des extractions des composés phénoliques de deux variétés des feuilles d'olivier (sigoise,chemlal) obtenus par les deux méthodes d'extraction (macération , sonication) sont représentés dans la **figure N°04** ils sont exprimé en pourcentage massique (%).

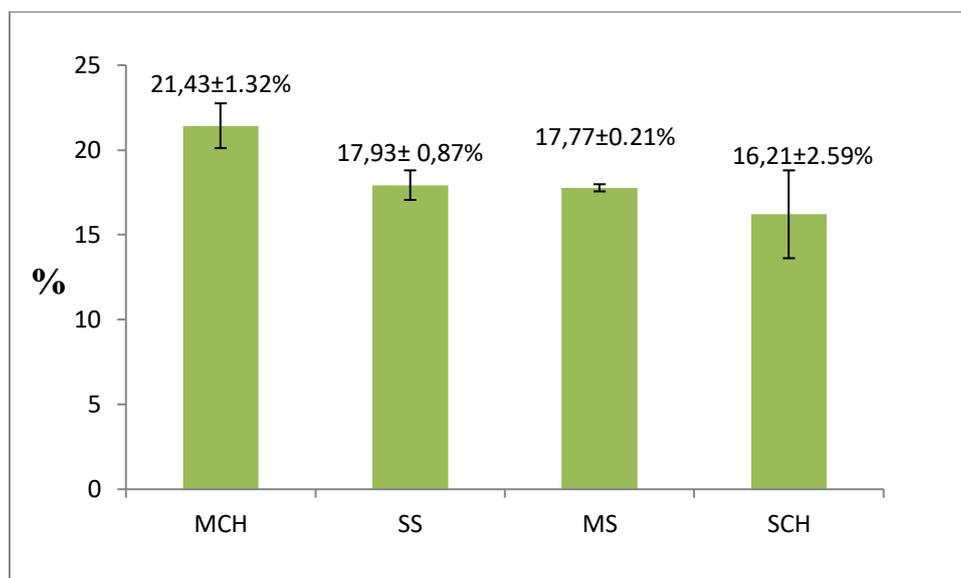


Figure N°04: Rendements de l'extraction des composés phénoliques des feuilles d'olivier

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± écarte type de trois essais indépendants)

Le calcul des rendements par rapport au poids total de broyat (10g de matière végétale en poudre utilisés pour l'extraction) montre qu'ils varient entre 16,21% et 21,43 %. On constate que l'extrait issu de la variété chemlal par la méthode de macération présente le meilleur rendement avec une valeur de 21,43% suivi par celui de l'extrait de la variété sigoise ,obtenu par la méthode de sonication, avec un rendement évalué à 17,93%, ce dernier est presque similaire à celui de l'extraction par macération, des composés phénoliques, de la variété sigoise avec une valeur de 17,51%. Cependant l'extraction des composés phénoliques par sonication de la variété chemlal dévoile le plus faible rendement, évalué à 16,21%, en comparaison avec les autres rendements d'extraction cités précédemment. Le rendement d'extraction par la technique de macération en composés phénoliques issu de la variété chemlal, (21,43%), est similaire à celui de **(Benlegha et son équipe.2019)**, ces auteurs

présentent un rendement de 20,84 % pour l'extrait aqueux des feuilles d'*Olea europea*. D'autre part le rendement d'extraction des composés phénoliques par la méthode de sonication, issus de la variété chemlal constaté au cours de notre étude corrobore celui présenté par Madani et son équipe, on note 16,21 % *versus* 16,04%. Ce rendement concerne aussi l'extrait phénolique aqueux des feuilles d'*Olea europea L* (Madani.2017) et Ourak et al.(2019) indiquent que le rendement de l'extrait phénolique des feuilles d'*Olea europea* de la région de Biskra, obtenu par la technique de macération, est de l'ordre de 20,84%, ce dernier est quasi identique à celui obtenu au cours de notre expérimentation lors de l'extraction par macération des composés phénoliques des feuilles d'olivier de la variété chemlal, celui-ci est évalué à 21.43 %.

III.2. Quantification des composés phénoliques :

L'analyse quantitative des teneurs en composés phénoliques des extraits issus des feuilles d'olivier (chemlal et sigoise) sont déterminées graphiquement à partir des équations de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg EAG/g d'extrait. Les résultats obtenus de cette analyse sont illustrés dans la figure suivante :

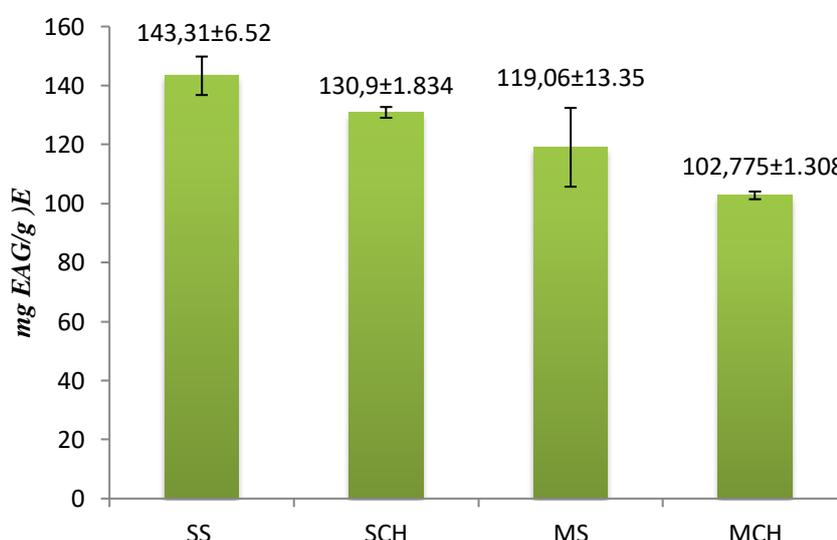


Figure N°05: Teneur en composés phénoliques totaux des extraits des feuilles d'olivier

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± écart type de trois essais indépendants)

Ils indiquent que les teneurs en polyphénols pour les quatre extraits étudiés s'oscillent entre 143,31 et 102,775 mg EAG/g d'extrait. On constate que les extraits issus de la technique

de sonication sont plus riches en polyphénols que ceux obtenus par la méthode de macération, ceci peut être expliqué par le fait que la sonication permet la perturbation de l'intégrité des membranes cellulaires et donc la libération du contenu cellulaire dont les polyphénols. (**Jessie Wong,2017**).

De ces résultats il ressort que la teneur la plus élevée en polyphénol est obtenue pour l'extrait issu de la variété sigoise, obtenu par la méthode de sonication avec une valeur de $143,31 \pm 1,834$ mg EAG/g d'extrait, cependant le taux le plus faible a été enregistré pour l'extrait de la variété chemlal issu par la technique de macération celle-ci est évaluée à $102,775 \pm 13,35$ mg EAG/g d'extrait. Ces résultats vont de pair avec ceux présentés par (**Benmamar et ses collaborateurs. 2015**), ces derniers évoquent un taux en composés phénoliques extrait des feuilles de la variété chemlal de l'ordre de $104,7$ mg/EAG/g d'extrait. En revanche la teneur en polyphénols de nos extraits est inférieure à celle obtenue par (**Zeriouh et al. 2018**), l'étude de ces auteurs est basée sur le dosage des composés phénoliques totaux de l'extrait de la variété Zebbouj, ils rapportent un taux de $220 \pm 3,50$ mg /EAG/g d'extrait. De même La teneur en polyphénols de notre extrait issu de la variété sigoise, obtenu par macération, est de $119,06$ mg EAG/g d'extrait. Cette dernière est presque similaire à celles obtenues par d'autres études, qui rapportent les teneurs en polyphénols suivantes $124,90$ mg EAG/g, et $123,91$ mg EAG/g d'extrait respectivement, ces teneurs concernent les extraits aqueux des feuilles d'*Olea europea L* (**Madani .2017** et **Benelgha. 2019**)

Toutefois, il reste difficile d'effectuer une large comparaison entre les rendements les teneurs en composés phénoliques obtenus et ceux de la littératures, les divergences constatées entre nos résultats et ceux de la littératures peuvent être tributaires de certains facteurs susceptibles d'influencer de manière significative l'estimation du rendement d'extraction, les teneurs et le type des composés phénoliques totaux, ces derniers sont dépendants de la méthode, du solvant, des conditions expérimentales dans lesquelles l'extraction a été effectuée et d'un certain nombre de facteurs intrinsèques(génétique) et extrinsèques (la situation géographique, l'âge de la plantation, les conditions climatiques, la période de récolte des feuilles , et les conditions de stockage (**Felhi et al. 2017**))

III.3. 3.Teneur en flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits issus des deux variétés des feuilles d'olivier (Chemlal, Sigoise) sont présentées dans la figure suivante :

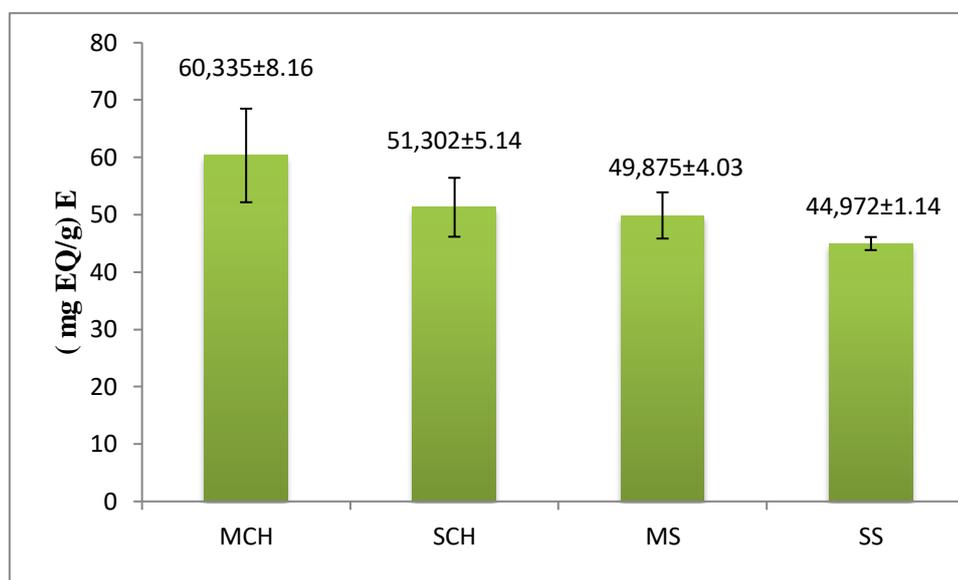


Figure N°06: Teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles d'olivier

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± écart type de trois essais indépendants)

Les résultats obtenus montrent que les teneurs en flavonoïdes des quatre extraits varient entre 60,335 mg EQ/g et 44,972 mg EQ/g d'extrait. On remarque que les extraits issus de la méthode d'extraction par macération sont plus riches en flavonoïdes par rapport aux extraits issus de la méthode de sonication, ceci peut être dû au fait que la méthode d'extraction par macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser la durée de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio activité des constituants (**Djahra. 2013**). On constate aussi que l'extrait de la variété chemlal issu de la méthode de macération présente la teneur en flavonoïdes la plus élevée (60,335 ± 8,16 mg EQ/g) d'extrait, alors que la teneur en flavonoïdes la plus faible a été enregistrée pour l'extrait issu de la variété sigoise et obtenu par sonication 44,972 ± 1,14 mg EQ/g d'extrait. Les concentrations en flavonoïdes obtenus au cours de notre étude sont quasi-identiques à celle décrite par (**Benlegha.2019**). Ces auteurs montrent que la teneur en flavonoïdes des extraits aqueux des feuilles d'*Olea europea* est de l'ordre de 59 ± 0,005 mg EQ/g d'extrait. Cette teneur est plus proche à celle obtenue par l'extrait issu de la variété chemlal lors de l'extraction par la méthode de macération (60,335 ± 8,16 mg EQ/g d'extrait). Une étude évalue la teneur en flavonoïdes de la feuille d'*Olea europea* à 98,75 ± 0,017 mg EC/g d'extrait (**Madani et. al**

2017). Cette teneur est largement supérieure à celle constatée au cours de cette présente étude ($60,335 \pm 8,16$ mg EQ/g d'extrait).

2-Evaluation de l'activité antioxydante

2-1. Pouvoir réducteur des extraits des feuilles d'olivier

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits issus des feuilles d'olivier et des antioxydants standards (acide gallique, vitamine C) sont illustrés dans **la figure** ci -dessous. Ils sont exprimés en concentration effective à 50% (CE50)

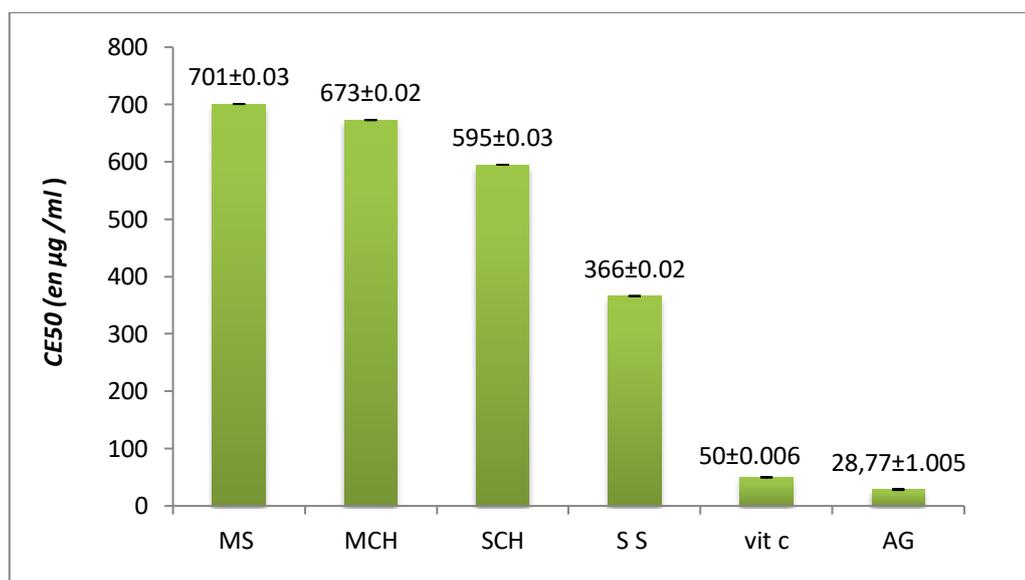


Figure N°07: pouvoir réducteur des extraits des feuilles d'olivier exprimé en CE50

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm écarte type de deux essais indépendants)

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits des feuilles d'olivier évaluée par le test de potentiel réducteur (FRAP) révèlent que ces extraits possèdent un pouvoir réducteur puissant avec des CE50 qui varient entre $366 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{ml}$ et $701 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{ml}$. Ce pouvoir est largement inférieur à ceux des antioxydants standards à savoir la vitamine C et l'acide gallique qui représentent des CE50 de $50 \pm 0,006 \mu\text{g}/\text{ml}$ et de $28,077 \pm 1.005 \mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement. On constate que l'extrait de la variété sigoise issu de la méthode de sonication présente le pouvoir réducteur le plus important avec une CE50 d'ordre de $366 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{ml}$ ceci peut être attribué à sa forte teneur en polyphénols ($43,31 \pm 1,149$ mg EAG/g d'extrait), en comparaison avec les autres extraits. Alors que l'extrait de la variété sigoise issu de la méthode de macération présente le plus faible pouvoir réducteur ce qui est cohérent avec sa

faible teneur en polyphénols et flavonoïdes ainsi que la qualité et le type de ses composés bioactifs.

Le pouvoir réducteur des extraits phénoliques des feuilles d'olivier a été décrit par plusieurs études dont on peut citer celle de (Chelabi .2019). Dans cette étude les CE50 concernant la capacité réductrice de deux extraits éthanoliques issus des feuilles d'olivier, est évaluée à 63,76 milligramme équivalence acide ascorbique /g et à 60,88 mg EQAA/g de Matière Sèche. L'investigation réalisée par (Bouabdallah. 2014) démontre que les extraits des feuilles d'*Olea europea sylvestris* sont caractérisés par un pouvoir réducteur important et que l'extrait hydro-méthanolique présente la capacité réductrice la plus élevée en comparaison avec les extraits hydro-acétonique et aqueux. Ce résultat est en accord avec les travaux de (Hayes et ses collaborateurs.2011), ils démontrent que l'extrait hydro-méthanolique des feuilles d'olivier présente une activité antioxydante élevée appréciée par la méthode de *Ferric Reducing Antioxydant Power Assay* (FRAP). Aussi les résultats de (Bensalah et al.2012) révèlent que l'extrait éthanolique issu des feuilles de variété chemlali présente une forte activité pour la réduction du fer en comparaison avec des extraits issus des feuilles des variétés **Gerboua** et **Séville**. Le pouvoir réducteur des extraits de l'espèce *Olea europea* serait probablement tributaire à la présence des groupements hydroxyles dans leurs composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron (Bougandoura et Bendimerad .2012). La présence des réducteurs dans les extraits phénoliques des feuilles d'olivier provoque la conversion du complexe Fe^{3+} ferricyanure à la forme ferreuse Fe^{2+} . Bien que le fer soit essentiel pour le transport d'oxygène et l'activité des enzymes, il s'agit d'un métal réactif qui catalyse des dommages oxydatifs au niveau cellulaire (Bourgou et al. 2008).

III.2.2. Le pouvoir piégeur du radical libre DPPH

La capacité de piéger le radical libre DPPH des différents extraits des feuilles d'olivier, issus par les deux techniques d'extraction (macération et sonication) a été évaluée dans les mêmes conditions que celles des antioxydants standards (acide gallique et la vitamine C). Les résultats obtenus, exprimés en concentration inhibitrice à 50% (CI50), sont représentés dans la figure N°08 :

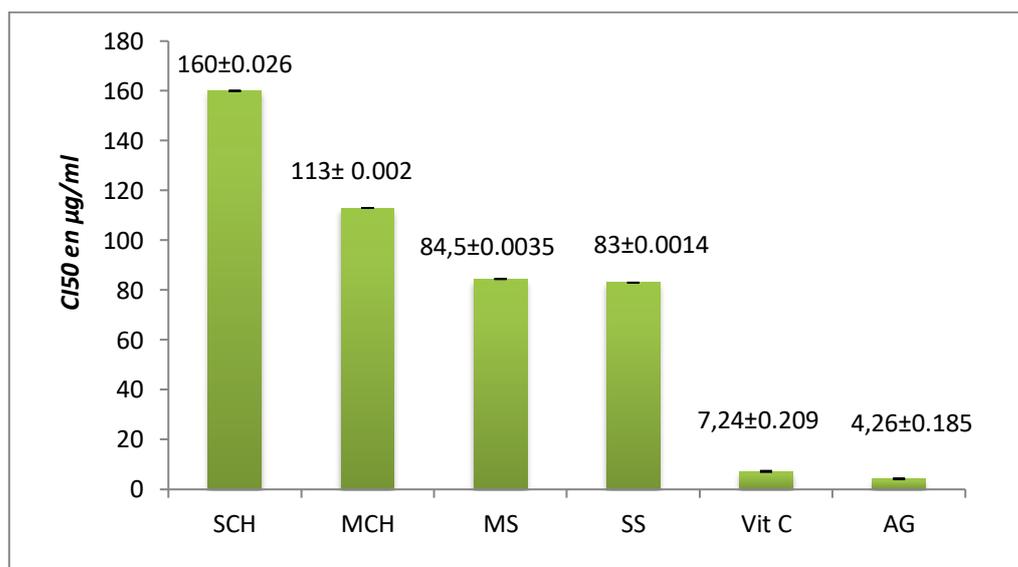


Figure N°08 : Capacité de piégée du radicale libre des extraits des feuilles d'olivier et les antioxydants standards exprimée en CI50

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± écart type de deux essais indépendants)

Ces résultats indiquent que les substances antioxydantes standards, l'acide gallique et la vitamine C ont démontré une activité anti radicalaire puissante avec des CI50 de l'ordre de $4,26 \pm 0,185 \mu\text{g/ml}$ et de $7,24 \pm 0,209 \mu\text{g/ml}$ respectivement *versus* celles des extraits des feuilles d'olivier de deux variétés. Les CI50 varient entre $83 \pm 0,0014 \mu\text{g/ml}$ et $160 \pm 0,026 \mu\text{g/ml}$. L'extrait de la variété sigoise issu de la méthode de sonication enregistre l'activité antioxydante la plus importante avec une CI50 de l'ordre de $83 \pm 0,0014 \mu\text{g/ml}$, ceci peut être expliqué par sa teneur élevée en polyphénols, comme décrit précédemment, avec des teneurs évaluées à $143,31 \pm 1,149 \text{ mg EAG/g}$ d'extrait et ce en comparaison avec les autres extraits étudiés. L'extrait de la variété chemlal issu de la méthode de sonication présente l'activité antioxydante la plus faible avec une CI50 évaluée à $160 \pm 0,026 \mu\text{g/ml}$ ceci peut être attribué à la nature des composés bioactifs présents dans cet extrait. Ces résultats indiquent que nos

extraits présentent une activité anti radicalaire largement supérieure à celle enregistrée par **Himour ,(2018)** qui ont démontré que les extraits méthanoliques des feuilles d'olivier de variété sigoise et chemlal obtenus par sonication présentent une activité antioxydante, évaluée via le test de DPPH, avec des CI50 de l'ordre 0,189 g/ml \pm 0,05 et de 0,2077 \pm 0,061 g/ml respectivement, cette différence dans les CI50 peut être liée à la nature du solvant utilisé lors de l'extraction. Aussi nos CI50 sont supérieurs à celles apportées par (**Madani, 2017**) et **Benlghaa et al. (2019)** ces derniers enregistrent les CI50, suivants : 2907 μ g/ml et 189.2 μ g /ml ce qui confirme l'activité antiradicalaire importante de nos extraits. Cependant les résultats de test DPPH de notre étude sont inférieurs à ceux obtenus par (**Bensallah et al. 2012**) qui ont estimé une CI50 de 7,90 μ g/ml et ce pour l' extrait méthanolique des feuilles d' olivier de la variété chemlali cultivée en Tunisie. L'activité antioxydante de chaque extrait analysé et en relation avec la nature et la puissance de ses polyphénols. Généralement l'activité anti-radicalaire dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels (**Hayes et al.2011**).Les composés phénoliques hydroxylés de l'extrait des feuilles d'olivier possèdent une activité antioxydante qui peut être due à la présence des groupements hydroxyles dans leur structure telle que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol (**Benavente et al. 2000**).Le piégeage des radicaux libres, qui sont impliqués dans de nombreuses maladies, est déterminé essentiellement par la structure des composés phénoliques et leur capacité de chélater les métaux de transition (le Fer et le cuivre), impliqués dans la production des radicaux libres .L' effet antioxydant de ces phyto-nutriments s' exerce aussi par la neutralisation d' enzymes oxydantes (**Halliwell. 1994 ; Cotelle. 2001**). La différence du statut phénolique (la constitution et la nature des composés phénoliques) entre les extraits des deux variétés de feuilles d'olive, elle-même dépendante de la variabilité de certains paramètres physicochimiques arrêtés dans chaque expérimentation, est un facteur qui joue un rôle crucial dans l'influence de l'activité biologique de l'extrait en l'occurrence l'activité antioxydante (**Macheix et al. 2005 ; Paulucci et al. 2013**). Ceci peut réduire la fiabilité et rend difficile la comparaison entre notre étude et les études antérieures.

CONCLUSION

Les pays méditerranéens, possèdent un patrimoine oléicole très important. En Algérie, et l'instar de ces pays, la culture et l'industrie oléicole engendrent des quantités énormes de feuilles d'olivier généralement sous-exploitées. Des études scientifiques montrent des valeurs ajoutées importantes des feuilles d'olivier, dont principalement leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine. Notre étude a été consacrée à l'extraction des composés phénoliques des feuilles de deux variétés d'*Olea europaea* L (Chemlal et Sigoise) en utilisant deux méthodes (la macération et la sonication) dans le but d'évaluer *in vitro* leur activité antioxydante. Les résultats obtenus montrent que les feuilles d'olivier sont riches en polyphénols avec des rendements qui varient entre 16,21% et 21,43 %. L'extrait issu de la variété chemlal, obtenu par la méthode de macération et en utilisant de l'éthanol comme solvant d'extraction, présente le meilleur rendement avec une valeur de l'ordre de 21,43%. Les analyses quantitatives des extraits, issus des deux variétés, ont montré des teneurs importantes en polyphénols et en flavonoïdes. Il s'est révélé que l'extrait issu de la variété sigoise obtenu par la méthode de sonication est le plus riche en polyphénols, on note $143,31 \pm 6,52$ mg EAG/g d'extrait suivi par l'extrait de la variété chemlal obtenu via la méthode de sonication et l'extrait de la variété sigoise issu de la macération ces derniers présentent les valeurs suivantes : $130,9 \pm 1,834$ mg EAG/g d'extrait $119,06 \pm 13,3$ mg EAG/g d'extrait respectivement. Alors que le taux le plus faible ($102,775 \pm 13,35$ mg EAG/g d'extrait) a été enregistré pour l'extrait de la variété chemlal issu de la technique de macération. Il en va de même pour les résultats du dosage des flavonoïdes, ils indiquent que les quatre extraits éthanoliques des feuilles d'*Olea europaea* possèdent des teneurs en flavonoïdes qui varient entre $44,972$ mg EQ/g et $60,335$ mg EQ/g d'extrait. L'extrait de la variété chemlal issu de la méthode de macération présente la meilleure teneur ($60,335$ mg EQ/g). L'évaluation de l'activité antioxydante, estimée par la méthode du pouvoir réducteur (FRAP), indique que l'extrait de la variété sigoise issu de la méthode de sonication présente la meilleure capacité réductrice du fer avec une valeur de CE50 évaluée à 366 µg /ml. Le pouvoir réducteur le plus faible est enregistré pour l'extrait issu de la variété sigoise et obtenu par la méthode de macération (CE50= 701 µg /ml). Ce pouvoir réducteur des extraits étudiés reste inférieur à ceux des antioxydants standards, l'acide gallique et la vitamine C, qui présentent des CE 50 de l'ordre de 50 µg /ml et 28.0865 µg /ml respectivement. Les résultats de l'activité antioxydante évaluée par le test de piégeage du radical libre DPPH• montrent que les extraits étudiés présentent une capacité anti radicalaire importante. L'extrait de la variété sigoise issu de la méthode de sonication est le plus actif en terme d'activité antiradicalaire avec une CI50 déterminée à 83 µg /ml, alors que l'extrait de la variété chemlal obtenu par la

méthode de sonication présente la capacité de piégeage radicalaire la plus faible, ceci a été constaté avec une CI50 de 160 µg /ml. Si bien que les antioxydant standards, l'acide gallique et la vitamine C, présentent toujours une forte capacité de piégeage du radical DPPH[•], avec des CI50 de 4,26 µg /ml et de 7,24 µg /ml respectivement, par rapport à nos extraits. L'ensemble des résultats obtenus dans notre étude montre la richesse des extraits des feuilles d'*Olea europea* en substances bioactives qui présentent une activité antioxydante importante ce qui laisse envisageable leur l'utilisation comme source potentielle d'antioxydants naturels et qui peuvent être utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique. Pour renforcer l'idée de l'exploitation de ces extraits et dans la continuité de ce présent travail les perspectives suivantes peuvent être envisagées :

- Une optimisation de la méthode d'extraction en utilisant d'autres types de solvants;
- Un isolement et une identification des molécules bioactives responsables de l'activité antioxydante par des techniques chromatographiques et spectrales ;
- Une évaluation d'autres activités biologiques comme : antimicrobienne ; antidiabétique ; anti-inflammatoire..... etc
- Une réalisation des études *in vivo* afin de déterminer le mécanisme d'action au niveau cellulaire et moléculaire impliqué dans la prévention des pathologies à stress oxydatif, telles que les maladies cardiovasculaires.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aires A., Marques E., Carvalho R., Rosa E.A. S. & Saavedra M. J. (2013). Evaluation baby-leaf salads as antioxidants and antimicrobials against important human pathogenic bacteria. *Molécules*, 18: 4651- of biological value and appraisal of polyphenols and glucose inolates from organic

Aouidi, F. (2012).Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molécules*, Etude de la valorisation des feuilles d'Olivier *Olea Europaea* dans L'industrie Agro-Alimentaire. Thèse e doctorat, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (Tunisie) ; vol(12) ; pp. 1153-1162

AL-AZZAWIE. H., ALHAMDANI. M. (2006): Antihypertensive and antyoxydant activity for triterpenoids isolated from *Olea europea* L. leaves. *Biological and pharmaceutical bulletin*. **23 (11)**, 1307-1313

Altok, E.(2010). Recovery of phytochemicals (having antimicrobial and antioxidant characteristics) from local plants

Amarowicz ,R., Troszyńska,A., Barylko-Pikielna, N. et Shahidi ,F.(2004). Extracts of polyphenolicsfrom legume seeds – correlation between their total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids*, 11: 278–286.
antioxydantedes différents extraits des graines des peganumharmalaL.Thèse

B

Basım E., Basım H., Abdulai M., Baki D., Oztürk N. (2017). Identification and characterization of *Alternaria alternata* causing leaf spot of olive tree (*Olea europaea*) in Turkey. *Crop Protection*. (92) : 79-88.

Belhoucine S., (2003) :Etude de l'éventualité d'un contrôle biologique contre la mouche de l'olivier dabs cinq stations de la wilaya de Tlemcen. Thèse de magister, Univ. Tlemcen P-4

Ben Salah Myriam, Abdelmelek Hafedh 1 and Abderraba Manef. . Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia. *Medicinal chemistry*, **2012**; 2-5.

Benlagha ., R(2019): Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux obtenus par trois méthodes d'extractions à partir des feuilles d'*Olea europaea*, Mémoire de Master Université Mohamed Khider –BISKRA p 21-28

Benmamar S.,Tirane N. (2015) :Enrichissement de l'huile de soja raffinée avec des extraits phénoliques issus de feuilles d'olivier sauvage et cultivé, Mémoire de Master Université A. Mira- BEDJAIA P-30

Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L.

Blois M.S., (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181, p 1199-1200

Bouabdallah ., A(2014): Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europea sylvestris*) ,Mémoire de Master Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen

Boubakeur H.,Rebbas., K.,Belhattab R.2017.Activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysumstoechas*(L.)Moench.Phytothérapie :pp.1-11.

Boudhrioua, N., Bahloul,N., Ben Slimen, I., Kechaou, N. 2009. Comparison on the total phenol contentsand the color of fresh and infrared dried oliveleaves. *industrial crops and products*, Vol 29, p 412– 419.

Bougandoura,N., Bendimerad,N. 2012 .antifungal activity of aqueuous and methanol extracts of satureja calamin thassp.(*Nepeta*) briq. *Revue des bio ressources*, 2(1), 7-7.

Boukhari., 2014 : Contribution a l'analyse génétique et caractérisation de quelque variétés d'olivier et l'influence de l'environnement sur leur rendement au niveaux de la wilaya de Tizi Ouzo, Mémoire de Magister Université Abou Beker elkaid – TLEMEN P-9

Bourgou Soumaya, Ksouri Riadh, Bellila Amor, Skandrani Ines, Falleh Hanen,Marzouk Brahim. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots.*C. R. Biologies*, (2008); 48-55

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), p25-30

Brikci N., 1993 - Efficacité d'un traitement insecticide optimise sur le ravageur de l'olive *Dacus oleae* dans la région de Tlemcen. Mémoire D.E.S biologie, Univ. Tlemcen, 93 p.

Bruenten J ., 2009 pharmacognosie, phytochimie, planta médicinales 4iem édition Lavoisier pp 717-719

C

Chelabi A., (2019) : Composition phénoliques et activité antioxydant d'extraits des feuille d'olives, Mémoire de Master Université Akli Mohand Oulhadj –BOUIRA P- 29

D

DJAHRA Ali Boutlelis 2013 : Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L, , Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar -ANNABA P-16

De la Puerta R., Guttierrez VR., Hoult JRS (2001). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol.*; 57: 445–449.

F

Felhi S., Daoud A., Hajlaoui H., Mnafgui K., Gharsallah N., Kadri A., (2017). Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial activities and functional group analysis of *Ecballium elaterium* seeds and peels fruits. *Food Science and Technology*, 37(3), p.483-492

G

Garcia.M .,D.Ruiz Y .,Moumen ,A .,Alcaide ,M 2006 effect of polyethylene glycol ,urea and sunflower meal on olive (*olea europea* var ,*europea*) leaf fermentations in continuous fermontors .*Small Ruminant Research* ,vol 61 pp 53-61

Ghedira, K. (2008). -L'olivier. *Phytothérapie*, 6: 83-89.

H

Halliwell B. 1994 .Freeradicals and antioxidants. Nutr.Rev. 52. p 253-265

Hayes J.E., Allen P, Brunton N., O’Grady M.N., Kerry J.P (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. Food Chemistry 126(3) 948-955.

Himour ., S (2018): Comportements biologique, physiologique, biochimique et l’activité biologique de quatre variétés d’olivier (*Olea europaea* L.) dans l’Est Algérien, Thèse de Doctorat Université des Frères Mentouri Constantine1 P- 110

J

Jean-Marie. ,2010.Arbre et arbuste de Méditerranée : dictionnaire 3eme édition .France.p 112.

Jessie wong2017 : <https://www.bjultrasonic.com/fr/how-does-sonication>

K

Kiriamiti, K.H. (2003). Extraction de pyrèthrine par CO₂ liquide et supercritique, PhDThesis, INP Toulouse.

L

Lalas .Athansiadis V.Gorttizi O ;Bountsi M Giovanoudis ;Tsaking G;Bougiatzis F 2011 Enrichment of table olive with polyphenol extract from olive leaves. Food chemistry 127; 1521-1525)

Larousse.,(2001):encyclopédie des plantes médicinales : identification ou préparation soins. Ed Larousse .Londres

Lumbu S., Kahumba B., Kahambwe T., Mbayo T., Kalonda M., Mwamba M., Penge O., (2005). Contribution à l'étude de quelques plantes médicinales anti diarrhéiques en usage dans la ville de Lubumbashi et ses environs. *Annales de Pharmacie*, 3 (1), p 75-86.

M

Macheix J-J., Fleuriot A., Jay-Allemand C., (2005). Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique Edition : presses polytechniques et universitaires romandes

Madani ., M (2017) : Dosage des polyphénols et recherche d'activité anti-radicalaire de feuilles d'olives, Mémoire de Master Université de TLEMCEN p 28-32

Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004, 26, 211–219.

N

Nefzaoui A., 1995. Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course. Syria 12-23 March

O

Ourak A., Benbrahim S. (2019) Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux obtenus par trois méthodes d'extraction à partir des feuilles d'*Olea europea.L.* Mémoire de Master Université Mohamed Khider – BISKRA P-16-17

Oyaizu M., (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, p307–315.

P

Paulucci V. P., Couto R. O., Teixeira C. C. C., Freitas L. A. P., (2013). Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(1), p 94–100

R

Rezzaghi A.2012. Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut et de l'activité antioxydante des différents extraits des graines des *peganumharmala L.* Thèse de Magistère, Biochimie et Physiologie Expérimentale. Université Farhat Abbas.Sétif. p 78

S

Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A., Saura-Calixto F., (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (2), p 270-276

Singleton V., Orthofer R., Lamuela- Raventos R., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteau reagent. *Method of enzymologie*, 299, p152-178.

Sudjana A N., D'Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., et al. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 461e463

T

Tani C.K., Le Bourgeois T. & Munoz F. (2010). Aspects floristiques des adventices du domaine phytogéographique oranais (Nord-Ouest algérien) et persistance d'espèces rares et endémiques. *Fl. Medit.* 20: 29-46



Z

Zerouh ., W (2018) :Etude des propriétés antioxydants de l'extrait de la feuille d'oléastre et son effet sur des cellules cancéreuses, Thèse de Doctorat Université Abou Beker Elkaid – TLEMCEM P 71-72

ANNEXES

Annexe

Annexe 1 : Description botanique et classification de *Olea europea*

1. Description botanique

L'olivier (*Olea europea* L) est une variété domestique ou sauvage qui appartient à la famille des oléacées (bruenton2009). D'après Brikci (1993), l'olivier est toujours vert, ses dimensions et ses formes varient avec les conditions climatiques, les variétés et la fertilité du sol, mais si on le laisse végéter seul il prend couramment une forme pyramidale. Il peut atteindre 12 à 15 mètres de hauteur et son tronc se maintient le plus souvent élancé de bas en haut, il s'élargi à la base, et prend une teinte gris foncé, presque noire. L'écorce de cette plante est très mince, percevant le moindre choc mécanique et sous le coup se déchire facilement. L'épiderme devient épais, rude, crevassé et se détache en plaques. Les feuilles d'olivier sont lancéolées, courtement pétiolées, persistantes, lisses, coriaces, vert cendré au-dessus et suivant la variété, plus ou moins blanches. Elles brûlent très bien même vertes (Belhoucine 2003). Les Fleurs sont petites, blanches, en petits grappes odorantes a l'aisselle des feuilles, le Fruit (olive) est vert, violacé, ou noir à la maturité, de tailles et de formes variables suivant les variétés (Jean-Marie.2010)

2- Classe botanique de l'olivier :

L'olivier est classé dans la famille des oléacées, le genre est appelé *Olea* et comporte 30 différentes espèces réparties sur la surface du globe. L'espèce qui est cultivée dans le bassin méditerranéen est l'*Olea europea*. la classification botanique de l'arbre de l'olivier Selon Ghedira, (2008) et Basim *et al*, (2017) est la suivante



Règne :	<i>plantae</i>
Embranchement :	<i>Magnoliophyta</i>
Sous embranchement :	<i>Magnoliophytina</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida.</i>
Sous classe :	<i>Dialypétales</i>
Ordre :	<i>Lamiales</i>
Famille :	<i>Oleaceae</i>
Genre :	<i>Olea.</i>
Espèce :	<i>Olea europaea L.</i>

Annexe

Annexe II. Résultats numériques

Extrait	Rendement %
MCh	21.43±1.32
SS	17.93±0.87
MS	17.51±0.21
SCh	16.21 ±2.59

Tableau N°01 : Rendement d'extraction des feuilles d'Olea europea par les deux techniques

Extraits	Teneur en polyphénols totaux (mgEAG /g)	teneur en flavonoïdes (mg EQ/g)
MCH	102,775±1.308	60,335±8.16
SS	143,31±6.52	44,972±1.149
MS	119,06±13.35	49,875±4.03
SCH	130,9±1.834	51,302±5.14

Tableau N°02: Teneur en composés phénoliques et de flavonoïdes des extraits feuilles d'Olea europea

Extraits	Test de FRAP CE ₅₀ (µg/ml)	Test de DPPH· CI ₅₀ (µg/ml)
MS	701±0.03	84.5± 0.0035
MCH	673±0.02	113±0.002
SCH	595±0.03	160±0.026
SS	366±0.02	83±0.0014

Tableau N°03: Activité antioxydante des extraits des feuilles d'Olea europea

Standard	CE ₅₀ (µg/ml)	CI ₅₀ (µg/ml)
Vit C	50±0.065	7.24±0.209
Acide gallique	28.77±1.005	4.26±0.185

Tableau N°04 : Activité antioxydante des standards

$$CE_{50} = 0.5 + (-) b / a$$

$$CI_{50} = 0.68767472 / \text{valeur absolu de l'exponentielle}$$

Annexe III Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques

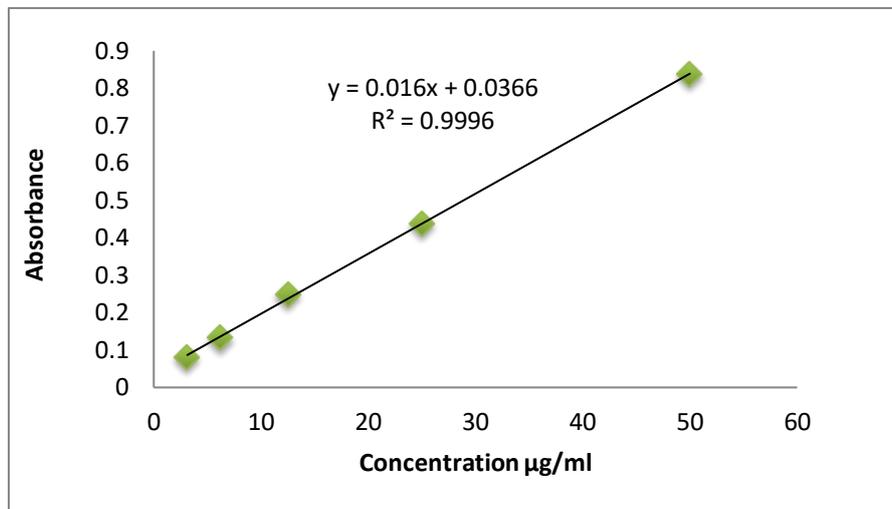


Figure N°01: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

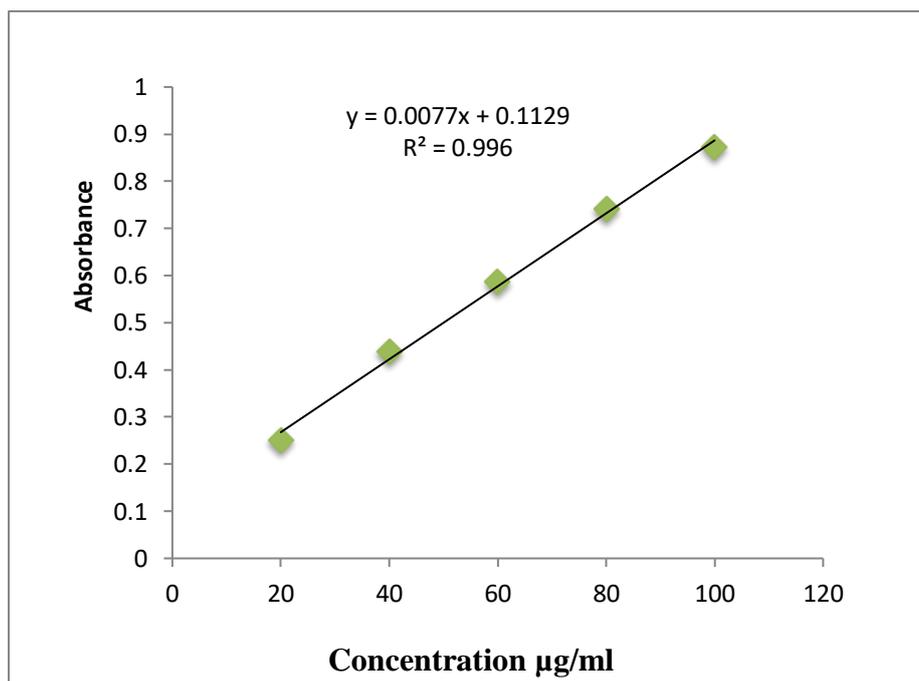


Figure N°02: Courbe d'étalonnage de la quercétine

Annexe IV Courbes d'étalonnage pour l'évaluation de l'activité antioxydante

1. Courbes de régression linéaire utilisées dans l'évaluation de la CE₅₀ par la méthode FRAP

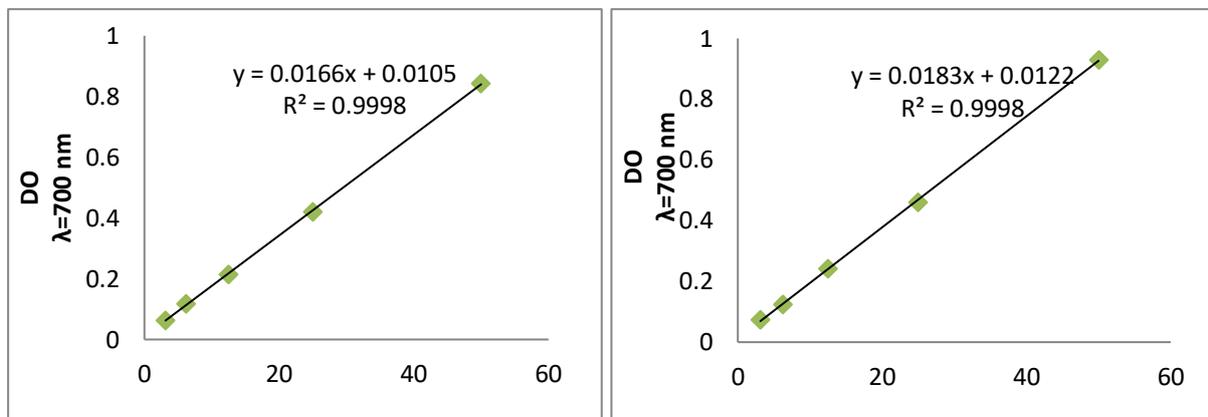


Figure N03°: le pouvoir réducteur de la CE₅₀ de l'acide gallique.

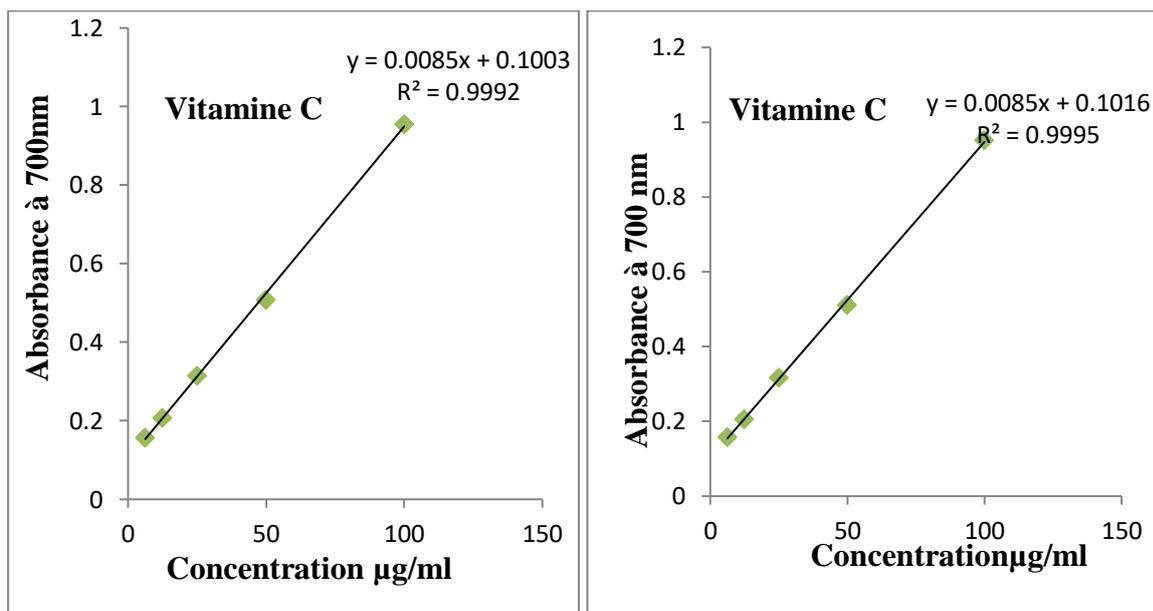


Figure N°04 : Le pouvoir réducteur de la vitamine C

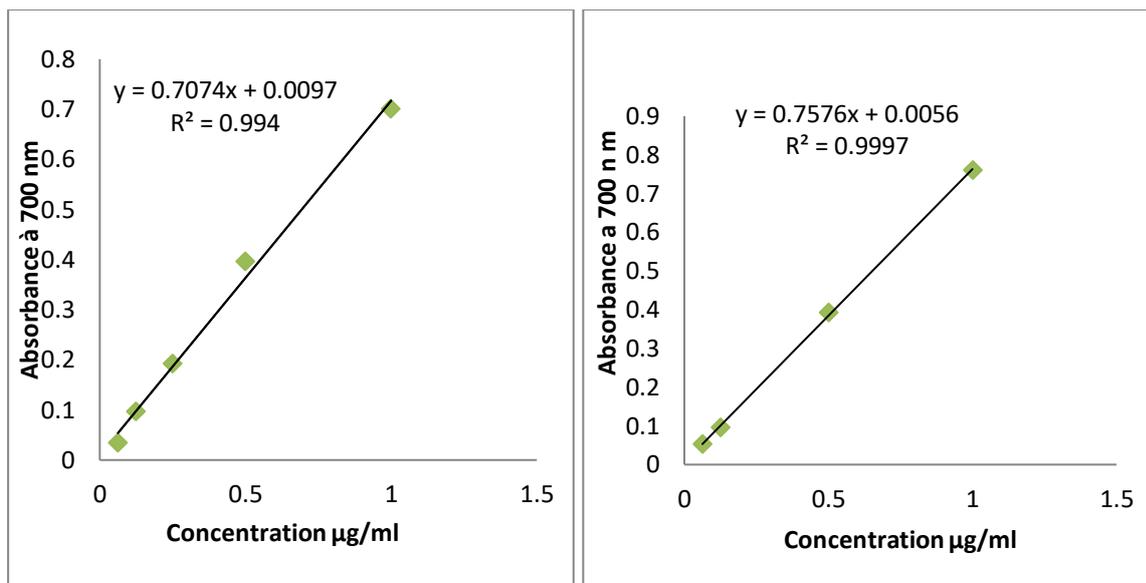


Figure N05°: Le pouvoir réducteur de l'extrait de MCH

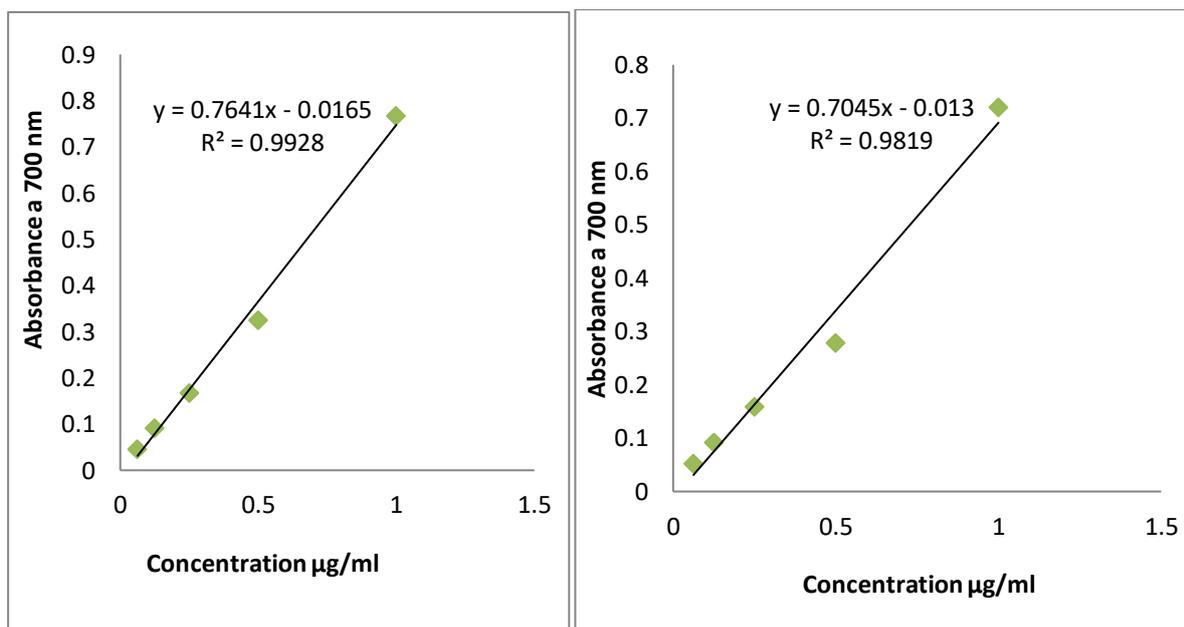


Figure N°06: Le pouvoir réducteur de l'extrait de MS

Annexe

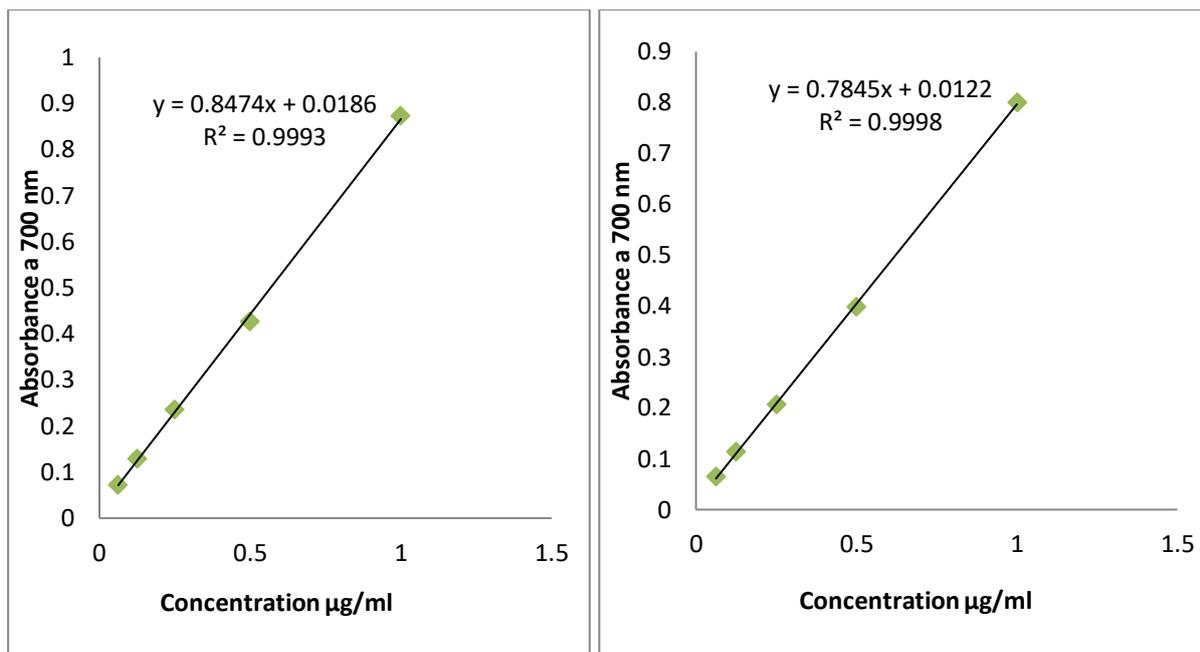


Figure N07°: Le pouvoir réducteur de l'extrait de SCH

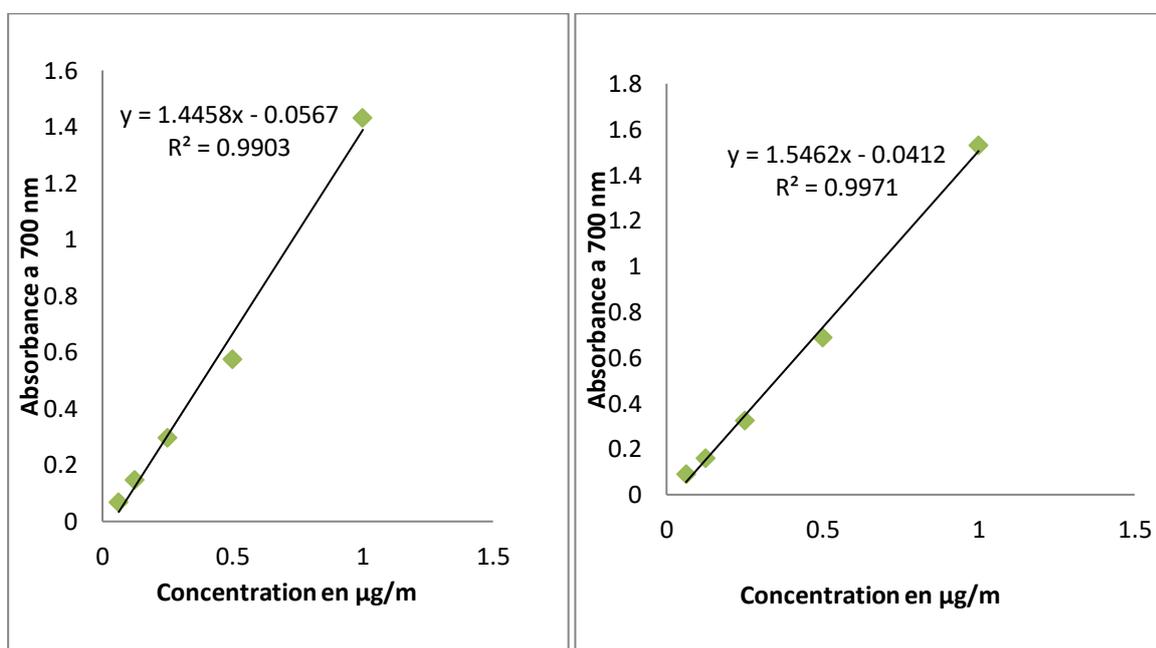


Figure N°8: Le pouvoir réducteur de l'extrait SS

2. le Test de DPPH•

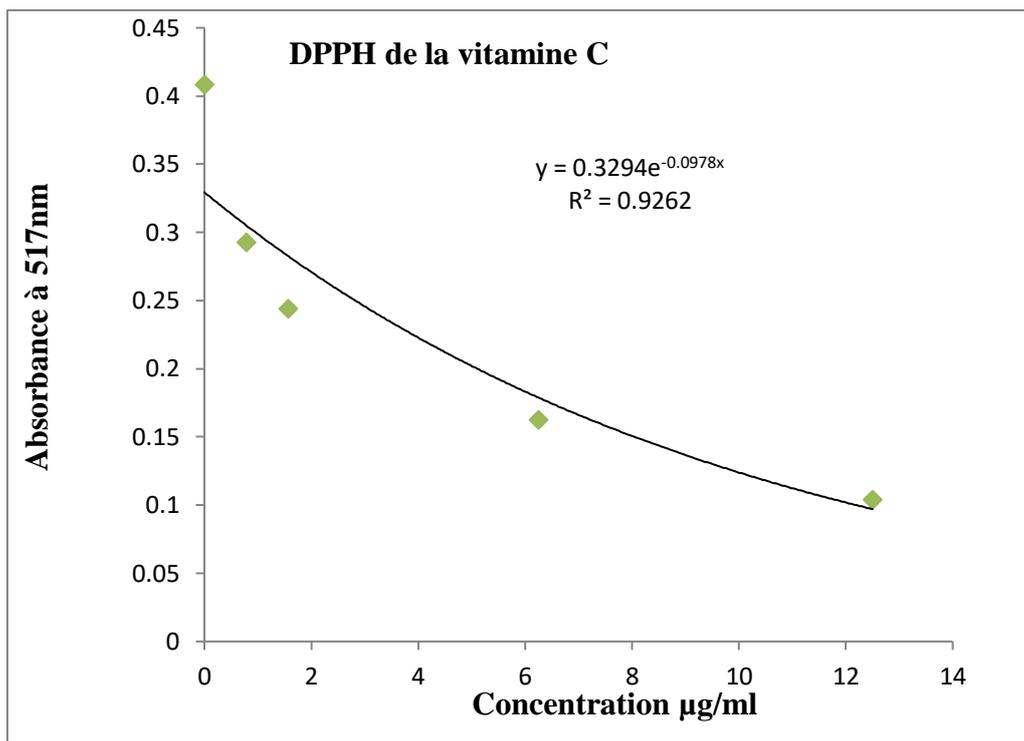


Figure N°09 DPPH de la vitamine C

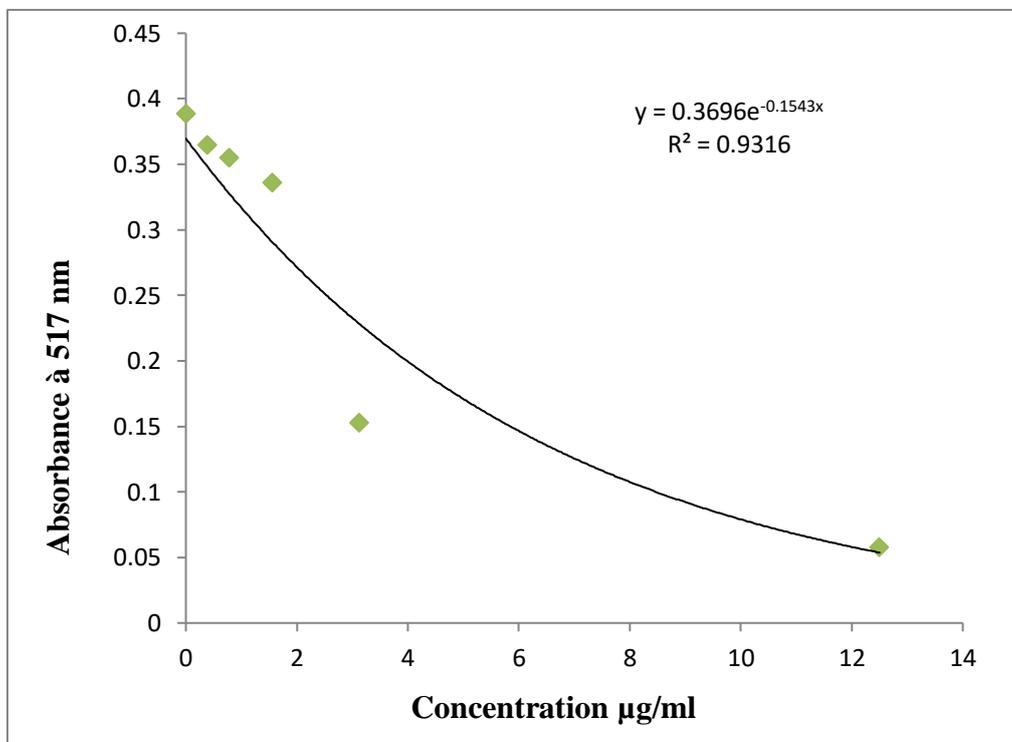


Figure N°10 DPPH de l'acide gallique

Annexe

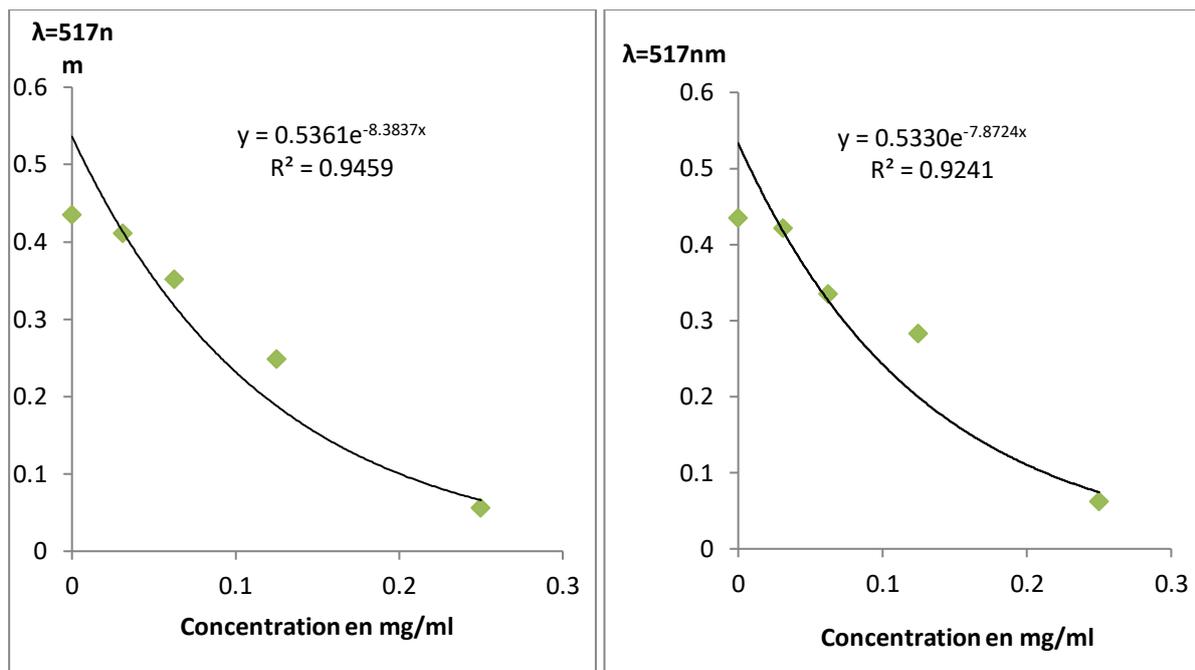


Figure N°11 : DPPH de l'extrait de MS

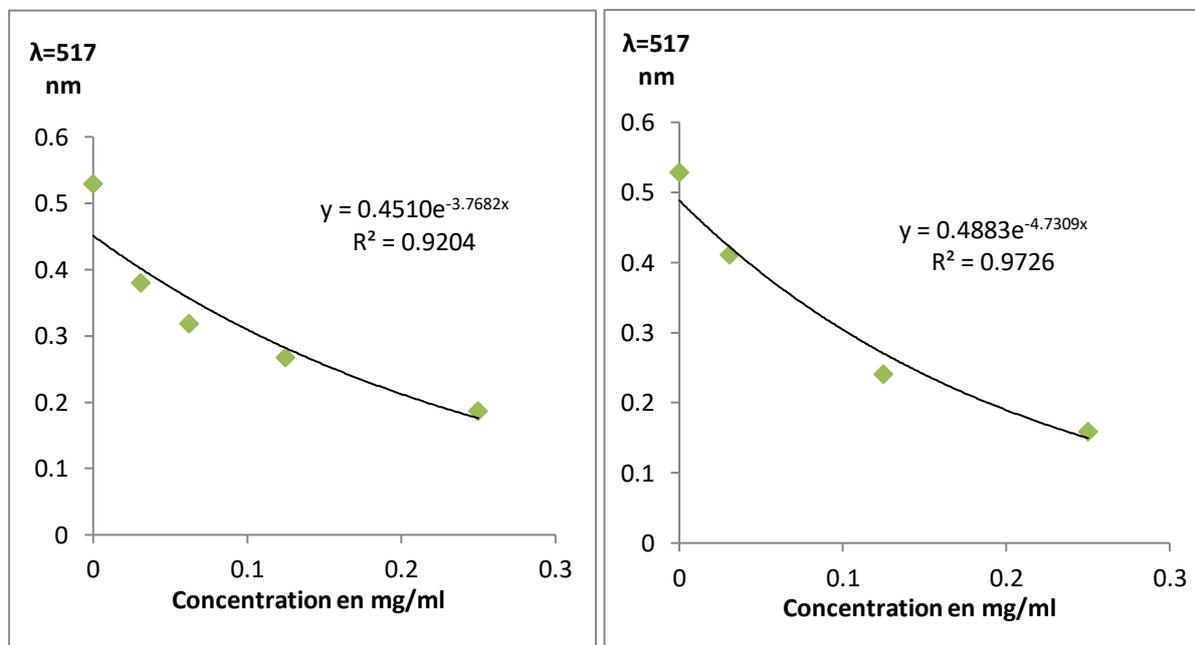


Figure N°12: DPPH de l'extrait de SCH

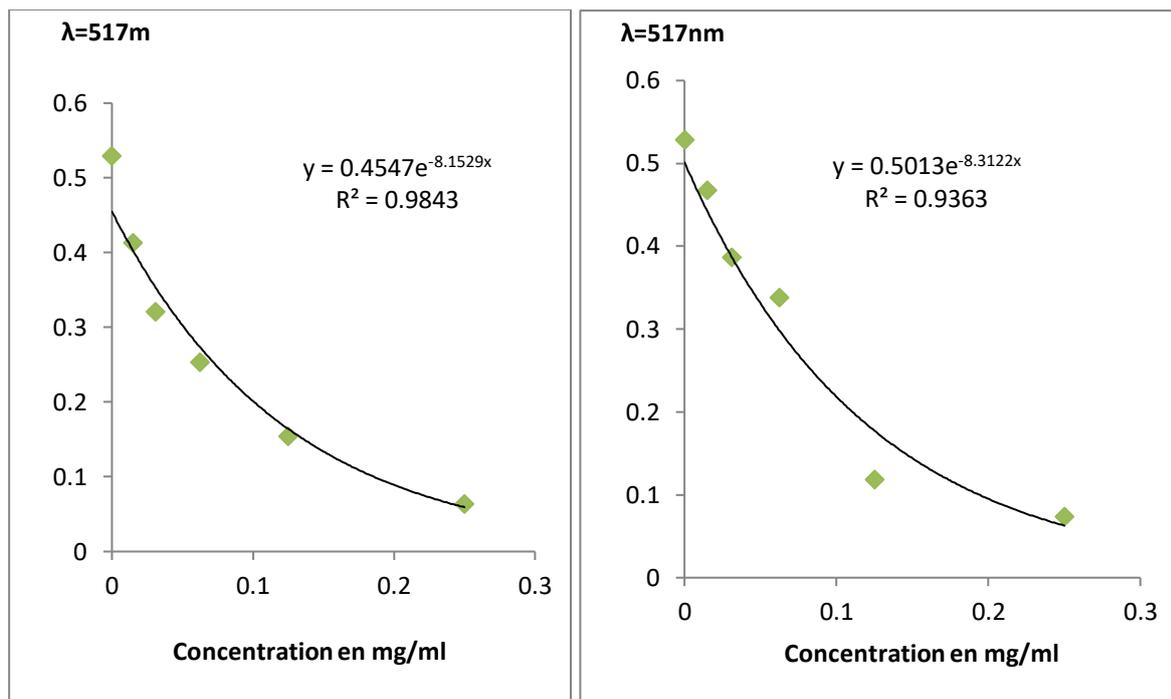


Figure N°13: DPPH de l'extrait de SS

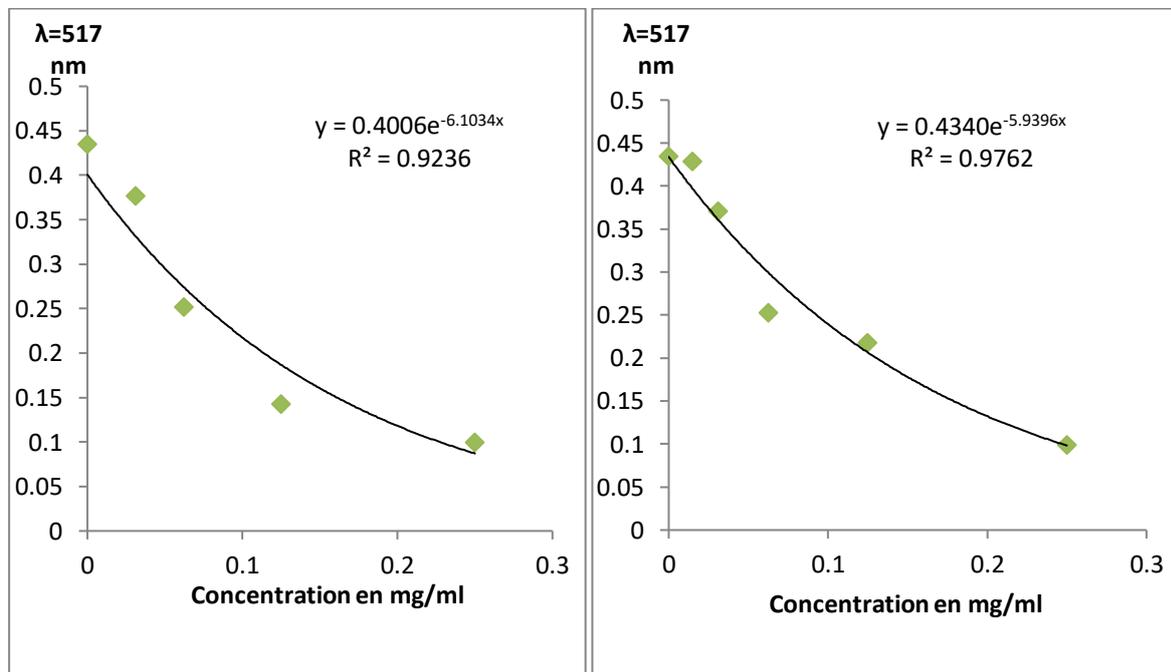


Figure N° 14: DPPH de l'extrait de MCH

Résumé :

Olea europeae est une plante très répandue dans les pays méditerranéens dont l'Algérie, elle est tant appréciée dans les domaines alimentaires, thérapeutiques, pharmaceutiques et cosmétiques. Cette plante est riche en composés phénoliques qui font l'objet de plusieurs recherches scientifiques visant à explorer et exploiter leurs propriétés biologiques. Etant donné que les feuilles sont considérées comme déchets d'olivier après la cueillette des fruits, cette étude s'intéresse à une valorisation de ce déchet pour un développement durable du secteur oléicole en Algérie. A travers cette étude nous avons, dans un premier temps, quantifié les composés phénoliques, dont les flavonoïdes, des feuilles d'olivier de deux variétés (Chemlal et Sigoise) et dans deuxième temps, évalué leur activité antioxydante. Les résultats de l'analyse quantitative des composés phénoliques des extraits des feuilles d'*Olea europeae* montrent une richesse en composés phénoliques, essentiellement les flavonoïdes, qui pourraient présenter une nouvelle source potentielle des molécules bioactives d'un intérêt thérapeutique. Par ailleurs, l'évaluation de l'activité antioxydante, présente une activité anti-radicalaire et un pouvoir réducteur très important, ces propriétés sont liées au contenu de l'extrait en antioxydant. Cependant cette activité dépend fortement de la variété des feuilles d'olivier étudiée et de la méthode utilisée lors de l'extraction. Il semblerait que l'extrait issu de la variété sigoise obtenu par la méthode de sonication présente l'activité antioxydante la plus intéressante. Ce dernier devrait être pris en considération et de manière prédominante dans la stratégie d'exploitation des déchets du secteur oléicole.

Mots clés : Polyphénols, antioxydants, Olea europeae, test DPPH, test FRAP...

المخلص :

Olea europeae هو نبات واسع الانتشار في دول البحر الأبيض المتوسط بما في ذلك الجزائر ، وهو مشهور جدًا في المجالات الغذائية والعلاجية والصيدلانية والتجميلية. هذا النبات غني بالمركبات الفينولية التي خضعت لعدة دراسات علمية تهدف إلى استكشاف واستغلال خصائصها البيولوجية. بالنظر إلى أن الأوراق تعتبر نفايات لشجر الزيتون بعد قطف الثمار ، فإن هذه الدراسة تتعلق باستعادة هذه النفايات من أجل التنمية المستدامة لقطاع الزيتون في الجزائر. من خلال هذه الدراسة ، قمنا أولاً بتحديد كمية المركبات الفينولية ، بما في ذلك الفلافونويد ، من أوراق الزيتون من صنفين Chemlal و Sigoise وثانيًا ، قيمنا نشاطها المضاد للأكسدة تظهر النتائج المستخرجة من أوراق الزيتون *Olea europeae* أن لها ثراءً في المركبات الفينولية ، وخاصة مركبات الفلافونويد والتي يمكن أن تقدم مصدرًا محتملاً جديدًا للجزيئات النشطة بيولوجيًا ذات الأهمية العلاجية. علاوة على ذلك ، فإن تقييم نشاط مضادات الأكسدة له نشاط مضاد مكافئ الراديكالية وقوة اختزال كبيرة جدًا ؛ ترتبط هذه الخصائص بالمحتوى المضاد للأكسدة في المستخلص. ومع ذلك ، فإن هذا النشاط يعتمد بشدة على تنوع أوراق الزيتون المدروسة والطريقة المستخدمة أثناء الاستخراج. يبدو أن المستخلص من صنف Sigoise الذي تم الحصول عليه بطريقة sonication يعرض نشاط مضادات الأكسدة الأكثر أهمية. يجب أن يؤخذ هذا الأخير في الاعتبار وبشكل رئيسي في إستراتيجية استغلال النفايات من قطاع الزيتون.

الكلمات الأساسية البوليفينول ، مضادات الأكسدة ، *Olea europeae* ، اختبار DPPH ، اختبار FRAP ...