

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Dr. Tahar Moulay SAIDA
Faculté des Sciences et Technologie
Département de Génie des procédés



جامعة د الطاهر مولاي سعيدة
كلية العلوم و التكنولوجيا
قسم : هندسة الطرائق

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Pour l'obtention du diplôme Master

En Génie des procédés

Option : Génie Pharmaceutique

Présenté par :

BENKADDOUR Affaf & BERKANE Fatima

***Extraction de composés bioactifs à l'aide
d'une nouvelle génération de solvant***

Soutenu le : 07/07/2026

Devant le jury :

Mr. GUAZZEN Brahim	Professeur	Université de Saida	Président
Mr. BOUDINAR Mohamed	MCA	Université de Saida	Examineur
Mr. BENHELIMA Abdelkader	MCA	Université de Saida	Rapporteur

Promotion : 2025-2026

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu, le Tout-Puissant, de nous avoir accordé la santé, le courage et la patience nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur « A. BENHELIMA », pour son accompagnement, ses précieux conseils, sa disponibilité et ses orientations scientifiques tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nos sincères remerciements s'adressent également aux membres du jury, « Dr M. BOUDJNAR » et « Pr B. GUZZEN qui ont accepté d'évaluer ce travail et de consacrer une partie de leur temps à son examen.

Nous adressons également nos remerciements à Mme O. BELARBI chef de département de Génie des Procédés et l'ensemble des enseignants du département, qui ont contribué à notre formation académique et scientifique durant notre parcours universitaire.

Nous remercions vivement le personnel du laboratoire pour leur aide technique, leur disponibilité et leur collaboration lors de la réalisation de la partie expérimentale.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à nos parents et à nos familles pour leur soutien moral, leurs encouragements constants et les sacrifices consentis tout au long de nos études.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail.

Merci à tous.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents, pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices, leurs encouragements et leur soutien tout au long de mon parcours académique.

À mes frères et sœurs, pour leur affection, leur aide et leur présence à mes côtés.

À toute ma famille, qui m'a toujours encouragée et soutenue dans les moments les plus importants de ma vie.

À mes enseignants et encadrant, pour leurs précieux conseils, leur disponibilité et leurs orientations scientifiques.

Enfin, À mes amis et collègues, pour leur soutien moral, leur aide et les moments partagés durant cette période d'études.

Affaf ET FATIHA

Liste des Figures

Fig. I.1 : Structures chimiques de quelques composés bioactifs courants.....	06
Fig. I.2 : Le potentiel thérapeutique des composés végétaux bioactifs.....	07
Fig. I.3 : Structures chimiques des différentes classes de polyphénols.....	09
Fig. I.4 : Exemples des terpènes.....	10
Fig. I.5 : Structure de base typique des alcaloïdes.....	10
Fig. I.6 : Structure chimique des composés organosoufrés.....	11
Fig. II.1 : Schéma illustrant le principe de la distillation à la vapeur d'eau.....	23
Fig. II.2 : Schéma illustrant le principe de la méthode d'extraction des huiles essentielles par pression à froid.....	24
Fig. II.3 : Extraction par solvant à travers l'appareil de Soxhlet.....	24
Fig. II.4 : Appareil d'extraction par reflux.....	25
Fig. II.5 : Schéma illustrant le principe d'extraction assistée par micro-ondes (MAE).....	26
Fig. II.6 : Schéma illustrant le principe d'extraction assistée par bain à ultrasons (UAE).....	27
Fig. II.7 : Schéma illustrant le principe d'extraction par fluide supercritique et subcritique (SFE).....	27
Fig. II.8 : Schéma illustrant le principe d'extraction par eau chaude sous pression.....	29
Fig. III.1 : Schéma des interactions par liaisons hydrogène entre HBA et le HBD lors de la formation des NADES.....	38
III.2 : Représentation du mécanisme de formation des NADES par établissement d'un réseau tridimensionnel de liaisons hydrogène entre les constituants HBA et HBD.....	39
Fig. III.3 : Représentation du la méthode de chauffage et agitation.....	40
Fig. III.4 : Représentation du la méthode d'assistance par ultrasons.....	41
Fig. III.5 : Représentation du la méthode d'assistance par micro-ondes.....	41
Fig. IV.1 : Localisation de la wilaya de Sidi Bel Abbès, région de collecte des grignons d'olive.....	48
Fig. IV.2 : Les échantillons d'olives vertes et noires objet de notre étude.....	49
Fig. IV.3 : Montage chauffage à reflux.....	50
Fig. IV.4 : pH-mètre.....	51
Fig. IV.5 : Bain ultrasons.....	52
Fig. IV.6 : Montage de filtration sous vide.....	54
Fig. IV.7 : Principe de test de piégeage du radical DPPH.....	56

Fig. IV.8 : Activité antimicrobienne.....	57
Fig. V.1 : Teneur en extrait des deux variétés du grignon d'olive.....	60
Fig. V.2 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	61
Fig. V.3 : Résultats de TPC des échantillons des grignon d'olive en fonction du temps d'extraction.....	62
Fig. V.4 : Résultats de TPC des échantillons de grignon d'olive en fonction de la température d'extraction.....	62
Fig. V.5 : Résultats de TPC des échantillons de grignon d'olive en fonction du rapport (L/S) d'extraction.....	63
Fig. V.6 : Courbe étalonnage de catéchine.....	64
Fig. V.7 : Résultats de TFC des échantillons de grignon d'olive en fonction du temps d'extraction.....	64
Fig. V.8 : Résultats de TFC des échantillons de grignon d'olive en fonction de la température d'extraction.....	65
Fig. V.9 : Résultats de TFC des échantillons de grignon d'olive en fonction du rapport solide/solvant d'extraction.....	65
Fig. V.10 : Caractérisation FT-IR des extraits de grignon d'olivier AA-N et AA-V.....	66
Fig. V.11 : Résultats de l'activité antioxydante (DPPH) des échantillons de grignon d'olive en fonction du temps d'extraction.....	68
Fig. V.12 : Résultats de l'activité antioxydante (DPPH) des échantillons de grignon d'olive en fonction de la température d'extraction.....	68
Fig. V.13 : Résultats d'activité antioxydante (DPPH) des échantillons de grignon d'olive en fonction du rapport solvant/solide d'extraction.....	69
Fig. V.14 : Résultats d'activité antimicrobienne des échantillons de grignon d'olive.....	70
Fig. V.15 : Comparaison des réponses prévu et observé pour la variété du grignon d'olive vert.....	76
Fig. V.16 : Surfaces des réponses pour la variété du grignon d'olive vert Temps vs. Température.....	77
Fig. V.17 : Comparaison des réponses prévu et observé pour la variété du grignon d'olive noir.....	82
Fig. V.18 : Surfaces des réponses pour la variété du grignon d'olive vert Temps vs. Température.....	84

Liste des tableaux

Tableau 1 : Teneur en composés phénoliques totaux de différentes sources végétales....	12
Tableau 2 : Applications industrielles des extraits de grignon d'olive.....	13
Tableau 3 : Effets des facteurs environnementaux sur la teneur en composés bioactifs d'olive.....	14
Tableau 4 : Principaux sucres utilisés comme HBDs dans les NADES.....	37
Tableau 5 : Principaux polyols utilisés comme HBDs dans les NADES.....	37
Tableau 6 : Principaux acides organiques utilisés comme HBDs dans les NADES.....	38
Tableau 7 : Principales propriétés physico-chimiques des NADES.....	39
Tableau 8 : Localisation et climat de la zone de collecte.....	49
Tableau 9 : Masses molaires des constituants.....	50
Tableau 10 : Plan d'extraction des grignons d'olivier en fonction du temps.....	52
Tableau 11 : Matrice expérimentale pour l'étude d'effet de température sur l'extraction..	52
Tableau 12 : Effet de ratios solide/liquide appliqués sur l'extraction.....	53
Tableau 13 : Réactifs utilisés pour l'analyse phytochimique.....	54
Tableau 14 : Les facteurs étudiés et leurs domaines de variation.....	58
Tableau 15 : Rendement d'extraction de quelques extraits végétaux issus de la littérature.....	60
Tableau 16 : Quelques paramètres physico-chimiques étudiés pour le solvant NADES	61
Tableau 17 : Influence des variables (température, temps, rapport liquide/solide, type de solvant) sur les réponses (TPC, TFC, DPPH et activité antimicrobienne) de la variété grignon d'olive vert.....	72
Tableau 18 : Paramètres statistiques de la conception Box-Behnken de TPC, TFC, activité antioxydante (DPPH) et activité antimicrobienne pour la variété de grignon d'olive vert.....	73
Tableau 19 : Influence des variables (température, temps, rapport liquide/solide, type de solvant) sur les réponses (TPC, TFC, DPPH et activité antimicrobienne, activité antifongique) de la variété grignon d'olive noir.....	79
Tableau 20 : Paramètres statistiques de la conception Box-Behnken de TPC, TFC, activité antioxydante et activité antimicrobienne pour la variété de grignon d'olive noir..	80

Liste des abréviations

°C :	Degré Celsius
UV :	Ultraviolet
IR :	Infrarouge
FTIR :	infrarouge à transformée de Fourier
DPPH :	2,2-diphényl -1-picrylhydrazyle
mg :	milligramme
% :	Pourcent
mL :	Millilitre
BBD :	Plan de Box-Behnken
<i>C. albicans</i> :	<i>Candida albicans</i>
C₀ :	Nombre de points centraux
ChCl :	Chlorure de choline
DES :	Solvants eutectiques profonds
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EAG :	Équivalent acide gallique
EAU :	Extraction assistée par ultrasons
EQ :	Équivalent quercétine
ERO :	Espèces réactives d'oxygène
g :	gramme
g/mol :	gramme par mole
GHz :	Gigahertz
Gram- :	Bactérie à Gram négatif
Gram+ :	Bactérie à Gram positif
HBA :	Accepteur de liaison hydrogène
HBD :	Donneur de liaison hydrogène
min :	minute
mL :	millilitre
mm :	millimètre
NADES :	Solvants eutectiques naturels profonds
pH :	Potentiel hydrogène
ρ :	Masse volumique

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

TFC : Teneur en flavonoïdes totaux

TPC : Teneur en composés phénoliques totaux

Résumé

Dans le cadre d'une valorisation des ressources naturelles, les grignons d'olive noire et verte de la région de **Sidi Bel Abbès**, ont fait l'objet de notre étude. Dans cette étude, l'effet combiné du rapport liquide/solide (15 à 45 mL/g), la température (30 à 60 °C) et le temps d'extraction (15 à 75 min) ont été évalués sur le potentiel d'activité antioxydante, antimicrobienne, teneur en phénols totaux (TPC) et teneur en flavonoïdes totaux (TFC) des extraits de grignon d'olive noire et verte tout en utilisant la méthodologie de plans d'expérience. Les analyses structurales par spectroscopie infrarouge (FT-IR) exécutées sur nos échantillons d'extraits soutiennent leur richesse en composés phénoliques. Les analyses statistiques ont montré que toutes les variables de procédé avaient un effet significatif sur les réponses liées à l'activité antioxydante, TFC et TPC traduit par leurs hausses tout en optimisant ces paramètres. La température modérée de 40 °C et le temps d'extraction de 30 min à un rapport liquide/solide de 25 mL/g se sont avérés plus efficaces en termes d'activité antioxydante et antimicrobienne. En conclusion, nous pouvons suggérer que les grignons d'olive, valorisés par extraction à l'aide d'un solvant de type NADES, offrent des possibilités intéressantes différents secteurs dont les domaines pharmaceutiques, cosmétique et agroalimentaire.

Mots clés : Grignon d'olive, NADES, TPC, TFC, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne, Plans d'expérience.

Abstract

As part of an effort to valorize natural resources, black and green olive pomace from the Sidi Bel Abbès region was the subject of this study. We evaluated the combined effects of the liquid-to-solid ratio (15-45 mL/g), temperature (30-60°C), and extraction time (15-75 min) on the antioxidant and antimicrobial potential, total phenolic content (TPC), and total flavonoid content (TFC) of black and green olive pomace extracts, employing a design-of-experiments methodology. Structural analyses using Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy confirmed the extracts' high phenolic compound content. Statistical analysis revealed that all process variables significantly influenced the antioxidant activity, TFC, and TPC responses specifically leading to increases in these values during parameter optimization. A moderate temperature of 40°C, an extraction time of 30 minutes, and a liquid-to-solid ratio of 25 mL/g proved most effective in terms of antioxidant and antimicrobial activity. In conclusion, we can suggest that olive pomace, valorized through extraction using a NADES-type solvent,

offers promising opportunities for various sectors, including the pharmaceutical, cosmetic, and agri-food industries.

Keywords: Olive pomace, NADES, TPC, TFC, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Design of experiments.

المخلص

في إطار الجهود الرامية إلى تأمين الموارد الطبيعية، تناولت هذه الدراسة ثقل الزيتون (الأسود والأخضر) المستخلص من منطقة سيدي بلعباس. وقد قمنا بتقييم التأثيرات المشتركة لكل من نسبة السائل إلى الصلب (15–45 مل/غ)، ودرجة الحرارة (30–60 درجة مئوية)، وزمن الاستخلاص (15–75 دقيقة) على الفعالية المضادة للأكسدة والميكروبات، والمحتوى الفينولي الكلي، ومحتوى الفلافونويد الكلي في مستخلصات ثقل الزيتون، وذلك باستخدام منهجية "تصميم التجارب". وأكدت التحليلات الهيكلية، التي أجريت باستخدام تقنية مطيافية الأشعة تحت الحمراء بتحويل فورييه، احتواء المستخلصات على نسب عالية من المركبات الفينولية. كما أظهر التحليل الإحصائي أن جميع متغيرات العملية أثرت بشكل معنوي على مؤشرات النشاط المضاد للأكسدة ومحتوى الفلافونويد والفينولات الكلية، حيث أدت تحديداً إلى زيادة هذه القيم أثناء عملية تحسين المعايير. وقد تبين أن درجة حرارة معتدلة تبلغ 40 درجة مئوية، وزمن استخلاص قدره 30 دقيقة، ونسبة سائل إلى صلب تبلغ 25 مل/غ، هي الظروف الأكثر فعالية من حيث النشاط المضاد للأكسدة والميكروبات. وفي الختام، نرى أن ثقل الزيتون المُمْتَن عبر تقنية الاستخلاص باستخدام المذيبات العميقة سهلة الانصهار الطبيعية يمثل مورداً واعداً لمختلف القطاعات، بما في ذلك الصناعات الدوائية، ومستحضرات التجميل، والصناعات الغذائية الزراعية.

الكلمات المفتاحية

النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، تصميم التجارب، TFC، TPC، NADES، ثقل الزيتون،

Sommaire

Liste des Figures.....	I
Liste des Tableaux.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	01
Références bibliographiques.....	03

Partie A : P. Bibliographique **Chapitre I : Les Composés bioactifs**

I.1 Historique.....	04
I.2 Introduction.....	04
I.3 Les composés bioactifs.....	05
I.4 Sources naturelles des composés bioactifs.....	06
I.4.1 Sources végétales.....	06
I.4.2 Sources animales.....	07
I.4.3 Sources microbiennes.....	08
I.4.4 Sources marines.....	08
I.5 Classification des composés bioactifs.....	08
I.5.1 Les polyphénols.....	08
I.5.2 Les terpénoïdes.....	09
I.5.3 Les alcaloïdes.....	10
I.5.4 Les composés organosoufrés.....	11
I.6 Propriétés biologiques et fonctionnelles.....	11
I.6.1 Activité antioxydante.....	11
I.6.2 Activité anti-inflammatoire.....	11
I.6.3 Activité anticancéreuse.....	11
I.6.4 Activité cardioprotectrice.....	12
I.6.5 Activité neuroprotectrice.....	12
I.6.6 Activité antimicrobienne.....	12
I.7. Importance nutritionnelle, pharmaceutique et industrielle.....	12
I.7.1 Importance nutritionnelle.....	12
I.7.2 Importance pharmaceutique.....	12
I.7.3 Importance industrielle.....	13
I.8 Facteurs influençant la teneur en composés bioactifs.....	13
I.8.1 Facteurs génétiques.....	13
I.8.2 Facteurs environnementaux.....	13
I.8.3 Pratiques agronomiques.....	14
I.8.4 Facteurs post-récolte.....	15
Références bibliographiques.....	16

Chapitre II : Méthodes d'extractions

II.1 Introduction.....	20
II.2 Historique.....	21

II.3 Processus d'extraction des composés bioactifs.....	21
II.4 Méthodes conventionnelles d'extraction.....	22
II.4.1 Macération.....	23
II.4.2 Percolation.....	23
II.4.3 Infusion.....	23
II.4.4 Décoction.....	23
II.4.5 Distillation à la vapeur d'eau.....	23
II.4.6 Expression ou pression à froid.....	24
II.4.7 Extraction Soxhlet.....	24
II.4.8 Digestion.....	25
II.4.9 Extraction par reflux.....	25
II.5 Méthodes modernes d'extraction.....	25
II.5.1 Extraction assistée par micro-ondes (MAE).....	25
II.5.2 Extraction assistée par bain à ultrasons (UAE).....	26
II.5.3 Extraction par fluide supercritique (SFE).....	27
II.5.4 Extraction assistée par enzymes (EAE).....	28
II.5.5 Extraction par eau chaude sous pression (PHWE).....	28
II.6 Paramètres influençant l'efficacité d'extraction.....	29
II.6.1 Temps, température et rapport solide/solvant.....	29
II.6.2 pH du milieu.....	29
II.6.3 Taille des particules de la matrice.....	30
II.7 Conclusion.....	30
Références bibliographiques.....	31

III. Les solvants NADES

III.1 Introduction.....	35
III.2 Définition de NADES.....	35
III.2.1 Solvant eutectique profond (DES).....	35
III.2.2 Solvants Natural eutectique profond (NADES).....	36
III.3 Composition des NADES.....	36
III.3.1 Les accepteurs de liaison hydrogène (HBAs).....	36
III.3.2 Les donneurs de liaison hydrogène (HBDs).....	36
III.3.2.1 Les sucres.....	36
III.3.2.2 Les polyols.....	37
III.3.2.3 Les acides organiques.....	37
III.4 Mécanisme de formation des NADES.....	38
III.4.1 Interactions par liaisons hydrogène.....	38
III.4.2 Dépression du point de fusion.....	38
III.5 Propriétés Physico-chimiques.....	39
III.6 Méthodes de préparation des NADES.....	40
III.6.1 Méthode de chauffage et agitation.....	40
III.6.2 Méthode d'assistance par ultrasons.....	40
III.6.3 Méthode d'assistance par micro-ondes.....	41
III.6.4 Autres approches complémentaires.....	41

III.7 Applications des NADES.....	41
III.7.1 Extraction de composés bioactifs.....	41
III.7.3 Applications pharmaceutiques.....	42
III.7.2 Applications alimentaires.....	42
III.7.4 Applications cosmétiques.....	42
III.8 Avantages et limites des NADES.....	43
III.9 Avancées récentes dans la recherche sur les NADES (2024-2026).....	43
III.10 Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	44

Partie B : P. Expérimentale

IV. Matériels et méthodes

IV.1. Objectif.....	48
IV.2 Matériel végétal.....	48
IV.3 Présentation de zone de collecte (Sidi Bel Abbès).....	49
IV.3.1 Préparation des échantillons.....	49
IV.4 Préparation de NADES.....	49
IV.5 Analyses physico-chimiques.....	50
IV.5.1 pH.....	50
IV.5.2 Densité (d).....	51
IV.6 Extraction assistée par ultrasons et séparation des extraits.....	51
IV.6.1 Principe de l'extraction assistée par ultrasons.....	51
IV.6.2 Procédure d'extraction.....	52
IV.6.2.1 Les paramètres d'extraction étudiés.....	52
IV.6.3 Séparation, clarification.....	53
IV.6.3.1 Séparation primaire par centrifugation.....	53
IV.6.3.2 Clarification par filtration sous vide.....	53
IV.6.4 Conservation des extraits.....	54
IV.6.5 Analyse FT-IR.....	54
IV.7 Analyse phytochimique quantitative.....	54
IV.7.1 Dosage des composés phénoliques totaux (TPC).....	55
IV.7.2 Dosage des flavonoïdes totaux (TFC).....	55
IV.8 Activités biologiques.....	55
IV.8.1 Évaluation de l'activité antioxydants (test de DPPH).....	55
IV.8.2 Activité antimicrobienne.....	56
IV.8 Préparation des plans d'expérience.....	57
IV.8.1 Objectifs.....	57
IV.8.2 Détermination des facteurs et du domaine d'étude.....	57
IV.8.3 Nombre total d'expériences.....	57
IV.8.4 Analyse statistique.....	58
Références bibliographiques.....	59

V. Résultats et discussions

V.1 Rendement en extrait.....	60
V.2 Analyses physico-chimiques.....	61
V.3 Détermination de la teneur en polyphénol et flavonoïde totaux.....	61

V.3.1 Détermination de la teneur en polyphénols totaux (TPC).....	61
V.3.2 Détermination de la teneur des flavonoïdes totaux (TFC).....	63
V.4 Analyse FT-IR.....	66
V.5. Résultats d'activité antioxydante des extraits.....	67
V.6. Résultats d'activité antimicrobienne des extraits.....	69
V.7 Résultats du plan d'expérience.....	70
V.7.1 Optimisation pour TPC, TFC, DPPH et activité antimicrobienne.....	70
V.7.1.1 Variété de grignon d'olive vert.....	70
V.7.1.2 Variété de grignon d'olive noir.....	78
Références bibliographique.....	85
Conclusion générale.....	87

Introduction

Générale

Introduction générale

Depuis l'Antiquité, les ressources naturelles constituent une source importante de substances biologiquement actives utilisées dans l'alimentation, la médecine et la conservation des aliments. Les plantes, les fruits, les épices ainsi que les sous-produits agroalimentaires renferment une grande diversité de composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les caroténoïdes, reconnus pour leurs nombreuses propriétés biologiques et thérapeutiques [1].

Au cours des dernières décennies, l'intérêt porté à ces composés n'a cessé de croître en raison de leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans les domaines pharmaceutique, alimentaire, cosmétique et nutraceutique [2]. Parallèlement, la valorisation des sous-produits issus des industries agroalimentaires est devenue une priorité afin de réduire l'impact environnemental des déchets tout en créant des produits à forte valeur ajoutée.

Parmi ces sous-produits, le grignon d'olive, résidu principal de l'industrie oléicole, représente une ressource particulièrement intéressante en raison de sa richesse en composés phénoliques tels que l'hydroxytyrosol, l'oléuropéine et le tyrosol [3]. Longtemps considéré comme un simple déchet industriel, ce sous-produit fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches visant sa valorisation dans le cadre du développement durable et de l'économie circulaire.

Toutefois, l'efficacité de la récupération de ces molécules dépend fortement des procédés d'extraction employés et plus particulièrement de la nature du solvant utilisé. Les solvants organiques conventionnels tels que le méthanol, l'acétone ou l'hexane, malgré leur efficacité, présentent plusieurs inconvénients liés à leur toxicité, leur inflammabilité, leur volatilité ainsi qu'à leurs effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine [4].

Face à ces contraintes, la chimie verte a favorisé l'émergence d'une nouvelle génération de solvants plus sûrs et plus respectueux à l'environnement. Parmi ces alternatives, les solvants eutectiques naturels profonds ou NADES (Natural Deep Eutectic Solvents) apparaissent comme des solvants particulièrement prometteurs. Constitués de composés naturels biodégradables tels que le chlorure de choline, les sucres, les acides organiques ou les polyols, ces solvants présentent une faible toxicité, une excellente capacité de solubilisation ainsi qu'une grande compatibilité avec les composés bioactifs d'origine végétale [5, 6].

Actuellement, les NADES suscitent un intérêt croissant dans les procédés d'extraction verte grâce à leur capacité à améliorer les rendements d'extraction tout en réduisant l'utilisation des

solvants organiques conventionnels. Associés à des techniques modernes telles que l'extraction assistée par ultrasons, ils constituent une approche innovante, efficace et durable pour la valorisation des ressources naturelles [7].

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail, qui vise à étudier le potentiel d'une nouvelle génération de solvants verts de type NADES pour l'extraction des composés bioactifs du grignon d'olive et à optimiser les conditions expérimentales permettant d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction et la plus forte activité antioxydante.

Pour cela, notre étude sera scindée en trois parties :

- ❖ Dans une première partie bibliographique, nous présenterons les connaissances actuelles relatives aux composés bioactifs, aux différentes méthodes d'extraction ainsi qu'aux solvants eutectiques naturels profonds (NADES) et leurs applications dans le domaine de l'extraction verte ;
- ❖ Dans une deuxième partie expérimentale, nous décrirons les matériaux utilisés, la préparation des solvants NADES, les procédés d'extraction mis en œuvre ainsi que les différentes méthodes analytiques employées pour la détermination des teneurs en composés phénoliques totaux, flavonoïdes totaux ainsi que les essais d'activité antioxydante et antimicrobienne ;
- ❖ Dans une troisième partie, nous présenterons les résultats obtenus ainsi que leur discussion en relation avec les données de la littérature scientifique.
- ❖ Finalement, notre étude sera finalisée par une conclusion et perspectives.

Les différentes investigations réalisées pourraient permettre d'évaluer l'intérêt des solvants NADES comme alternative écologique aux solvants conventionnels et de contribuer au développement de nouvelles stratégies de valorisation des sous-produits de l'industrie oléicole.

Références bibliographiques

- [1]. Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- [2]. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- [3]. Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>
- [4]. Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- [5]. Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- [6]. Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014). Natural deep eutectic solvents: Solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- [7]. Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>

Chapitre I:
Les composés
bioactifs

I.1 Historique

L'étude des composés bioactifs remonte au début du XIX^{ème} siècle, lorsque les chimistes ont commencé à isoler des métabolites secondaires végétaux aux propriétés médicinales. Les premières recherches se sont concentrées sur l'identification des alcaloïdes tels que la morphine et la quinine, qui présentaient de puissants effets pharmacologiques [1]. Au début du XX^{ème} siècle, la découverte des vitamines et des nutriments essentiels a permis de distinguer les composés indispensables à la survie de ceux qui modulent la santé, aujourd'hui classés comme composés bioactifs [2]. Au milieu du XX^{ème} siècle, l'attention s'est portée sur les polyphénols, les flavonoïdes et d'autres composés d'origine végétale, à mesure que les études épidémiologiques établissaient un lien entre l'alimentation et la prévention des maladies chroniques [3]. Le « Paradoxe français », observé dans les années 1990, qui mettait en évidence de faibles taux de maladies cardiovasculaires malgré des régimes riches en graisses, a attiré l'attention mondiale sur les effets bénéfiques des polyphénols de l'huile d'olive sur la santé [4]. Cette observation historique a catalysé les recherches sur le potentiel antioxydant et anti-inflammatoire des composés bioactifs alimentaires [5].

Parallèlement, les sous-produits industriels tels que le grignon d'olive, longtemps considérés comme des déchets, se sont révélés être de riches sources de molécules bioactives [6]. Les avancées en chimie analytique, notamment la HPLC et la spectrométrie de masse, ont permis l'identification et la quantification précises de ces composés dans des matrices complexes [7]. Au cours des deux dernières décennies, le concept d'aliments fonctionnels et de nutraceutiques a émergé, soulignant l'intégration des composés bioactifs dans l'alimentation et les applications pharmaceutiques [8].

Aujourd'hui, la valorisation des composés bioactifs naturels issus des sources végétales et des sous-produits agroalimentaires représente un axe majeur de recherche en génie pharmaceutique et en biotechnologie industrielle [9, 10]. La compréhension du développement historique de la recherche sur les composés bioactifs constitue le fondement des stratégies modernes d'extraction, de caractérisation et d'application dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire [10].

I.2 Introduction

Les composés bioactifs sont des constituants chimiques naturellement présents dans les plantes, les animaux et les micro-organismes, qui exercent des effets biologiques spécifiques au-delà de leur valeur nutritionnelle de base. Contrairement aux macronutriments tels que les glucides, les protéines et les lipides, ils ne sont pas des nutriments essentiels et ne servent pas

principalement de sources d'énergie ; ils agissent plutôt à de faibles concentrations pour influencer les processus physiologiques et les voies métaboliques [1, 2].

Au niveau cellulaire et moléculaire, les composés bioactifs modulent l'activité enzymatique, l'expression des gènes, la signalisation des récepteurs et l'équilibre redox, contribuant ainsi au maintien de la santé et à la prévention des maladies chroniques [3]. Ces mécanismes expliquent leur pertinence croissante dans les applications pharmaceutiques et thérapeutiques, notamment dans la modulation de l'inflammation, du stress oxydatif, de la prolifération cellulaire et de l'apoptose [7].

Les composés bioactifs englobent une large gamme de classes chimiques, notamment les polyphénols, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les caroténoïdes et les glucosinolates, chacun présentant des structures distinctes qui déterminent leur solubilité, leur réactivité et leurs cibles biologiques [10]. Parmi ceux-ci, les polyphénols sont les plus étudiés, notamment pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires [3]. Du point de vue du génie pharmaceutique, l'exploitation efficace des composés bioactifs nécessite une compréhension approfondie de leurs propriétés physicochimiques, de leur stabilité, de leur biodisponibilité et de leur interaction avec les excipients [1, 3].

Ces dernières années, les sous-produits agroalimentaires sont apparus comme des sources durables et économiques de molécules bioactives à haute valeur ajoutée, en accord avec les principes de l'économie circulaire [4, 5, 7].

I.3 Les composés bioactifs

Les composés bioactifs (figure I.1) sont des métabolites secondaires présents en faibles quantités dans diverses plantes. Ces composés sont majoritairement hydrophobes et peu solubles. Les principales classes de composés bioactifs sont :

- Les terpènes et terpénoïdes (environ 25 000 types) [11],
- Les alcaloïdes (environ 12 000 types) [12],
- Les composés phénoliques (environ 8 000 types) [13].

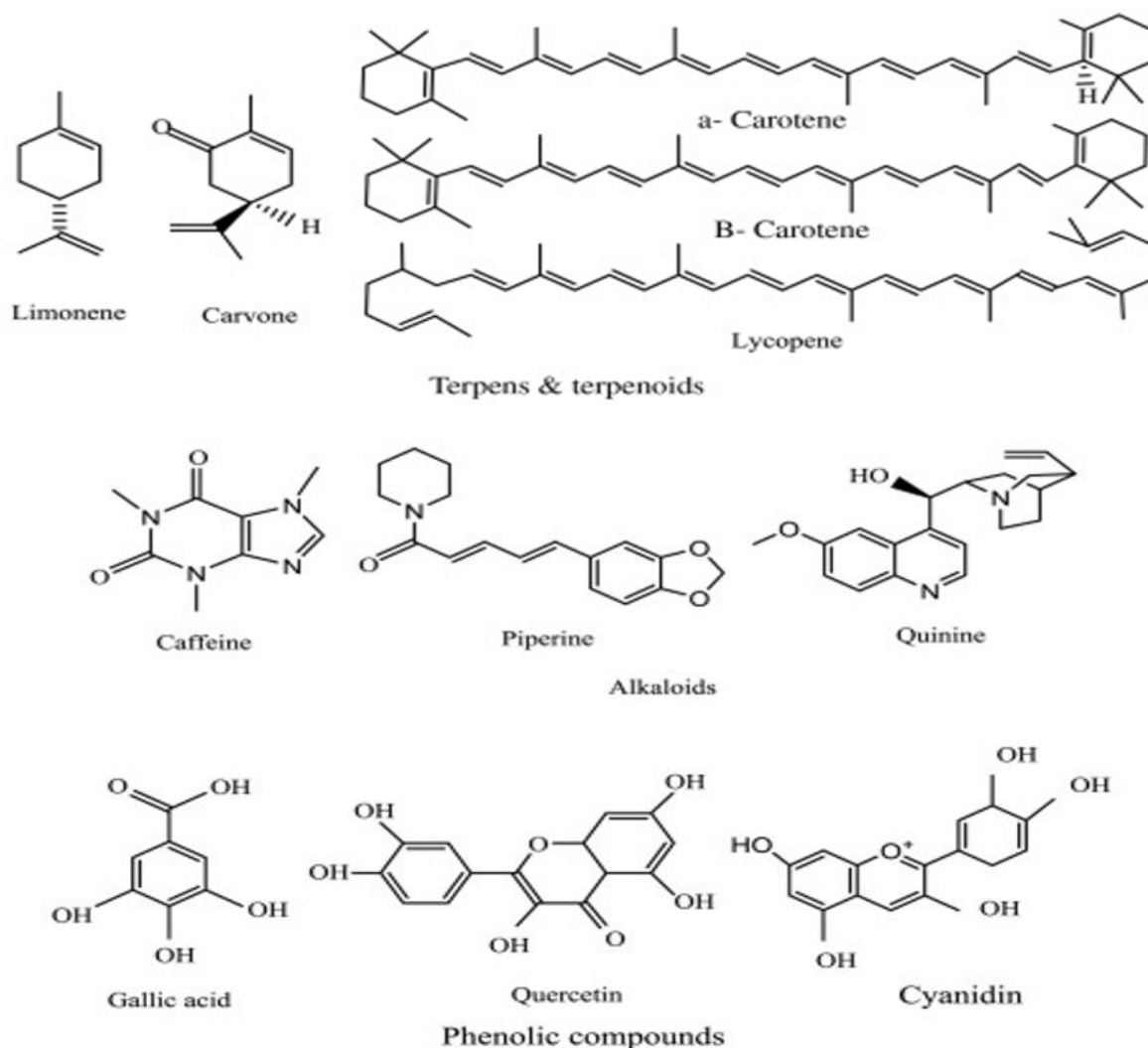


Fig. I.1 : Structures chimiques de quelques composés bioactifs courants [12].

I.4 Sources naturelles des composés bioactifs

Les composés bioactifs sont des molécules naturellement présentes dans de nombreuses sources biologiques (figure I.2). Ils peuvent être classés selon leur origine comme suit :

I.4.1 Sources végétales

- ❖ **Fruits :** Les fruits sont riches en polyphénols, flavonoïdes, anthocyanes et acides phénoliques, qui exercent des effets antioxydants, anti-inflammatoires et cardioprotecteurs [1].
- ❖ **Légumes :** Les légumes contiennent des caroténoïdes, des glucosinolates et des composés phénoliques qui favorisent la détoxification, réduisent le stress oxydatif et modulent les voies métaboliques [2].

- ❖ **Herbes et épices** : Les herbes médicinales et les épices, telles que le curcuma, le romarin et l'origan, sont abondantes en terpénoïdes et en composés phénoliques présentant des activités antimicrobiennes et anti-inflammatoires [3].
- ❖ **Graines et noix** : Les graines (ex. lin, sésame) et les noix sont riches en polyphénols, lignanes et acides gras insaturés qui contribuent à la régulation lipidique et à la santé cardiovasculaire [4].

I.4.2 Sources animales

- ❖ **Lait et produits laitiers** : Le lait contient des peptides bioactifs dérivés des protéines de caséine et de lactosérum, qui présentent des activités antihypertensives, antioxydantes et antimicrobiennes [4].
- ❖ **Œufs** : Les œufs sont une source de protéines bioactives et de phospholipides aux effets immunomodulateurs et antioxydants [5].
- ❖ **Poissons et sous-produits de poisson** : Les poissons et leurs sous-produits fournissent des acides gras oméga-3 (EPA, DHA) et des peptides bioactifs aux propriétés anti-inflammatoires, cardioprotectrices et neuroprotectrices [5].

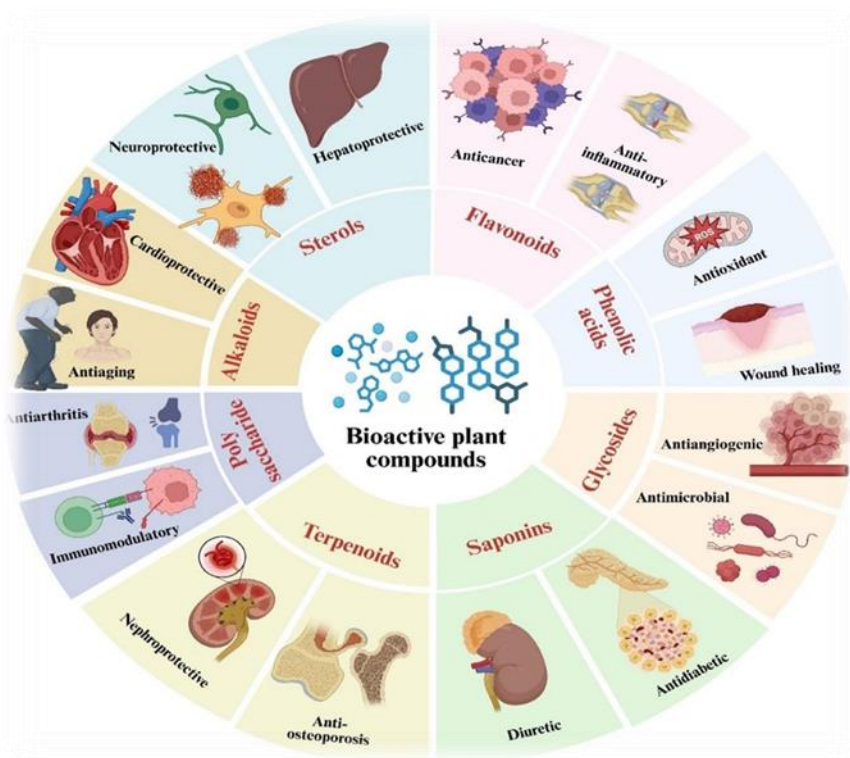


Fig. I.2 : Le potentiel thérapeutique des composés végétaux bioactifs [14].

I.4.3 Sources microbiennes

- ❖ **Bactéries** : Certaines bactéries, telles que les espèces *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, produisent des métabolites bioactifs, notamment des exopolysaccharides et des acides gras à chaîne courte, qui soutiennent la santé intestinale [2].
- ❖ **Champignons et levures** : Les champignons et les levures génèrent des métabolites secondaires tels que des vitamines, des polykétides et des peptides antimicrobiens, précieux dans les domaines pharmaceutiques et des aliments fonctionnels [6].

I.4.4 Sources marines

- ❖ **Algues et algues marines** : Contiennent des caroténoïdes, des polyphénols et des polysaccharides sulfatés aux propriétés anti-inflammatoires, antivirales et cardioprotectrices [10].
- ❖ **Sous-produits de poisson** : Fournissent des peptides bioactifs et des acides gras oméga-3, qui soutiennent la santé cardiovasculaire et métabolique [10].

I.5 Classification des composés bioactifs

Les composés bioactifs peuvent être classifiés selon leur structure chimique, leur origine biosynthétique et leur fonction biologique [1]. Les principales classes sont :

I.5.1 Les polyphénols

Les polyphénols représentent le groupe le plus important de composés bioactifs, avec plus de 8 000 structures identifiées [3]. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupes hydroxyle phénoliques attachés à des structures en cycles aromatiques [4]. Les polyphénols sont classés en plusieurs sous-groupes (figure I.3) :

- ❖ **Les flavonoïdes** : représentent la sous-classe la plus abondante des polyphénols. Ils regroupent plusieurs familles structurales distinctes ex : les flavonols (quercétine, kaempférol), les flavones (apigénine, lutéoline), les flavanones (hespéridine, naringénine), ainsi que les flavanols (catéchines, épicatechines). Ces composés présentent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses [5].
- ❖ **Les acides phénoliques** : comprennent les acides hydroxybenzoïques (acide gallique, acide protocatéchique) et les acides hydroxycinnamiques (acide caféique, acide férulique, acide chlorogénique) [6].
- ❖ **Les stilbènes** : tels que le resvératrol, présent dans le raisin et le vin rouge, démontrent des effets cardioprotecteurs et neuroprotecteurs [8].

- ❖ **Les lignanes** sont des composés diphenoliques présents dans les graines de lin, les graines de sésame et les céréales complètes [9]. Ils possèdent des activités estrogéniques et antioxydantes [10].

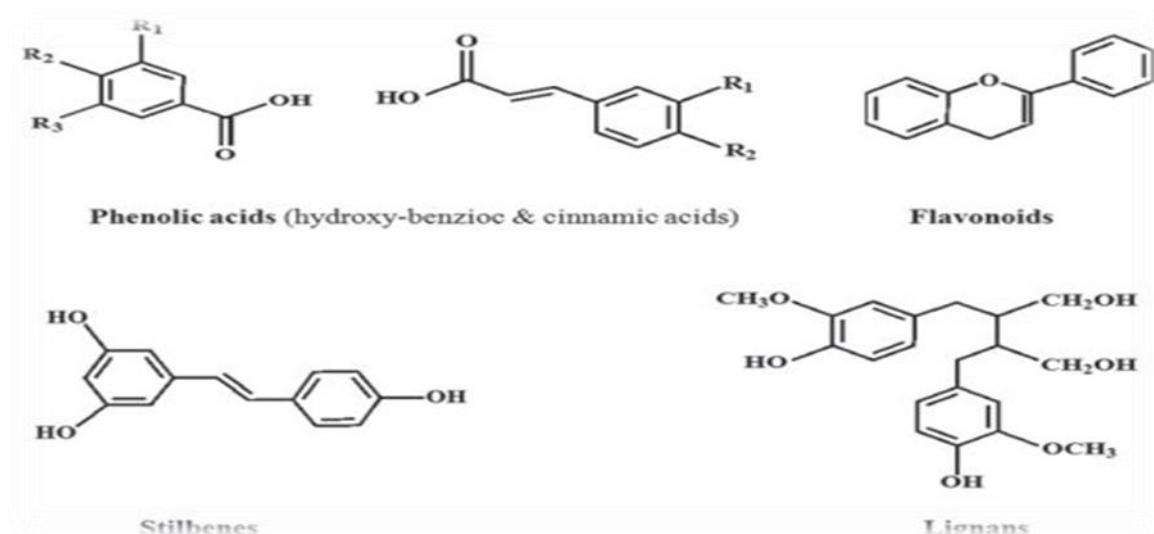


Fig. I.3 : Structures chimiques des différentes classes de polyphénols [15].

I.5.2 Les terpénoïdes

Les terpénoïdes (figure I.4), également appelés isoprénoïdes, constituent la plus grande classe de métabolites secondaires, avec plus de 40 000 structures connues [16]. Ils sont classifiés selon le nombre d'unités isoprène :

- ❖ **Les caroténoïdes** : sont des tétraterpènes qui comprennent le β -carotène, le lycopène, la lutéine et la zéaxanthine [17]. Ces composés fonctionnent comme précurseurs de la provitamine A et comme antioxydants [18]. Le lycopène, abondant dans les tomates, démontre des propriétés anticancéreuses, notamment contre le cancer de la prostate [19].
- ❖ **Les monoterpènes** : tels que le limonène et le menthol, sont présents dans les écorces d'agrumes et la menthe [20]. Les sesquiterpènes comprennent l'artémisinine, un composé antipaludéen extrait d'*Artemisia annua* [21].
- ❖ **Les triterpénoïdes** : tels que les ginsénosides du ginseng et l'acide bétulinique de l'écorce de bouleau, présentent diverses activités pharmacologiques [22].

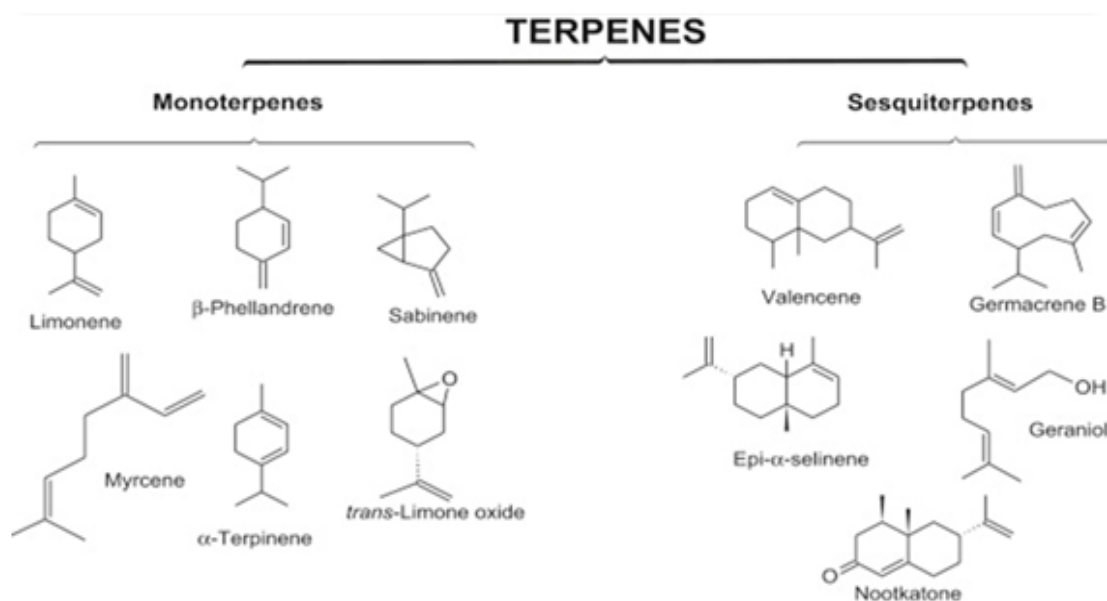


Fig. I.4 : Exemples des terpènes [23].

I.5.3 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes (figure I.5) sont des composés naturels azotés qui présentent un large spectre d'activités pharmacologiques. Ils peuvent être divisés en plusieurs groupes [24] :

- ❖ **Les alcaloïdes puriques** : tels que la caféine et la théobromine, sont présents dans le thé et le cacao. Ces composés agissent comme stimulants du système nerveux central et contribuent à l'amélioration des performances cognitives.
- ❖ **Les alcaloïdes isoquinoléiques** : comprennent la morphine, la codéine et la berbérine. Parmi eux, la berbérine est bien connue pour ses effets antimicrobiens et hypoglycémifiants.
- ❖ **Les alcaloïdes indoliques** : tels que la vincristine et la vinblastine, sont largement utilisés en chimiothérapie anticancéreuse.

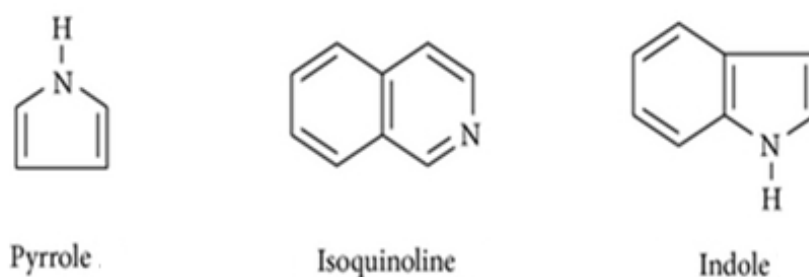


Fig. I.5 : Structure de base typique des alcaloïdes [25].

I.5.4 Les composés organosoufrés

Les composés organosoufrés (figure I.6) se trouvent principalement dans les légumes des familles *Allium* et *Brassica*, l'ail, les légumes crucifères et le brocoli, possède de puissants effets antioxydants, anticancéreux, antimicrobiennes et anticancéreuses [26].

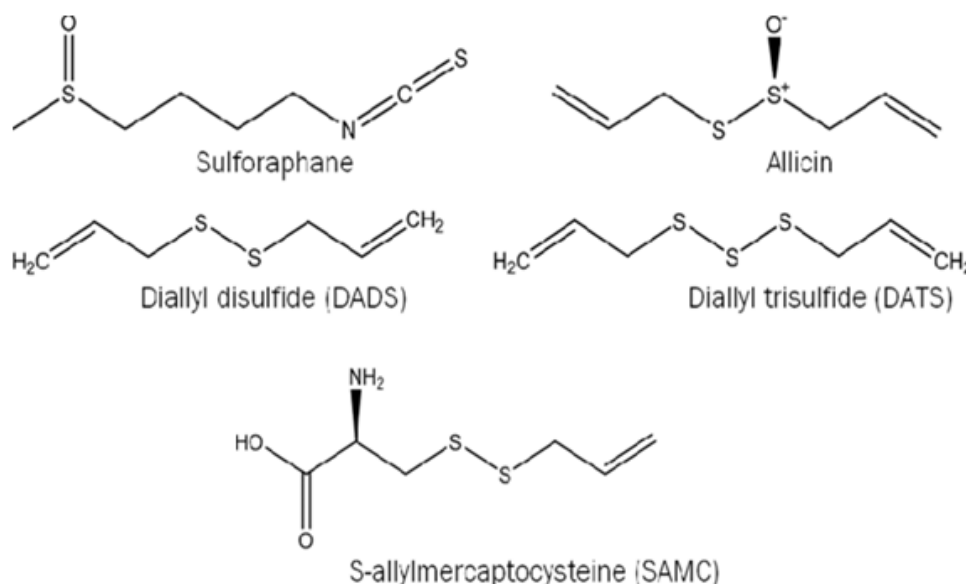


Fig. I.6 : Structure chimique des composés organosoufrés [27].

I.6 Propriétés biologiques et fonctionnelles

Les activités biologiques des composés bioactifs sont médiées par de multiples mécanismes, notamment les effets antioxydants directs, la modulation de l'activité enzymatique, l'interaction avec les récepteurs cellulaires et la régulation d'expression génique [1].

1.6.1 Activité antioxydante

Le stress oxydatif, résultant d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et les défenses antioxydantes, est impliqué dans de nombreuses maladies chroniques, notamment les maladies cardiovasculaires, le cancer et les troubles neurodégénératifs [2].

1.6.2 Activité anti-inflammatoire

L'inflammation chronique constitue un mécanisme pathologique central dans le syndrome métabolique, les maladies cardiovasculaires, le cancer et les troubles auto-immuns [8]. Les composés bioactifs modulent les réponses inflammatoires par plusieurs voies :

I.6.3 Activité anticancéreuse

Les composés bioactifs interfèrent avec plusieurs stades de la cancérogenèse, notamment l'initiation, la promotion et la progression tumorale [18].

I.6.4 Activité cardioprotectrice

Les maladies cardiovasculaires demeurent la principale cause de mortalité dans le monde [28].

I.6.5 Activité neuroprotectrice

Les maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer et Parkinson sont associées au stress oxydatif, à l'inflammation chronique et à l'agrégation anormale de protéines [29].

I.6.6 Activité antimicrobienne

Les composés bioactifs sont reconnus pour leur capacité à inhiber la croissance de divers micro-organismes, notamment les bactéries, les champignons et les virus [30].

I.7. Importance nutritionnelle, pharmaceutique et industrielle**I.7.1 Importance nutritionnelle**

Les composés bioactifs contribuent de manière significative aux propriétés santé des aliments, au-delà de leur valeur nutritionnelle de base [1]. Ils exercent des effets protecteurs contre les maladies chroniques par de multiples mécanismes [2]. Les sous-produits d'olivier, riches en composés phénoliques (hydroxytyrosol, oleuropéine, tyrosol), en fibres alimentaires et en acides gras insaturés, sont de plus en plus intégrés dans des produits alimentaires fonctionnels [3]. Par ailleurs, les fibres alimentaires issues de ces sous-produits possèdent des propriétés prébiotiques qui stimulent les bactéries intestinales bénéfiques et favorisent la production d'acides gras à chaîne courte [7].

Tableau 1 : Teneur en composés phénoliques totaux de différentes sources végétales

Source	TPC (mg EAG/100 g MS)	Composés bioactifs principaux
Grignon d'olive	3 000 - 7 000	Hydroxytyrosol, oléuropéine, tyrosol
Marc de raisin	1 500 - 3 000	Anthocyanes, resvératrol, catéchines

Écorces d'agrumes	1 200 - 2 500	Hespéridine, naringine, limonène
Marc de pomme	800 - 1 800	Phloridzine, acide chlorogénique, quercétine
Marc de tomate	600 - 1 500	Lycopène, naringénine, quercétine

I.7.2 Importance pharmaceutique

Les composés bioactifs issus du grignon d'olive constituent des sources précieuses pour des applications pharmaceutiques en raison de leurs activités thérapeutiques démontrées [8].

I.7.3 Importance industrielle

Les composés bioactifs issus du grignon d'olive présentent un intérêt dans plusieurs secteurs industriels (tableau 2), contribuant au développement durable et aux principes de l'économie circulaire [21]. Dans l'industrie alimentaire, ces extraits sont utilisés comme conservateurs naturels en remplacement des additifs synthétiques [22]. L'incorporation de 0,1 à 0,5 % d'extrait phénolique de grignon d'olive prolonge la durée de conservation en inhibant l'oxydation lipidique [31].

Tableau 2 : Applications industrielles des extraits de grignon d'olive.

Application	Type d'extrait	Concentration	Fonction
Produits carnés	Phénoliques de grignon	0,1 - 0,5 %	Antioxydant, antimicrobien
Huiles alimentaires	Concentré d'hydroxytyrosol	50 - 250 ppm	Amélioration de la stabilité oxydative
Produits de boulangerie	Extrait de grignon	1 - 5 %	Antioxydant naturel
Emballage actif	Films phénoliques	2 - 10 %	Revêtement antimicrobien

I.8 Facteurs influençant la teneur en composés bioactifs

I.8.1 Facteurs génétiques

La variété et le cultivar végétal influencent significativement la teneur en composés bioactifs en raison de polymorphismes génétiques affectant l'expression des enzymes biosynthétiques. Pour les cultivars Algériens d'olivier, des variations considérables existent entre les principales variétés cultivées. La variété Chemlal, prédominante en Kabylie, est caractérisée par des teneurs élevées en phénoliques totaux (450-650 mg/kg d'huile), avec des concentrations en hydroxytyrosol de 12 à 25 mg/kg. La variété Sigoise de l'Ouest Algérien présente des teneurs phénoliques plus faibles (280-420 mg/kg) mais un rendement en huile plus élevé. Le cultivar Azeradj de la région de Bouira se distingue par une teneur phénolique exceptionnellement élevée (580-750 mg/kg), avec des concentrations en oleuropéine supérieures de 35 à 50 % à celles de la Blanquette de Guelma [32].

I.8.2 Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux (tableau 3) jouent un rôle déterminant dans la biosynthèse des composés bioactifs d'olivier :

- ❖ L'intensité lumineuse constitue un facteur important ; l'exposition directe au soleil augmente la teneur en phénoliques totaux de 30 à 50 % par rapport aux fruits ombragés. La température exerce également une influence significative ; des températures modérées (18-25 °C) favorisent l'accumulation des polyphénols, tandis que des températures élevées (>35 °C) peuvent diminuer la teneur en oleuropéine de 25 à 40 % en raison d'une activité accrue de la polyphénol oxydase [33].
- ❖ La disponibilité en eau représente un autre facteur clé ; une irrigation déficitaire contrôlée (50-75 % des besoins totaux) augmente la teneur en polyphénols totaux [34].
- ❖ Enfin, la composition du sol influence la biosynthèse ; une fertilisation azotée excessive (>120 kg N/ha) peut réduire la teneur en phénoliques de 15 à 30 %, tandis qu'une fertilisation potassique (80-120 kg K₂O/ha) augmente la teneur en phénoliques de 12 à 25 % [35].

Tableau 3 : Effets des facteurs environnementaux sur la teneur en composés bioactifs d'olive

Facteur	Effet	Exemple

Rayonnement UV-B	Augmente les composés phénoliques de 20 à 60 %	↑ Hydroxytyrosol (45–60 %)
Température élevée (> 30 °C)	Diminue la teneur en composés phénoliques	↓ Oléuropéine (25–40 %)
Stress hydrique modéré	Augmente les composés phénoliques de 20 à 50 %	↑ Phénoliques totaux (20–40 %)
Fertilisation azotée élevée	Diminue la production de métabolites secondaires	↓ Phénoliques (15–30 %)
Fertilisation organique	Augmente la biosynthèse des composés bioactifs	↑ Phénoliques (10–20 %)

I.8.3 Pratiques agronomiques

Les pratiques culturales influencent significativement l'accumulation des composés bioactifs dans l'olivier :

- ❖ Le mode de culture biologique confère aux olives une teneur en polyphénols totaux supérieurs de 20 à 32 % [36].
- ❖ La gestion d'irrigation par la méthode d'irrigation déficitaire contrôlée (50-60 % de l'évapotranspiration totale) pendant le stade de durcissement du noyau peut augmenter la teneur en phénoliques d'huile d'olive de 30 à 45 % [37].
- ❖ Concernant la maturité à la récolte, les composés phénoliques atteignent leurs niveaux les plus élevés au stade de virage du vert au noir ; à mesure que les fruits atteignent la maturité complète, la teneur en phénoliques diminue généralement de 30 à 50 % [38].

I.8.4 Facteurs post-récolte

Les procédés de transformation influencent considérablement la rétention des composés bioactifs. Les technologies douces telles que les hautes pressions et la lyophilisation permettent de préserver jusqu'à 85-95 % des composés phénoliques, tandis que les traitements

thermiques intenses comme la stérilisation (121 °C, 15 min) peuvent réduire leur rétention à 60-75 % [39].

Références bibliographiques

- [1]. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. 2020; 83(3): 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- [2]. Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*. 2009; 25(11–12): 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>
- [3]. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79(5): 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- [4]. de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *The Lancet*. 1994; 343(8911): 1454–1459. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92580-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92580-1)
- [5]. Servili M, Sordini B, Esposto S, et al. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*. 2014; 3(1): 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>
- [6]. Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*. 2011; 83: 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.036>.
- [7]. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*. 2009; 26(8): 1001–1043. <https://doi.org/10.1039/B802662A>
- [8]. López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, et al. Olive oil and health: summary of the II

- international conference on olive oil and health consensus report. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2010; 20(4): 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.12.007>
- [9]. Galanakis CM. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2012; 26(2): 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>.
- [10]. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*. 2009; 26(8): 1001–1043. <https://doi.org/10.1039/B802662A>
- [11]. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*. 2002; 113(9): 71–88. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)00995-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(01)00995-0)
- [12]. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2(12): 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>.
- [13]. Ashihara H, Sano H, Crozier A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*. 2008; 69(4): 841–856. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.029>.
- [14]. Khan S. Plant bioactive compounds: extraction, biological activities, immunological, nutritional aspects, food application, and human health benefits—A comprehensive review. *Frontiers in Nutrition*. 2025; 12: 1659743. <https://doi.org/10.3389/fnut.2025.1659743>
- [15]. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009; 2(5): 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- [16]. Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*. 2007; 3(7): 408–414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>.
- [17]. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. *Carotenoids Handbook*. Basel: Birkhäuser; 2004. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7836-4>
- [18]. Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005; 26(6): 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>
- [19]. Giovannucci E. A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Experimental Biology and Medicine*. 2002; 227(10): 852–859.

<https://doi.org/10.1177/153537020222701003>

[20]. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(2): 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

[21]. Dzubak P, Hajduch M, Vydra D. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*. 2006; 23(3): 394–411. <https://doi.org/10.1039/B515312N>

[22]. Wink M. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Natural Product Communications*. 2008; 3(8): 1205–1216. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300801>.

[23]. Anonyme. Structure chimique des chémotypes contenus dans les huiles essentielles. https://www.researchgate.net/figure/Structure-chimique-des-chemotypes-contenus-dans-les-huiles-essentielles_fig1_334268132

[24]. Hagel JM, Facchini PJ. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*. 2013; 54(5): 647–672. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct020>

[25]. Aniszewski T. Alkaloids: Secrets of Life – Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Elsevier; 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52736-5.X5000-1>

[26]. Shang A, Cao SY, Xu XY. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*. 2019; 8(7): 246. <https://doi.org/10.3390/foods8070246>

[27]. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Journal of Nutrition*. 2006; 136(3 Suppl): 716S–725S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.3.716S>.

[28]. Libby P, Buring JE, Badimon L. Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019; 5:56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>

[29]. Swomley AM, Butterfield DA. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Archives of Toxicology*. 2015; 89(10): 1669–1680. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1556-z>.

[30]. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12(4): 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>

[31]. Rodríguez G, Lama A, Rodríguez R. Olive stone: an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*. 2008; 99(13): 5261–5269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.027>.

- [32]. Touati N, Dib MA, Allali H. Geographical location and cultivar-linked changes on chemical properties of olive oils from Algeria. *Food Science & Nutrition*. 2022; 10(7): 2198–2210. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2810>
- [33]. Fini A, Brunetti C, Di Ferdinando M. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(5):709–711. <https://doi.org/10.4161/psb.6.5.15069>
- [34]. Patumi M, d'Andria R, Marsilio V. Olive and olive oil quality after intensive monocone olive growing in different irrigation regimes. *Food Chemistry*. 2002; 77(1): 27–34. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00317-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00317-X).
- [35]. Erel R, Dag A, Ben-Gal A. Flowering and fruit set of olive trees in response to nitrogen, phosphorus, and potassium. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2008; 133(5): 639–647. <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.5.639>
- [36]. Barański M, Średnicka-Tober D, Volakakis N. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations in organically grown crops. *British Journal of Nutrition*. 2014; 112(5): 794–811. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001366>
- [37]. Dag A, Ben-Gal A, Yermiyahu U. The effect of irrigation level and harvest mechanization on virgin olive oil quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008;88(9):1524–1528. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3243>.
- [38]. Gómez-Rico A, Salvador MD, Fregapane G. Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management. *Food Research International*. 2009; 42(7): 885–891. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.020>
- [39]. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews*. 2010; 68(4): 191–206. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00278.x>

Chapitre II:
Méthodes
d'extraction

II.1 Introduction

L'extraction des composés végétaux est pratiquée depuis l'Antiquité et continue aujourd'hui de susciter un grand intérêt. Grâce aux avancées technologiques, il est désormais possible d'obtenir des extraits avec des rendements plus élevés. Bien que le rendement global constitue un paramètre essentiel pour évaluer l'efficacité d'un procédé d'extraction, il peut être particulièrement intéressant de cibler l'extraction de certains composés spécifiques (métabolites d'intérêt) afin d'enrichir l'extrait obtenu tout en limitant la présence de composés indésirables, tels que les métabolites primaires (glucides, triacylglycérols, etc.). Dans ce contexte, l'amélioration de la sélectivité d'extraction devient un objectif majeur [5, 7].

Dans l'extraction solide-liquide, communément appelée macération, le choix du solvant joue un rôle déterminant dans la sélectivité du procédé. Sa polarité influence directement la nature des composés extraits, en fonction de leur structure chimique. Ainsi, la modélisation des interactions entre les composés et les solvants, à l'aide de différentes échelles de polarité ou de paramètres d'interaction, représente un défi important pour identifier le liquide extracteur le plus approprié [8, 9]. Cependant, les progrès technologiques ont également favorisé le développement des techniques d'extraction modernes, souvent considérées comme plus respectueuses de l'environnement. Parmi celles-ci figurent l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'extraction par liquide pressurisé (PLE) et l'extraction par fluide supercritique (SFE). Cette revue met en évidence les particularités de ces techniques récentes ainsi que l'influence de leurs paramètres physiques, tels que la pression, l'intensité ou d'autres conditions opératoires. En complément du choix du solvant, qui demeure un facteur primordial, les paramètres physiques propres à chaque technique exercent une influence significative sur les performances et les résultats de l'extraction [5, 7, 10].

II.2 Historique

L'extraction des composés bioactifs remonte aux civilisations anciennes, où les plantes médicinales étaient préparées à l'aide de méthodes empiriques telles que la macération, l'infusion, la décoction et le pressage. Les Égyptiens, les Chinois, les Indiens et les Grecs utilisaient principalement l'eau, les huiles, le vin et le vinaigre comme solvants pour extraire des substances thérapeutiques à partir de ressources naturelles. Ces pratiques ont constitué les bases des systèmes médicaux traditionnels tels que l'Ayurveda et la médecine traditionnelle

chinoise, dans lesquels les extraits végétaux étaient utilisés sans isolement préalable des principes actifs [1, 2].

La Renaissance a marqué des progrès importants dans les débuts de la chimie, favorisant l'évolution des techniques d'extraction. La distillation s'est largement développée pour la production d'huiles essentielles, tandis que l'éthanol est devenu un solvant privilégié pour la préparation des teintures et des extraits végétaux. Cette période a représenté une transition d'une approche empirique vers une démarche plus scientifique, posant ainsi les bases de la pharmacognosie, discipline dédiée à l'étude des substances médicinales d'origine naturelle [3].

Le XIX^{ème} siècle constitue une étape clé dans l'histoire d'extraction grâce à l'isolement de composés bioactifs purs à partir des plantes. Parmi les découvertes majeures figurent l'isolement de la morphine de l'opium, de la quinine de l'écorce de quinquina et de la caféine du café et du thé. Ces progrès ont été rendus possibles grâce au développement des techniques d'extraction par solvants, d'extraction acido-basique et de cristallisation, permettant l'identification des molécules responsables des effets biologiques [4, 5]. Au XX^{ème} siècle, les avancées en chimie organique et en sciences analytiques ont considérablement amélioré les procédés d'extraction. Des techniques comme l'extraction Soxhlet, l'extraction liquide-liquide et la distillation à la vapeur sont devenues des méthodes de référence dans les industries pharmaceutique et agroalimentaire. Parallèlement, le développement des méthodes chromatographiques et spectroscopiques a permis d'améliorer la purification, l'identification et le contrôle de qualité des composés bioactifs [5, 6].

Au cours des dernières décennies, la recherche s'est orientée vers des procédés d'extraction plus efficaces, sélectifs et respectueux à l'environnement. Des technologies innovantes telles que l'extraction par fluide supercritique, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction assistée par ultrasons et l'extraction par liquide pressurisé ont été développées afin de réduire la consommation de solvants, le temps d'extraction et la dépense énergétique, tout en préservant les composés thermosensibles. Ces méthodes, qualifiées de « technologies vertes », représentent aujourd'hui les approches les plus avancées pour l'extraction des composés bioactifs à partir de ressources naturelles [7-10].

II.3 Processus d'extraction des composés bioactifs

Compte tenu de la grande diversité des composés bioactifs et du nombre important d'espèces végétales, il est essentiel de développer une méthode standardisée et harmonisée permettant d'identifier et d'isoler efficacement les composés présentant des effets bénéfiques pour la santé humaine. L'extraction des composés bioactifs à partir de sources végétales s'effectue à travers plusieurs étapes, notamment l'extraction, la filtration, l'évaporation, la récupération du solvant et le séchage [5, 6].

Le processus d'extraction peut être réalisé à l'aide de méthodes conventionnelles ou de techniques avancées, selon l'efficacité recherchée et la sensibilité des composés à extraire. Toutes ces techniques poursuivent des objectifs communs [5, 6] :

- Extraire des composés bioactifs spécifiques à partir de matrices végétales complexes,
- Améliorer la sélectivité des méthodes analytiques,
- Augmenter la sensibilité des bioessais en concentrant les composés ciblés,
- Transformer les composés bioactifs sous une forme plus adaptée à leur détection et à leur séparation,
- Mettre au point une méthode robuste et reproductible, capable de fournir des résultats constants malgré les variations de la matrice végétale.

La première étape consiste à sélectionner une espèce végétale pertinente. Les espèces végétales et les parties de plantes choisies sont ensuite soumises à un criblage à l'aide des méthodes phytochimiques disponibles afin d'évaluer leur potentiel [11]. L'échantillon végétal est ensuite séché puis réduit en poudre afin d'obtenir une matière première adaptée aux analyses et aux traitements ultérieurs. Après l'extraction, différentes opérations de purification peuvent être réalisées selon les objectifs d'étude. L'extrait est finalement séché afin d'éliminer toute trace résiduelle d'humidité ou de solvant, permettant ainsi d'obtenir un produit purifié prêt à être utilisé dans diverses applications. L'étape finale du processus est la caractérisation des composés actifs extraits. Celle-ci repose généralement sur plusieurs techniques analytiques et chromatographiques, notamment la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur colonne, la chromatographie liquide haute performance (HPLC), ainsi que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la spectroscopie par

résonance magnétique nucléaire (RMN), l'électrophorèse capillaire couplée à un détecteur à réseau de diodes (CE-DAD), l'ionisation par électrospray et d'autres techniques similaires. Ces méthodes sont utilisées individuellement ou de manière complémentaire afin d'identifier les composés spécifiques et les principes actifs présents dans les plantes, en fonction des objectifs et des exigences de chaque étude [12].

II.4 Méthodes conventionnelles d'extraction

Depuis des siècles, les techniques d'extraction conventionnelles sont utilisées pour isoler les substances bioactives à partir de diverses matières végétales. Ces méthodes sont relativement simples à mettre en œuvre et nécessitent un équipement peu complexe. Elles demeurent largement employées dans les productions artisanales, les laboratoires à petite échelle ou les contextes disposant de ressources limitées [11].

II.4.1 Macération

La macération consiste à découper, broyer ou réduire le matériel végétal en petits fragments, puis à le faire tremper dans un solvant pendant une période prolongée à température ambiante. Cette méthode permet au solvant de pénétrer progressivement dans les tissus végétaux et d'en extraire les composés d'intérêt [13, 14].

II.4.2 Percolation

La percolation repose sur le passage continu d'un solvant à travers le matériel végétal. Au cours de son écoulement, le solvant dissout et entraîne les composés bioactifs présents dans la plante, ce qui en fait une technique particulièrement adaptée à la production d'extraits végétaux à grande échelle [11, 15].

II.4.3 Infusion

L'infusion est une méthode d'extraction utilisée pour les matières végétales tendres telles que les feuilles séchées, les fleurs ou les herbes aromatiques. Elle consiste à verser de l'eau chaude ou un autre solvant approprié sur le matériel végétal et à le laisser reposer pendant une durée déterminée afin de permettre l'extraction des composés actifs [11, 16].

II.4.4 Décoction

La décoction est une méthode employée pour extraire les composés présents dans les parties végétales dures telles que les racines, les écorces et les graines. Elle consiste à faire bouillir ces matériaux dans l'eau pendant une période prolongée afin de favoriser la libération des substances actives [11, 17].

II.4.5 Distillation à la vapeur d'eau

La distillation à la vapeur d'eau (figure II.1) est une technique d'extraction qui consiste à produire de la vapeur par chauffage d'eau.

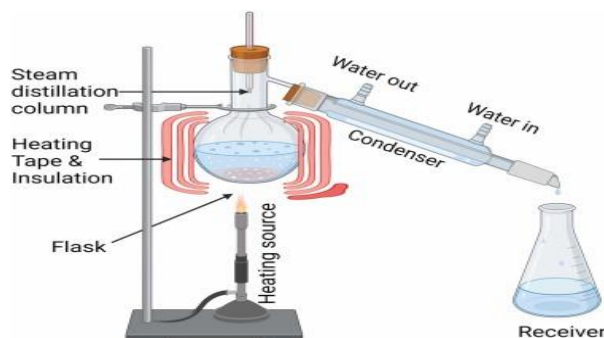


Fig. II.1 : Schéma illustrant le principe de la distillation à la vapeur d'eau [18].

Cette vapeur traverse ensuite le matériel végétal placé dans une chambre distincte, provoquant la vaporisation des composés volatils qu'il contient. Les vapeurs obtenues sont ensuite condensées pour être récupérées sous forme liquide, permettant ainsi la collecte des huiles essentielles ou d'autres composés aromatiques [18].

II.4.6 Expression ou pression à froid

L'expression, également appelée pression à froid (figure II.2), est une technique d'extraction qui permet d'obtenir des huiles essentielles à partir de matières végétales par simple pression mécanique, sans recours à la chaleur ni à des solvants. Cette méthode préserve au mieux les composés aromatiques et les propriétés naturelles des substances extraites [19].

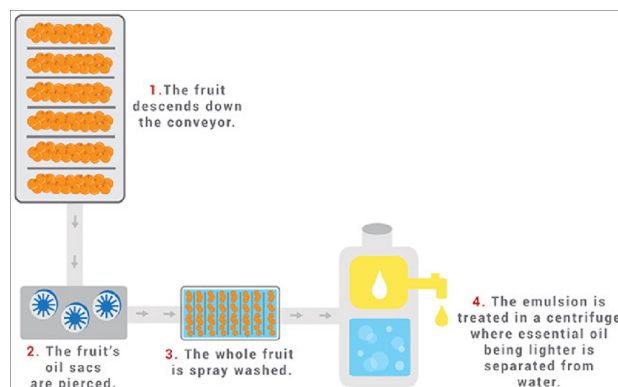


Fig. II.2 : Schéma illustrant le principe de la méthode d'extraction des huiles essentielles par pression à froid [19].

II.4.7 Extraction Soxhlet

L'extraction Soxhlet (figure II.3) est une méthode d'extraction continue dans laquelle le solvant passe de manière répétée à travers l'échantillon.

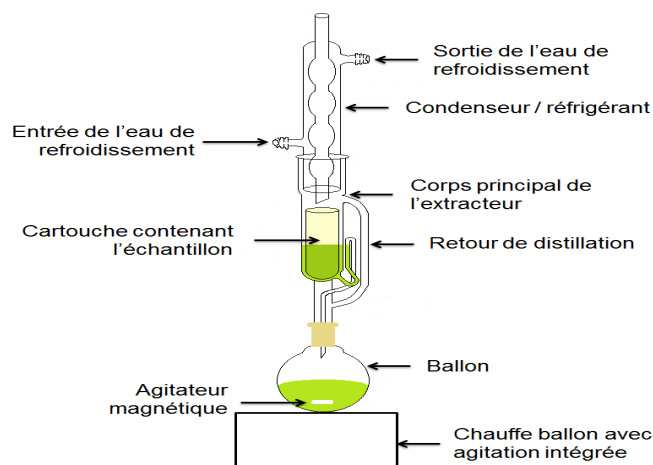


Fig. II.3 : Extraction par solvant à travers l'appareil de Soxhlet.

Le solvant est chauffé, vaporisé puis condensé, ce qui lui permet de dissoudre les composés recherchés présents dans l'échantillon solide. Ce cycle se répète jusqu'à l'obtention d'une extraction complète des substances d'intérêt [20, 21].

II.4.8 Digestion

La digestion est une méthode simple d'extraction dans laquelle l'échantillon est immergé dans un solvant puis chauffé pendant une durée déterminée, généralement à une température contrôlée. Cette technique permet aux composés d'intérêt de se dissoudre progressivement dans le solvant d'extraction [11].

II.4.9 Extraction par reflux

L'extraction par reflux (figure II.4) consiste à chauffer le solvant en présence d'échantillon dans des conditions de reflux. Au cours du processus, le solvant s'évapore, se condense puis retourne dans le récipient d'extraction sous forme de gouttelettes. Cela permet un contact continu entre le solvant et la matière à extraire, favorisant ainsi l'extraction des composés recherchés [11, 22].

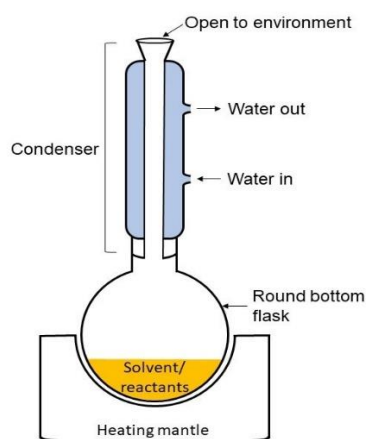


Fig. II.4 : Appareil d'extraction par reflux [22].

II.5 Méthodes modernes d'extraction

II.5.1 Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE), également appelée extraction par micro-ondes (figure II.5), est une technique récente d'extraction des produits naturels qui utilise l'action combinée des micro-ondes et des solvants au cours du procédé d'extraction. Les micro-ondes utilisées dans cette technique possèdent généralement une fréquence comprise entre 300 MHz et 300 GHz. Au cours du processus d'extraction, les micro-ondes chauffent directement le solvant ainsi que les tissus végétaux, ce qui permet d'accélérer la cinétique d'extraction [12]. La viscosité du solvant joue également un rôle important dans le processus d'extraction. Un solvant de faible viscosité favorise la dispersion des ions et améliore ainsi le phénomène de solvation, ce qui facilite l'extraction des composés d'intérêt [23]. Le mécanisme d'extraction repose sur plusieurs étapes successives : la diffusion du solvant à l'intérieur de l'échantillon, la séparation des solutés de leurs sites de fixation dans la matrice végétale, puis leur libération et leur dissolution dans le solvant. Cette technique présente l'avantage de préserver efficacement les activités biologiques des extraits obtenus, tout en réduisant généralement le temps d'extraction [24].

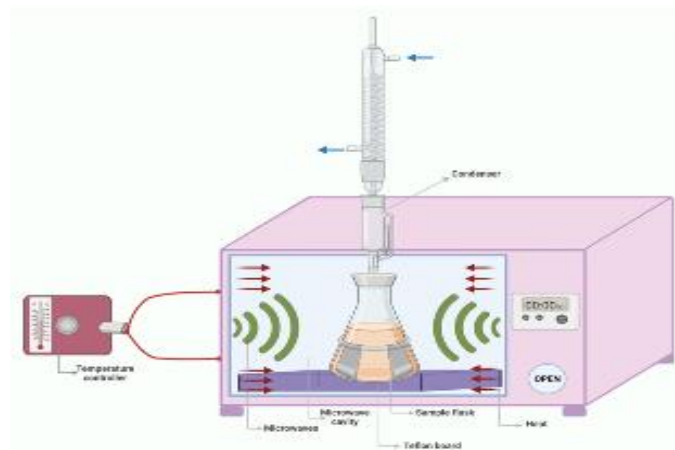


Fig. II.5 : Schéma illustrant le principe d'extraction assistée par micro-ondes (MAE) [24].

II.5.2 Extraction assistée par bain à ultrasons (UAE)

L'extraction assistée par bain à ultrasons (figure II.6) est une technique d'extraction verte largement utilisée pour récupérer les composés bioactifs à partir de matrices végétales. Elle repose sur la propagation d'ondes ultrasonores (> 20 kHz) dans un solvant, provoquant un phénomène de cavitation acoustique. Les bulles de cavitation se forment, grossissent puis implosent, générant localement des températures et des pressions élevées. Cette implosion entraîne la rupture des parois cellulaires, l'augmentation de la surface de contact entre le solvant et la matrice végétale ainsi qu'une amélioration du transfert de matière, ce qui favorise la libération des composés intracellulaires dans le solvant. L'UAE présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes conventionnelles d'extraction, notamment une réduction du temps d'extraction, une diminution de la consommation de solvants, une meilleure efficacité d'extraction et une préservation accrue des composés thermosensibles grâce à l'utilisation de températures relativement faibles. Cette technique est aujourd'hui considérée comme l'une des méthodes les plus prometteuses pour l'extraction des polyphénols, flavonoïdes, saponines, protéines et autres métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique, alimentaire et cosmétique [25, 26].

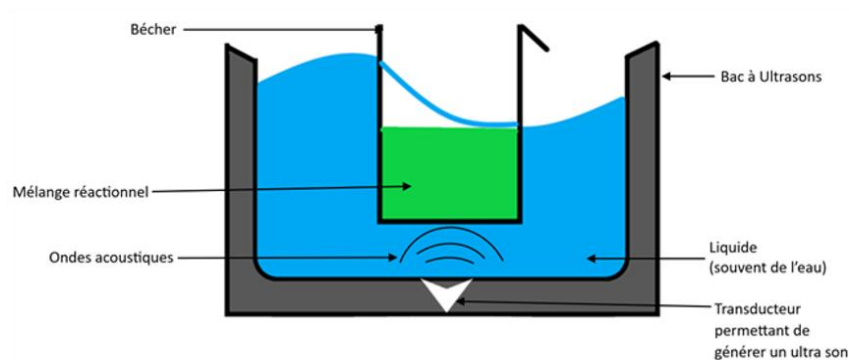


Fig. II.6 : Schéma illustrant le principe d'extraction assistée par bain à ultrasons (UAE) [26].

II.5.3 Extraction par fluide supercritique (SFE)

La technologie d'extraction par fluide supercritique est largement utilisée pour l'extraction de composés de valeur à partir de différentes sources à l'échelle industrielle. Cette technique présente un fort potentiel pour la récupération de molécules d'intérêt présentes dans les produits alimentaires. La SFE (figure II.7) est basée sur les modifications de température et de pression permettant à un gaz d'atteindre un état où les phases liquide et gazeuse ne sont plus distinguables.

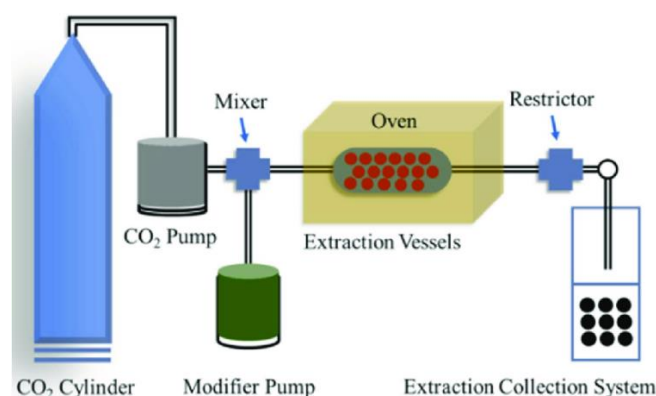


Fig. II.7 : Schéma illustrant le principe d'extraction par fluide supercritique et subcritique (SFE) [27].

À son point critique, un fluide supercritique possède à la fois les propriétés physiques d'un liquide et celles d'un gaz. La zone critique d'un fluide supercritique est définie par sa température et sa pression. Lorsque la température dépasse la température critique (T_c) et que la pression dépasse la pression critique (P_c), le fluide atteint son point critique, où les phases liquide et gazeuse deviennent indiscernables. Cette technique comprend deux étapes

principales : la solubilisation des composés extractibles et leur séparation. Le solvant traverse le lit de matière première et dissout les composés présents dans l'échantillon. Par la suite, le fluide quitte l'extracteur et, sous l'effet d'une augmentation de la température et d'une diminution de la pression, les composés extraits sont séparés du solvant, permettant ainsi d'obtenir un extrait pratiquement exempt de résidus de solvant [27].

II.5.4 Extraction assistée par enzymes (EAE)

Dans certaines plantes, il est difficile d'extraire les composés phytochimiques en raison de leur association avec le réseau polysaccharidique et lignifié de la paroi cellulaire, stabilisé par des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes telles que les forces de Van der Waals. Ces composés, dispersés dans le cytoplasme cellulaire, restent souvent inaccessibles lors des procédés d'extraction conventionnels. Afin d'améliorer leur libération, le matériel végétal peut être prétraité avec des enzymes spécifiques, permettant ainsi d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés [28].

Au cours de l'extraction, les enzymes favorisent la dégradation des parois cellulaires et facilitent la libération des composés bioactifs. Deux principales approches reposent sur l'utilisation d'enzymes : l'extraction aqueuse assistée par enzymes et le pressage à froid assisté par enzymes. La première est principalement utilisée pour l'extraction des huiles à partir de diverses graines, tandis que la seconde permet l'hydrolyse des parois cellulaires des graines végétales. L'EAE est souvent combinée à d'autres techniques d'extraction, car l'action enzymatique rend accessibles au solvant des composés auparavant non extractibles, améliorant ainsi l'efficacité globale du procédé. Les conditions opératoires, notamment la concentration en enzyme et le pH du milieu, dépendent de la nature de l'enzyme utilisée ainsi que de son mécanisme d'action [29].

II.5.5 Extraction par eau chaude sous pression (PHWE)

L'extraction par eau chaude sous pression (figure II.8) est une technique qui utilise l'eau comme solvant d'extraction à haute température sous pression contrôlée. Cette méthode suscite un intérêt croissant en tant qu'alternative aux techniques d'extraction conventionnelles, notamment en raison de son caractère écologique et de sa capacité à fournir des rendements d'extraction élevés [30, 31].

Le principe de cette technique repose sur le maintien de l'eau à l'état liquide grâce à l'application d'une pression élevée. Une pression d'environ 5 MPa permet de conserver l'eau

sous forme liquide dans une plage de température comprise entre 100 et 250 °C. Comparée à de nombreux solvants organiques, l'eau utilisée dans le procédé PHWE s'est révélée particulièrement efficace pour l'extraction des composés phytochimiques [29, 30].

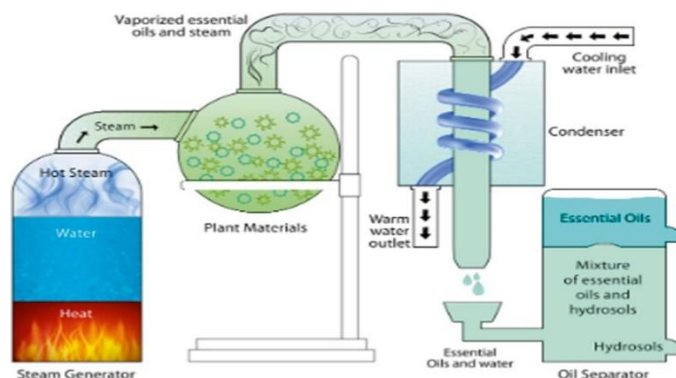


Fig. II.8 : Schéma illustrant le principe d'extraction par eau chaude sous pression [29].

II.6 Paramètres influençant l'efficacité d'extraction

L'efficacité du procédé d'extraction dépend fortement de plusieurs variables, notamment le temps, le rapport solide/solvant, la température, le pH du milieu et la taille des particules de la matrice. Ces paramètres jouent un rôle essentiel dans le rendement d'extraction, la composition des composés extraits ainsi que l'activité antioxydante d'extrait obtenu [32-34].

II.6.1 Temps, température et rapport solide/solvant

Le temps d'extraction, la température ainsi que le rapport solide/solvant sont des facteurs déterminants qui doivent être soigneusement optimisés afin de réduire la consommation énergétique des procédés d'extraction. Des études ont montré que l'augmentation du temps et de la température améliore la solubilité des solutés et accélère leur diffusion, ce qui permet d'augmenter l'efficacité d'extraction. Cependant, au-delà d'un certain seuil, l'augmentation de ces paramètres peut entraîner la dégradation de composés sensibles tels que les composés phénoliques. Par ailleurs, un faible rapport solide/solvant est généralement associé à un rendement d'extraction plus élevé, mais des valeurs trop faibles peuvent conduire à une consommation excessive de solvant et à des temps de concentration plus longs. Ainsi, à faibles rapports solide/solvant, les différences de rendement deviennent souvent limitées, ce qui explique pourquoi ce paramètre est généralement optimisé à une valeur précise [29, 32].

II.6.2 pH du milieu

Le rendement d'extraction chimique dépend également du type de solvant utilisé, de sa polarité ainsi que du pH du milieu, à conditions égales de temps et de température. L'hydrolyse alcaline douce permet de rompre les liaisons ester et de libérer les composés phénoliques esterifiés, tandis que les conditions acides favorisent la rupture des liaisons éther, libérant ainsi d'autres composés phénoliques. Pour cette raison, de nombreuses méthodes d'extraction utilisent des conditions acides ou alcalines modérées. Cependant, l'hydrolyse alcaline a notamment montré une efficacité élevée pour l'extraction des glycosides d'acides hydroxycinnamiques à partir des graines de lin. De plus, des acides organiques tels que l'acide formique, acétique ou citrique, ainsi que de faibles concentrations d'acides forts comme l'acide trifluoroacétique (TFA) ou l'acide chlorhydrique (HCl), sont recommandés pour l'extraction optimale des flavonoïdes. Toutefois, l'utilisation de HCl doit être contrôlée car il peut dégrader certains groupes acyles [33].

II.6.3 Taille des particules de la matrice

La taille des particules de l'échantillon est un facteur clés influençant le rendement d'extraction. Des particules plus petites favorisent un meilleur transfert de masse, car elles réduisent la distance que le solvant doit parcourir pour pénétrer dans la matrice solide. La diminution de la taille des particules augmente la surface de contact entre le solvant et l'échantillon, ce qui améliore l'efficacité d'extraction et augmente le rendement global [32, 34].

II.7 Conclusion

L'intérêt pour la recherche sur les produits naturels est important à l'échelle mondiale. L'extraction des composés bioactifs constitue une étape essentielle dans ce domaine et représente souvent un facteur limitant dans l'accélération du criblage de nouveaux produits. Actuellement, l'extraction consiste à séparer les molécules actives issues des tissus végétaux des composants inertes, en utilisant soit des techniques traditionnelles par solvants, soit des procédés modernes et dits « verts ».

Le choix de la méthode d'extraction est crucial, car il détermine la fiabilité et la qualité des analyses ultérieures. L'objectif principal est d'obtenir un procédé économiquement viable, respectueux à l'environnement, avec un temps d'extraction réduit et un meilleur rendement en composés bioactifs, tout en préservant leurs activités biologiques. Les études montrent que les

techniques modernes présentent plusieurs avantages significatifs par rapport aux méthodes conventionnelles.

Références bibliographiques

- [1]. Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl. 1), 69–75. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s169>
- [2]. Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (3rd ed.). Chapman & Hall. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2015.611054>
- [3]. Cragg, G. M., Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- [4]. Kinghorn, A. D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J. (2011). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-37865-3>
- [5]. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- [6]. Sticher, O. (2008). Natural product isolation. *Natural Product Reports*, 25(3), 517–554. <https://doi.org/10.1039/c3np20106f>
- [7]. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3218439/>
- [8]. Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- [9]. Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S. (2017). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products. *Molecules*, 22(4), 629. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- [10]. Mustafa A, Turner C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*. 703(1):8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- [11]. C. Bitwell, Indra S Sen, C. Luke, M.K. Kakoma. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from

- plants Vol. 19, Scientific African, Elsevier B.V. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227623000443>
- [12]. D.V., Navarrete-Carriola, A.D. Paz-González, L.K. Vázquez-Jiménez, E. De Luna-Santillana, M.A. Cruz-Hernández, D. Bandyopadhyay. (2024). Comparative analysis of a secondary metabolite profile from roots and leaves of *iostephane heterophylla* by UPLC-MS and GC-MS, 9, ACS Omega, pp. 5429-5439. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsomega.3c06800>
- [14]. Azmir, J. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- [15]. C.A., Keyes, K.R. Giltrow, T.J. Mahon. (2024). A comparison of maceration methods for the preparation of infant skeletal remains for forensic anthropological analysis *Int. J. Legal Med.*, 138 (3), pp. 1085-1092. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00414-023-03137-4>
- [16]. Y., Bylappa, B. Balasubramanian, S. Park, K.S. Joseph, A. Mathew Chacko, W. Narasimha Sudheer. (2024). Three decades of advances in extraction and analytical techniques for guava (*Psidium guajava* L.): a review Vol. 10, *Results in Chemistry*, Elsevier B.V. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211715624004041>
- [17]. R.A., González-Hernández, N.A. Valdez-Cruz, M.A. Trujillo-Roldán. (2024). Factors that influence the extraction methods of terpenes from natural sources Vol. 78, *Chemical Papers*, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 2783-2810. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11696-024-03339-z>
- [18]. Y.A., Bhadange, J. Carpenter, V.K. Saharan. (2024). A comprehensive review on advanced extraction techniques for retrieving bioactive components from natural sources Vol. 9, *ACS Omega*, American Chemical Society, pp. 31274-31297. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsomega.4c02718>
- [19]. K., Ashokkumar, M. Dharshini, T. Janani, V. Shrivani Sri, R (2024). *Subhasidha Nyctan the sarbor-tristis* Linn. (Night Jasmine): extraction techniques, phytochemical constituents, and biological impacts of extracts and essential oil. *Futur. J. Pharm. Sci.*, 10 (1). <https://link.springer.com/article/10.1186/s43094-024-00694-2>

[20]. Y.J., Chan, C.S. Chiu, P.H. Li, W.C. Lu. (2024). Evaluation of different roasting condition on yield, physico-chemical characteristics, and antioxidant activity of cold-pressed sachainchi (*Plukenetia volubilis*) oil LWT, 203.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643824006224>

[21]. J.A., Rashd, J. Lalung, M.A. Kassim, D. Wijaya, A.M.M. Allzrag, M.A. Shaah. (2024). Kinetics and thermodynamic studies on biodiesel synthesis via Soxhlet extraction of *Scenedesmus parvus* algae oil Energy Convers. Manage.: X, 23.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590174524001119>

[22]. Luque de Castro, M. D., García-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5)

[24]. S.B., Bagade, M. Patil. (2019). Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: a review, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408347.2019.1686966>

[25]. B., Kaufmann, P. Christen (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction *Phytochem. Anal.*, 13, pp. 105-113.

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pca.631>

[26]. B., Taşkın, Z. Aksoylu Özbek. (2020). Optimisation of microwave effect on bioactives contents and colour attributes of aqueous green tea extracts by central composite design *J. Food Meas. Charact.*, 14, pp. 2240-2252. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-020-00471-8>

[27].

A.P.F., Machado, B.R. Sumere, C. Mekarü, J. Martinez, R.M.N. Bezerra, M.A. Rostagno Extraction of polyphenols and antioxidants from pomegranate peel using ultrasound: influence of temperature, frequency and operation mode *Int. J. Food Sci. Technol.*, 54 (2019), pp. 2792-2801. <https://academic.oup.com/ijfst/article-abstract/54/9/2792/7805377>

[28]. M.R. Thakker, J.K. Parikh, M.A. (2018). Desai Ultra sound assisted hydrotropic extraction: a greener approach for the isolation of geraniol from leaves of *Cymbopogon martinii* *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 6, pp. 3215-3224.

<https://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0>

- [29]. Raja, P.M.V., Barron, A.R. (2021). Basic principles of supercritical fluid chromatography and supercritical fluid extraction.
- [30]. G.A. Macedo, Á.L. Santana, L.M. Crawford, S.C. Wang, F.F.G. Dias, J.M.L.N. (2021). de Moura Bell Integrated microwave- and enzyme-assisted extraction of phenolic compounds from olive pomace LWT, 138, 110621. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110621>
- [31]. Sridhar, M. Ponnuchamy, P.S. Kumar, A. Kapoor, D.V.N. Vo, S. Prabhakar. (2021). Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review Vol. 19, Environmental Chemistry Letters, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 3409-3443. <https://link.springer.com/article/10.1007/S10311-021-01217-8>
- [32]. M.S.S., Curren, J.W. King. (2001). Ethanol-modified subcritical water extraction combined with solid-phase micro extraction for determining atrazine in beef kidney J. Agric. Food Chem., 49, pp. 2175-2180. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0014866>
- [33]. S., Erşan, Ö. Güçlü Üstündağ, R. Carle, R.M. Schweiggert. (2018). Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls Food Chem. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.116>
- [34]. Kumar, P. Nirmal, M. Kumar, A. Jose, V. Tomer, E. Oz. (2023). Major phytochemicals: recent advances in health benefits and extraction method. Vol. 28, Molecules, MDPI. <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/2/887>
- [35]. Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- [36]. Mustafa, A., Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>

Chapitre III:

Les solvants

NADES

III.1 Introduction

Les solvants organiques volatils conventionnels (COV) présentent des limites critiques :

- Toxicité intrinsèque,
- Inflammabilité,
- Pression de vapeur saturante élevée,
- Coûts énergétiques de recyclage prohibitifs.

Les Solvants Natural eutectique profond (NADES) s'inscrivent comme une alternative de rupture, répondant rigoureusement aux principes de la chimie verte. Sur le plan fondamental, les travaux de Dai *et al.*, ont démontré que les NADES constituent une troisième phase liquide cellulaire, indispensable à la compréhension des processus du vivant [1]. En biologie végétale, l'eau et les lipides ne permettent pas d'expliquer la solubilisation, le transport intramembranaire et la biosynthèse de molécules intermédiaires hautement hydrophobes (telles que la rutine ou la quercétine). Les NADES intracellulaires agissent comme un milieu de compartimentation métabolique universel, protégeant les structures cellulaires lors de stress osmotiques, hydriques ou thermiques extrêmes (phénomènes de vitrification cryoprotectrice) [1].

D'un point de vue physico-chimique, Paiva *et al.*, ont formalisé leur comportement macroscopique en tant que solvants de nouvelle génération [2]. Leur tension de vapeur quasi nulle ($P_{\text{vap}} = 0$) élimine toute émission atmosphérique fugitive, simplifiant la manipulation industrielle. Les revues critiques récentes valident leur transposition à grande échelle géométrique et industrielle [3, 4].

III.2 Définition de NADES

III.2.1 Solvant eutectique profond (DES)

Un Solvant eutectique profond (DES) est un mélange binaire ou ternaire composé d'au moins un accepteur de liaison hydrogène (HBA - Hydrogen Bond Acceptor) et d'un donneur de liaison hydrogène (HBD - Hydrogen Bond Donor) mélangés dans des proportions molaires précises. La caractéristique thermodynamique majeure d'un DES est sa forte dépression de point de fusion [1] :

$$T_{f, \text{mélange}} \ll \sum (x_i \cdot T_{f,i}) \dots\dots\dots(1)$$

Où :

T_f mélange : représente le point de fusion réel de l'eutectique,

$T_{f,i}$: représente le point de fusion théorique de chaque composant pur.

Le point d'eutexie maximale génère un mélange liquide à température ambiante, résultant d'une délocalisation de la charge électronique induite par l'établissement d'interactions intermoléculaires de type liaison hydrogène [1, 2].

III.2.2 Solvants Natural eutectique profond (NADES)

Les NADES constituent une sous-classe stricte des DES. Leur spécificité réside dans la nature chimique de leurs ingrédients ; ils proviennent exclusivement de la biomasse et du métabolisme cellulaire animal ou végétal. Contrairement aux DES de première génération utilisant souvent des composés d'origine synthétique ou des métaux lourds, les NADES intègrent des molécules biosourcées non toxiques comme le chlorure de choline, la bétaine, des acides organiques (acide lactique, acide malique, acide citrique), des glucides (glucose, fructose, saccharose) ou des acides aminés (proline, alanine) [1-4] .

III.3 Composition des NADES

III.3.1 Les accepteurs de liaison hydrogène (HBAs)

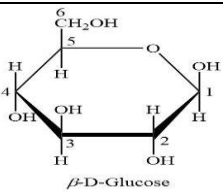
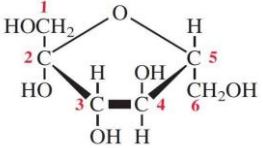
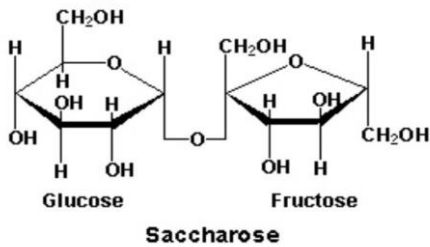
Les accepteurs de liaison hydrogène (HBAs) constituent la base structurale d'édifice supramoléculaire. Le précurseur le plus largement utilisé est le chlorure de choline (ChCl), un sel d'ammonium quaternaire solide dont l'anion chlorure Cl^- présente une forte densité de charge locale, agissant comme un site d'ancrage optimal pour les protons. Lorsque les contraintes industrielles imposent l'absence d'halogènes (notamment en cosmétique), d'autres alternatives naturelles sont employées, telles que la bétaine (un zwitterion neutre) ou des acides aminés basiques capables de se protoner [5].

III.3.2 Les donneurs de liaison hydrogène (HBDs)

Les HBD s'associent à l'HBA pour délocaliser la charge électronique du complexe, ce qui abaisse l'énergie de réseau cristallin de chaque constituant et explique l'effondrement du point de fusion observé dans le mélange eutectique, par rapport à celui de chaque composant pris isolément [6]. Ils se répartissent en trois grandes classes de molécules naturelles :

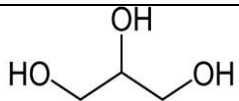
III.3.2.1 Les sucres (mono- et disaccharides sous leurs formes cycliques) comme le glucose, le fructose ou le saccharose. Ces molécules polyhydroxylées (tableau 4) offrent de nombreux groupements hydroxyle capables d'établir simultanément plusieurs liaisons hydrogène avec l'HBA [7].

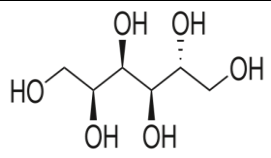
Tableau 4 : Principaux sucres utilisés comme HBDs dans les NADES.

Sucre	Formule moléculaire	Structure simplifiée (2D)	Particularité
Glucose	$C_6H_{12}O_6$		Monosaccharide possédant 5 groupes hydroxyle (-OH)
Fructose	$C_6H_{12}O_6$		Monosaccharide riche en fonctions hydroxyle
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$		Disaccharide résultant de l'association glucose/fructose

III.3.2.2 Les polyols fluides et flexibles comme le glycérol ou le sorbitol (tableau 5). Leur flexibilité moléculaire facilite l'adaptation géométrique nécessaire à la formation du réseau de liaisons hydrogène et permet de moduler la viscosité finale du mélange selon la longueur de la chaîne polyolique [8].

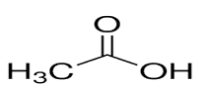
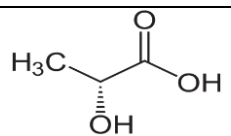
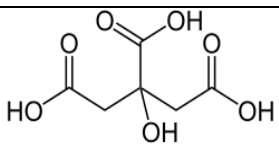
Tableau 5 : Principaux polyols utilisés comme HBDs dans les NADES.

Polyol	Formule moléculaire	Structure semi-développée	Nombre de groupes OH
Glycérol	$C_3H_8O_3$		3

Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$		6
-----------------	----------------	---	---

III.3.2.3 Les acides organiques (monocarboxyliques ou polycarboxyliques) comme l'acide lactique (liquide), l'acide malique ou l'acide citrique (tableau 6). Leur(s) groupement(s) carboxyle constituent des sites donneurs particulièrement puissants, leur acidité favorisant des interactions électrostatiques additionnelles avec l'anion de l'HBA [9].

Tableau 6 : Principaux acides organiques utilisés comme HBDs dans les NADES.

Acide organique	Formule moléculaire	Structure 2D simplifiée	Nombre de groupes carboxyle
Acide acétique	$C_2H_4O_2$		1
Acide lactique	$C_3H_6O_3$		1
Acide citrique	$C_6H_8O_7$		3

Cette classification correspond, dans la nomenclature d'Abbott, défini par l'association d'un sel d'ammonium avec un HBD organique englobant acides carboxyliques, amides et polyols [10].

III.4 Mécanisme de formation des NADES

III.4.1 Interactions par liaisons hydrogène

La formation du réseau eutectique repose essentiellement sur l'établissement d'un réseau tridimensionnel de liaisons hydrogène entre les molécules de HBA et de HBD (figure III.1). Ces interactions intermoléculaires modifient l'organisation structurale du mélange et confèrent au liquide résultant une stabilité thermodynamique propre [11].



Fig. III.1 : Schéma des interactions par liaisons hydrogène entre HBA et le HBD lors de la formation des NADES.

III.4.2 Dépression du point de fusion

La combinaison spécifique des composants HBD/HBA (figure III.2) perturbe l'arrangement cristallin régulier de chaque composé pur, ce qui se traduit par un abaissement notable du point de fusion du mélange par rapport à celui des constituants individuels un phénomène caractéristique de l'eutexie [12].

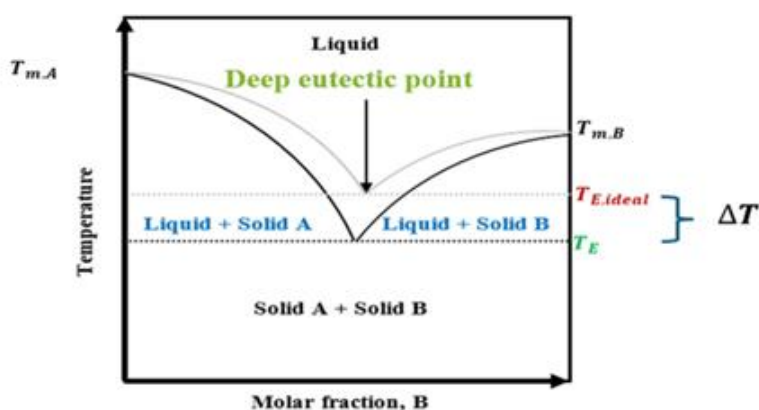


Fig. III.2 : Représentation du mécanisme de formation des NADES par établissement d'un réseau tridimensionnel de liaisons hydrogène entre les constituants HBA et HBD.

III.5 Propriétés Physico-chimiques

Les NADES se distinguent par un ensemble de propriétés physico-chimiques qui influencent directement leur comportement et leur efficacité dans les procédés d'extraction. Les principales caractéristiques de ces solvants sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Principales propriétés physico-chimiques des NADES.

Propriété	Caractéristiques
Point de fusion	Nettement inférieur à celui de chacun des constituants purs, en raison des fortes interactions par liaison hydrogène qui perturbent le réseau cristallin des composés initiaux [13].
Viscosité	Généralement élevée à température ambiante en raison de la densité du réseau de liaisons hydrogène ; elle diminue significativement avec l'augmentation de la température ou l'ajout d'eau [14].
Polarité et miscibilité	La majorité des NADES sont polaires et hydrophiles, présentant une excellente miscibilité avec l'eau. Toutefois, certaines formulations hydrophobes (HDES) ont également été développées [15].
Densité	Généralement comprise entre 1,1 et 1,4 g/cm³ , soit une valeur supérieure à celle de l'eau [16].
Tension superficielle	Plus faible que celle de l'eau, ce qui favorise le mouillage des matériaux solides et améliore la pénétration du solvant dans les matrices végétales [17].
Stabilité thermique	Bonne stabilité thermique, généralement maintenue jusqu'à 50-80 °C pour la plupart des formulations, permettant leur utilisation dans les procédés d'extraction assistés par chauffage [18].

III.6 Méthodes de préparation des NADES

Plusieurs protocoles de synthèse sont rapportés dans la littérature, chacun présentant des avantages et des contraintes spécifiques en fonction de l'échelle de production visée et de la nature des composants utilisés.

III.6.1 Méthode de chauffage et agitation

Cette méthode constitue la plus simple et la plus économique, et reste la technique la plus largement employée en raison de sa facilité de mise en œuvre [19]. Elle consiste à mélanger les composants HBA et HBD selon un ratio molaire défini, puis à chauffer l'ensemble sous agitation magnétique dans un ballon tricol, généralement jusqu'à environ 80-100 °C (figure III.3), jusqu'à l'obtention d'une solution homogène et incolore [20]. La durée du processus varie selon la viscosité et la nature des constituants.



Fig. III.3 : Représentation du la méthode de chauffage et agitation.

III.6.2 Méthode d'assistance par ultrasons

Cette technique exploite le phénomène de cavitation acoustique généré par les ondes sonores (figure III.4), qui favorise la formation rapide du réseau eutectique [21]. Elle permet de réduire significativement le temps de préparation par rapport au chauffage conventionnel.

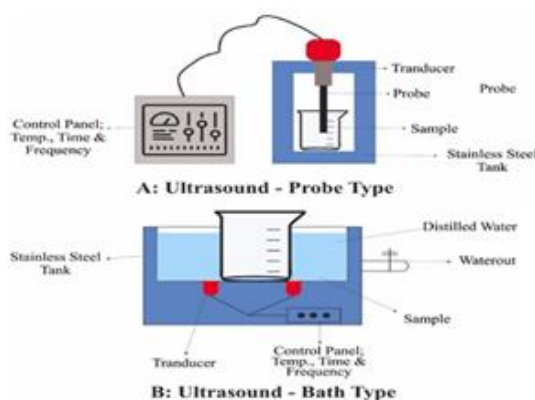


Fig. III.4 : Représentation du la méthode d'assistance par ultrasons.

III.6.3 Méthode d'assistance par micro-ondes

Cette méthode soumet les précurseurs à une énergie micro-ondes qui provoque une agitation moléculaire et une rotation dipolaire accélérant la formation du NADES (figure III.5) [22]. Selon certains travaux, cette technique figure parmi les plus rapides, certains systèmes pouvant se former en moins d'une minute [23].

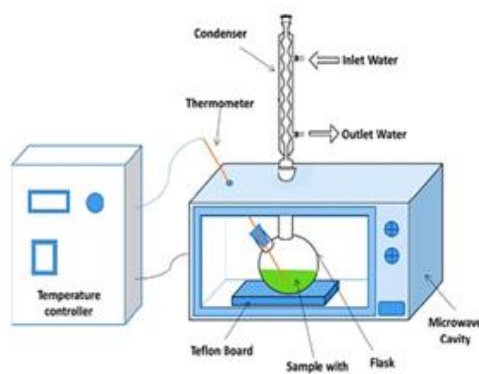


Fig. III.5 : Représentation du la méthode d'assistance par micro-ondes.

III.6.4 Autres approches complémentaires

Deux autres techniques sont également mentionnées dans la littérature récente : la lyophilisation (freeze-drying), qui consiste à dissoudre les composants dans l'eau avant d'en éliminer le solvant par sublimation sous vide, et l'évaporation sous vide (rotary evaporation), qui permet d'obtenir un NADES anhydre à partir d'une solution aqueuse initiale [24]. Ces deux méthodes, bien que moins répandues, présentent l'intérêt de mieux préserver l'intégrité de composants thermolabiles.

III.7 Applications des NADES

III.7.1 Extraction de composés bioactifs

Les NADES sont largement employés pour l'extraction sélective des polyphénols et de flavonoïdes à partir de matrices végétales, en raison de leur affinité particulière avec ces métabolites secondaires [25]. Cette efficacité s'explique par leur capacité à limiter le milieu intracellulaire naturel des plantes, ce qui favorise la solubilisation de composés peu accessibles aux solvants organiques classiques [26]. Plusieurs études rapportent également des rendements d'extraction supérieurs à ceux obtenus avec l'eau ou l'éthanol pour certaines classes des phyto-constituants, notamment lorsque les NADES sont combinés à des techniques d'extraction assistées par ultrasons ou micro-ondes [27].

III.7.2 Applications alimentaires

Les NADES trouvent des applications dans la conservation des aliments ainsi que dans la stabilisation des arômes naturels [28]. Leur faible volatilité et leur biodégradabilité en font des candidats intéressants pour la formulation d'additifs alimentaires verts, tout en assurant une protection efficace des composés sensibles à l'oxydation [27]. Leur origine naturelle, à base de sucres, d'acides organiques et de polyols déjà présents dans la chaîne alimentaire, facilite par ailleurs leur acceptabilité réglementaire dans ce secteur [25].

III.7.3 Applications pharmaceutiques

Les NADES sont étudiés comme vecteurs dans la formulation de médicaments, notamment pour améliorer la solubilité et la biodisponibilité de principes actifs peu hydrosolubles [29]. Plusieurs travaux ont ainsi démontré une augmentation significative de la solubilité aqueuse de la curcumine lorsqu'elle est dissoute dans un système NADES à base de chlorure de choline et de glycérol [29]. Ce concept, désigné sous le terme de « systèmes eutectiques thérapeutiques » (THEDES) lorsque le principe actif lui-même constitue l'un des composants du mélange, a également été appliqué avec succès à d'autres molécules d'intérêt telles que le resvératrol, l'acétaminophène ou la dexaméthasone [30]. Au-delà de la solubilisation, les NADES sont également explorés pour la délivrance transdermique de principes actifs et pour la stabilisation de macromolécules biologiques telles que les protéines et l'ADN [28].

III.7.4 Applications cosmétiques

Leur caractère doux et biocompatible en fait des solvants de choix pour l'incorporation d'actifs naturels dans les formulations cosmétiques [31]. Les NADES permettent notamment d'obtenir des extraits végétaux directement formulables, sans étape de purification ou d'élimination du solvant, ce qui simplifie le procédé de fabrication tout en réduisant l'usage de solvants organiques toxiques [30]. Leur large gamme de polarité ajustable leur permet en outre de solubiliser aussi bien des composés hydrophiles que des molécules lipophiles destinées aux soins de la peau [31].

III.8 Avantages et limites des NADES

La durabilité environnementale, la faible toxicité, la sélectivité d'extraction et la compatibilité biologique constituent les principaux atouts des NADES par rapport aux solvants organiques conventionnels [32]. Leur capacité à dissoudre aussi bien des composés polaires que non polaires en fait des solvants particulièrement versatiles pour de nombreuses applications industrielles [33]. De plus, la plupart de leurs composants étant classés GRAS (*Generally*

Recognized as Safe), les NADES peuvent souvent être incorporés directement dans le produit final sans étape d'élimination du solvant, simplifiant ainsi les procédés de formulation [34].

III.9 Avancées récentes dans la recherche sur les NADES (2024-2026)

Les travaux les plus récents mettent en évidence trois axes de développement majeurs :

- Le premier concerne l'intégration des NADES dans la formulation d'emballages alimentaires biodégradables, en exploitant leurs propriétés filmogènes et leur compatibilité avec les polymères naturels tels que l'amidon ou la cellulose [35].
- Le second axe porte sur leur exploitation croissante en nanotechnologie pharmaceutique, notamment comme agents cryoprotecteurs dans la formulation de nanoparticules lipidiques solides, ouvrant la voie à une production industrielle plus stable et plus durable de vecteurs de principes actifs [36].
- Le troisième axe vise l'optimisation des procédés d'extraction verte en vue d'une transposition à l'échelle industrielle, à travers la modulation de la viscosité par ajout d'eau ou de co-solvants et l'amélioration des protocoles de récupération du soluté [37].

III.10 Conclusion

Les NADES représentent une avancée majeure en chimie verte, offrant des solutions durables et respectueuses à l'environnement pour l'extraction et la formulation de composés bioactifs [38]. Leur biocompatibilité, leur faible toxicité et leur capacité à imiter les milieux biologiques naturels en font des candidats particulièrement prometteurs pour remplacer progressivement les solvants organiques nocifs dans les secteurs pharmaceutique, alimentaire et cosmétique [39]. Toutefois, les verrous technologiques liés à leur viscosité, à l'absence de normalisation toxicologique et réglementaire, ainsi qu'au manque de données sur leur comportement dans des conditions industrielles réelles, devront être levés pour assurer une transition réussie du laboratoire vers l'échelle industrielle [40]. Les efforts de recherche actuels, orientés vers la standardisation des procédés de production et la réduction des coûts, devraient permettre une adoption industrielle plus large de ces solvants dans les années à venir [41].

Références bibliographiques

- [1]. Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- [2]. Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014). Natural deep eutectic solvents — solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- [3]. Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
- [4]. Vanda, H., Dai, Y., Wilson, E. G., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 21(6), 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>
- [5]. Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2013). Deep eutectic solvents: synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(4), 379–385. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200416>
- [6]. Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. (2004). Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29), 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>
- [7]. Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, 156(4), 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>
- [8]. Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Redovniković, I. R. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.025>
- [9]. Florindo, C., Branco, L. C., Marrucho, I. M. (2017). Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments. *Fluid Phase Equilibria*, 448, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.04.002>

- [10]. Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, (1), 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>
- [11]. Delso, I., Lafuente, C., Muñoz-Embid, J., Artal, M. (2019). NMR study of choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 290, 111236. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111236>
- [12]. Leron, R. B., Wong, D. S. H., Li, M. H. (2012). Densities of a deep eutectic solvent based on choline chloride and glycerol and its aqueous mixtures at elevated pressures. *Fluid Phase Equilibria*, 335, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2012.08.016>
- [13]. Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>
- [14]. Mjalli, F. S., Naser, J. (2015). Viscosity of ionic liquids analog: deep eutectic solvents. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 10(2), 273–281. <https://doi.org/10.1002/apj.1873>
- [15]. van Osch, D. J. G. P., Dietz, C. H. J. T., Warrag, S. E. E., Kroon, M. C. (2020). The curious case of hydrophobic deep eutectic solvents: a story on the discovery, design, and applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(29), 10591–10612. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00559>
- [16]. Shahbaz, K., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., AlNashef, I. M. (2011). Prediction of deep eutectic solvents densities at different temperatures. *Thermochimica Acta*, 515(1–2), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2010.12.022>
- [17]. Yusuf, A., Yusuf, A., & Mele, P. O. (2022). Surface tension and interfacial properties of deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 347, 118297. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118297>
- [18]. Tomé, L. I. N., Baião, V., da Silva, W., Brett, C. M. A. (2018). Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Applied Materials Today*, 10, 30–50. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.11.005>
- [19]. Cunha, S. C., Fernandes, J. O. (2018). Extraction techniques with deep eutectic solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>

- [20]. Martins, M. A. R., Pinho, S. P., Coutinho, J. A. P. (2019). Insights into the nature of eutectic and deep eutectic mixtures. *Journal of Solution Chemistry*, 48(7), 962–982. <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>
- [21]. Alonso, D. A., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, I. M., Ramón, D. J. (2016). Deep eutectic solvents: the organic reaction medium of the century. *European Journal of Organic Chemistry*, 2016(4), 612–632. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501197>
- [22]. Duan, L., Dou, L. L., Guo, L., Li, P., Liu, E. H. (2016). Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive constituents from medicinal plants. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(4), 2405–2411. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00091>
- [23]. Shafie, M. H., Yusof, R., Gan, C. Y. (2020). Synthesis of citric acid–choline chloride based natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods and the effect of water on NADES properties. *Journal of Molecular Liquids*, 318, 113916. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113916>
- [24]. Cvjetko Bubalo, M., Curko, N., Tomasevic, M., Kovacevic Ganic, K., Redovnikovic, I. R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>
- [25]. Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry*, 85(13), 6272–6278. <https://doi.org/10.1021/ac400432p>
- [26]. Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A*, 1434, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.037>
- [27]. Jeong, K. M., Lee, M. S., Nam, M. W., Zhao, J., Jin, Y., Lee, D. K., Kwon, S. W., Lee, J., Yang, J. W. (2015). Tailoring and recycling of deep eutectic solvents as sustainable and efficient extraction media. *Journal of Chromatography A*, 1424, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.019>
- [28]. Boonnoun, P., Deenarn, P., Prasertsit, K., Shotipruk, A. (2020). Deep eutectic solvents for extraction and stability of natural colorants. *Journal of Food Engineering*, 291, 110244. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110244>

- [29]. Malaeké, H., Housaindokht, M. R., Monhemi, H., Izadyar, M. (2018). Deep eutectic solvent as an efficient molecular liquid for lignin solubilization and wood delignification. *Journal of Molecular Liquids*, 263, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.04.133>
- [30]. Domínguez de María, P., Maugeri, Z. (2011). Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep eutectic solvents. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.008>
- [31]. Chew, K. W., Chia, S. R., Yen, H. W., Nomanbhay, S., Ho, Y. C., Show, P. L. (2019). Transformation of biomass waste into sustainable organic solvents for lignocellulosic biomass fractionation towards a carbon neutral future. *Catalysts*, 9(6), 504. <https://doi.org/10.3390/catal9060504>
- [32]. Gu, T., Zhang, M., Tan, T., Chen, J., Li, H., Zhang, Q., Gu, J. (2015). Deep eutectic solvents as novel extraction media for phenolic compounds from model oil. *Chemical Communications*, 51(37), 7810–7813. <https://doi.org/10.1039/c5cc00668f>
- [33]. Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., Durand, E. (2017). Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3591–3601. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>
- [34]. Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., & del Monte, F. (2009). Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: a suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. *Langmuir*, 25(10), 5509–5515. <https://doi.org/10.1021/la900552b>
- [35]. Abubakar, N. H., Hamzah, H., Muhammad, M. A. A. (2024). Deep eutectic solvents in biodegradable packaging: current status and prospects. *Food Packaging and Shelf Life*, 43, 101283. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2024.101283>
- [36]. Marchetti, P., Jimenez Solomon, M. F., Szekely, G., Livingston, A. G. (2024). NADES as cryoprotectants for nanoparticles in pharmaceutical nanotechnology. *Journal of Controlled Release*, 365, 800–815. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.11.042>
- [37]. Sosa, F. H. B., de Oliveira Lopes, L., Costa, M. C., & Coutinho, J. A. P. (2024). Scale-up challenges and industrial perspectives on NADES-based green extraction processes. *Green Chemistry*, 26(3), 1120–1138. <https://doi.org/10.1039/d3gc03321h>
- [38]. Lomba, L., Giner, B., Bandrés, I., Lafuente, C., Pino, M. R. (2011). Physicochemical properties of green solvents derived from biomass. *Green Chemistry*, 13(8), 2062–2070. <https://doi.org/10.1039/c1gc15398f>

- [39]. Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Redovniković, I. R., Jokić, S. (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 52–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>
- [40]. Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013). Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere*, 90(7), 2193–2195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.004>
- [41]. Perna, F. M., Vitale, P., Capriati, V. (2020). Deep eutectic solvents and their applications as green solvents. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 21, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.10.002>

Chapitre IV:
Matériels &
Méthodes

IV.1 Objectif

L'objectif principal de cette étude est de valoriser les grignons d'olive issus de l'extraction d'huile d'olive en tant qu'une source naturelle des composés bioactifs. Plus spécifiquement, ce travail vise à :

- Valoriser les grignons d'olive, un sous-produit d'industrie oléicole.
- Extraire les composés bioactifs présents dans les grignons d'olive.
- Utiliser des solvants eutectiques naturels profonds (NADES) comme alternative écologique aux solvants conventionnels.
- Appliquer l'extraction assistée par micro-ondes afin d'améliorer l'efficacité du procédé d'extraction.
- Déterminer les teneurs en composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux des extraits obtenus.
- Évaluer les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits.
- Comparer l'efficacité des conditions d'extraction étudiées.
- Contribuer à la valorisation durable des co-produits oléicoles dans le respect des principes de la chimie verte et du développement durable.

IV.2 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de grignons d'olive issus de deux variétés d'olives, vertes et noires. Ces grignons ont été récupérés après l'extraction d'huile d'olive par pressurage dans une huilerie de la région de Sidi Bel Abbès (figure IV.1).

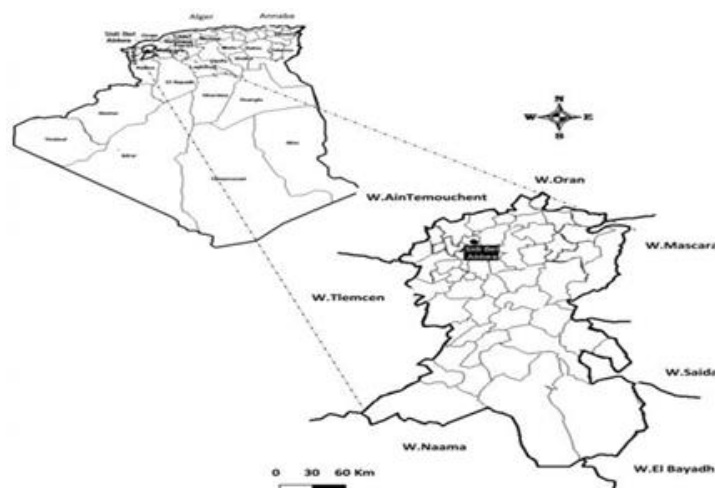


Fig. IV.1 : Localisation de la wilaya de Sidi Bel Abbès, région de collecte des grignons d'olive.

Considérés comme un sous-produit d'industrie oléicole, les grignons d'olive renferment encore des quantités intéressantes de composés bioactifs, notamment des composés phénoliques reconnus pour leurs propriétés antioxydantes.

IV.3 Présentation de zone de collecte (Sidi Bel Abbès)

La wilaya de Sidi Bel Abbès (en arabe : ولاية سيدي بلعباس) située à 440 km à l'Ouest de la capitale d'Algérie « Alger » (tableau 8), elle est limitée :

- Au Nord, par les wilayas d'Oran et Ain Temouchent ;
- Au Sud, par les wilayas de Mecheria et El-Bayadh ;
- A l'Ouest, par la wilaya de Tlemcen ;
- A l'Est, par les wilayas de Mascara et Saida.

Tableau 8 : Localisation et climat de la zone de collecte

Station	Latitude	Longitude	Altitude	Climat
Sidi Bel Abbès	35° 11' 38" Nord	0° 38' 29" Ouest	483 m	Semi-aride sec et froid

IV.3.1 Préparation des échantillons

Après leurs collectes, les échantillons d'olives vertes et noires ont été triés afin d'éliminer les impuretés et les résidus indésirables. Ils ont ensuite été laissés à sécher naturellement à l'air libre dans un endroit sec et bien aéré, à l'abri de la lumière directe du soleil (figure IV.2). Une fois séchés, ils ont été broyés, puis conservés dans des récipients en verre stériles dans des conditions de conservation favorables : réfrigérés à 4°C ; une obscurité et pas d'humidité jusqu'à leurs analyses en laboratoire, ceci afin d'éviter une éventuelle altération chimique et biologique.



Fig. IV.2 : Les échantillons d'olives vertes et noires objet de notre étude.

IV.4 Préparation de NADES

Les solvants eutectiques naturels profonds (NADES) ont été élaborés en suivant le protocole de chauffage sous agitation [1]. Cette technique consiste à combiner, selon des ratios précis, un accepteur de liaison hydrogène (HBA) et un donneur de liaison hydrogène (HBD), afin d'obtenir un liquide homogène et stable.

Tableau 9 : Masses molaires des constituants

Composé	Masse molaire (g/mol)	T° fusion (°C)	T° d'ébullition (°C)
Chlorure de choline	139,62	-	247
Acide acétique	60,05	16,64	117,9

Les constituants (HBA et HBD) ont été pesés avec précision selon un rapport molaire de 1:2 (tableau 9) pour chacun des systèmes, avec une teneur en eau de 40 % (m/m).

Afin de procéder à la préparation de solvant NADES, introduire dans un montage de chauffage à reflux chaque solvant séparément contenant les deux composants pesés selon un rapport molaire de 1:2 (HBA : HBD). Au cours du chauffage, ajouter de l'eau distillée goutte à goutte avec une teneur en eau de 40 % (g/g), à l'aide d'une burette, sous agitation continue pendant 30 min.

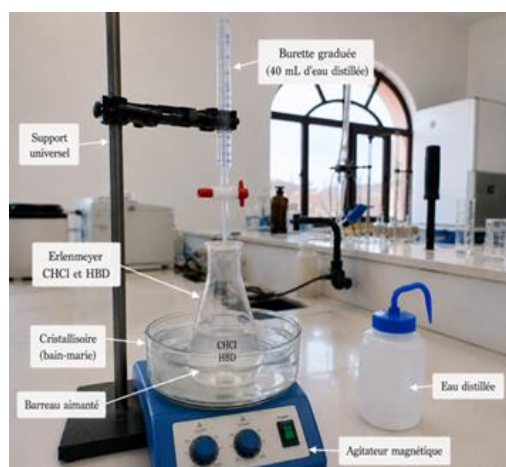


Fig. IV.3 : Montage chauffage à reflux.

A l'écoulement de ce temps, le mélange a été laissé refroidir à **température ambiante** afin de stabiliser le NADES, et ces derniers ont été stockés dans des flacons hermétiques, à l'abri de la lumière et de l'humidité, jusqu'à leur utilisation [1, 2].

IV.5 Analyses physico-chimiques

IV.5.1 pH

❖ Principe

Le pH de solvant NADES est mesuré dans une solution à 10% (m/v) de solvant à l'aide d'un pH-mètre [3]. C'est une méthode potentiométrique utilisant une électrode en verre spécifique aux ions H^+ . La notion de pH qui traduit « l'acidité » d'une solution rend compte la concentration en ions H^+ (H_3O^+) de la solution grâce à la relation suivante :

$$pH = -\log [H_3O^+]$$

Le pH-mètre mesure la tension (différence de potentiel) entre ces deux électrodes. Celle-ci est directement liée au pH de la solution dans laquelle la sonde est immergée. L'une des électrodes est appelée électrode de référence au calomel (Hg) saturé ou Ag/AgCl.

❖ Mode opératoire

Le pH-mètre est d'abord calibré à pH égal à 4 et 9 avec des solutions tampons. Ensuite, 5g de solvant sont bien dissous dans 50 mL d'eau distillée. Pour mesurer le pH, les électrodes du pH-mètre sont immergées dans la solution et la valeur du pH s'affiche (figure IV.4).



Fig. IV.4 : pH-mètre

IV.5.2 Densité (d)

❖ Principe

La masse volumique d'un solvant représente sa masse par unité de volume. Elle est calculée en divisant la masse par le volume ($\rho = m/v$). La densité est calculée suite de ce rapport.

❖ Mode opératoire

Placez l'éprouvette graduée vide sur la balance, versez un volume précis de solvant dans l'éprouvette (par exemple ($v = 50$ mL)). Relevez la valeur de masse (m) exacte. Puis, calculez la masse volumique (ρ) avec la formule précédemment décrit. Calculer après ça densité.

IV.6 Extraction assistée par ultrasons et séparation des extraits

IV.6.1 Principe de l'extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est une technique moderne utilisée pour améliorer la récupération des composés bioactifs à partir des matrices végétales. Cette méthode repose sur le phénomène de cavitation acoustique généré par la propagation des ondes ultrasonores dans le milieu liquide (figure IV.5). La formation et l'implosion de microbulles provoquent des microjets et des turbulences qui favorisent la rupture des parois cellulaires végétales, facilitant ainsi la libération des métabolites d'intérêt vers le solvant d'extraction. Cette technique présente plusieurs avantages, notamment une réduction du temps d'extraction, une diminution de la consommation de solvant et une amélioration du rendement d'extraction [4].



Fig. IV.5 : Bain ultrasons

IV.6.2 Procédure d'extraction

Dans un bécher de 50 mL, différents pèses des grignons d'olive (vertes ou noires) ont été mélangé avec le solvant NADES précédemment préparés selon différents rapport solide/liquide et à des différentes températures et durant des temps bien distinguées. Chaque expérience a été réalisée pour les deux variétés de grignons d'olive avec le solvant NADES dont Acide Acétique (AA) comme donneur d'hydrogène.

IV.6.2.1 Les paramètres d'extraction étudiés

❖ Le temps

L'effet de temps a été réalisée pour différentes durées de contact (15 à 75 min), tandis que les autres paramètres température et rapport solide/liquide étaient maintenus constants (tableau 10).

Tableau 10 : Plan d'extraction des grignons d'olivier en fonction du temps.

Variété de grignons	Temps (min)				
Noires / Vertes	15	30	45	60	75

Note :

Conditions fixés et maintenues à (Température = 40 °C) et (Rapport liquide/solide = 25/1 mL/g).

❖ Température

L'effet de température a été réalisée pour différentes température (30 à 60 °C), tandis que les autres paramètres temps et rapport solide/liquide étaient maintenus constants (tableau 11).

Tableau 11 : Matrice expérimentale pour l'étude d'effet de température sur l'extraction.

Variété de grignons	Température (°C)			
Noires / Vertes	30	40	50	60

Note :

Conditions fixes maintenues : Temps = 30 min | Rapport solide/liquide = 25/1 mL/g.

❖ Rapport liquide/solide

L'effet de rapport solide/liquide a été réalisée pour différents rapport (15/1 à 45/1 mL/g), tandis que les autres paramètres temps et température étaient maintenus constants (tableau 12).

Tableau 12 : Effet de ratios solide/liquide appliqués sur l'extraction.

Variété de grignons	Rapport Liquide/Solide (mL/g)			
Noires / Vertes	15/1	25/1	35/1	45/1

Note :

Conditions fixes maintenues pour cette série : Temps = 30 min | Température = 40 °C.

IV.6.3 Séparation, clarification

Une fois l'extraction assistée par ultrasons (EAU) est terminée, on obtient une suspension brute et assez hétérogène. D'un côté, on retrouve une phase solide composée des macroparticules de la poudre de grignons d'olivier, d'autre côté, une phase liquide très visqueuse, constituée par le solvant NADES qui s'est enrichi en composés bioactifs. Avant de procéder au dosage, il est essentiel d'éliminer ces particules afin d'éviter toute interférence et

d'obtenir un extrait parfaitement limpide et homogène. Pour y parvenir, nous avons mis en place un protocole de séparation rigoureux en deux étapes :

IV.6.3.1 Séparation primaire par centrifugation

Les mélanges bruts ont été transférés dans des tubes de centrifugation en polypropylène gradués de 50 mL. L'opération a été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse pendant 10 min et à une vitesse de 3000 tr/min.

IV.6.3.2 Clarification par filtration sous vide

Afin de pallier la forte viscosité inhérente au solvant NADES et d'accélérer le processus de clarification après l'étape de centrifugation, une filtration sous vide via un Buchner a été entreposée (figure IV.6).

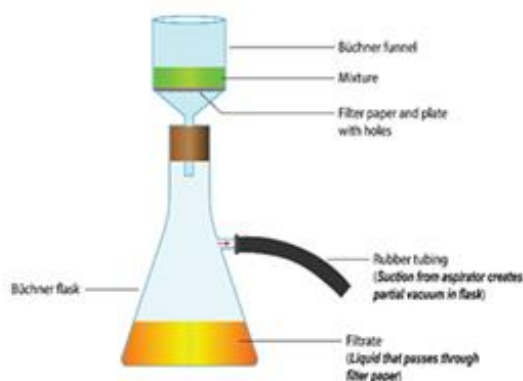


Fig. IV.6 : Montage de filtration sous vide

IV.6.4 Conservation des extraits

Les extraits parfaitement limpides et clarifiés ont été recueillis dans des flacons hermétiquement fermés pour éviter toute évaporation ou absorption d'humidité, et enveloppés de papier aluminium pour les protéger de la photodégradation, puis stocker à 4 °C.

IV.6.5 Analyse FT-IR

Nos échantillons d'extraits ont été analysés dans un Spectrophotomètre infrarouge (FT-IR). Chaque échantillon a été placé sur la surface ATR et la collection des spectres a été réalisée à 25 °C. Chaque spectre a été atteint après 32 scans [5].

IV.7 Analyse phytochimique quantitative

Une série des réactifs a été mobilisé afin d'assurer l'enchaînement des analyses phytochimiques quantitative (tableau 13).

Tableau 13 : Réactifs utilisés pour l'analyse phytochimique.

Réactif	Formule chimique	Utilisation
Réactif de Folin-Ciocalteu	—	Dosage des polyphénols totaux
Carbonate de sodium	Na_2CO_3	Milieu alcalin pour le dosage des polyphénols
Acide gallique	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	Étalon pour les polyphénols
Chlorure d'aluminium	AlCl_3	Dosage des flavonoïdes
Nitrite de sodium	NaNO_2	Réactif de complexation des flavonoïdes
Hydroxyde de sodium	NaOH	Développement de la coloration
Méthanol	CH_3OH	Solvant du DPPH
Eau distillée	H_2O	Préparation des solutions
Acide ascorbique	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	Témoin positif antioxydant

IV.7.1 Dosage des composés phénoliques totaux (TPC)

La méthode de Folin–Ciocalteu permet de doser les composés phénoliques en mesurant la couleur bleue formée lors de leur réaction avec le réactif de Folin –Ciocalteu en milieu alcalin. La méthode de Singleton et Rossi [6] est utilisée. En bref, 0,5 mL pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais additionner de 0,5 mL réactif de Folin–Ciocalteu. 3 mL d’eau distillée est ajouté puis laisser reposer pendant 3 minutes à température ambiante. 2,5 mL de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % (m/v) sont ajoutés. Après 120 minutes d’incubation à l’obscurité, l’absorbance est lue à 765 nm à l’aide d’un spectrophotomètre UV-Visible, puis la teneur en polyphénols est calculée à partir d’une courbe d’étalonnage établie avec l’acide gallique et exprimée en (mg EAG/g).

IV.7.2 Dosage des flavonoïdes totaux (TFC)

La méthode au chlorure d'aluminium permet de doser les flavonoïdes en mesurant la couleur jaunâtre formée lors de la complexation entre les flavonoïdes et l' AlCl_3 en milieu basique. Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué selon la méthode de Zishen *et col.*, [7]. En bref, 0,5 mL de la solution standard ou extrait et les introduire dans des tubes à hémolyse. 2 mL d’eau distillée sont ajoutés puis 0,150 mL de nitrite de sodium (NaNO_2) à (25 %). Laisser

reposer le mélange pendant 5 minutes à température ambiante, puis 0,150 mL de AlCl_3 à 10% sont ajoutés. Après 5 min d'incubation à température ambiante, 1 mL de NaOH à 1 M et 1,2 mL d'eau distillée sont ajoutées. L'absorbance est lue à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, puis la teneur en flavonoïdes est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine et exprimée en (mg EQ/g).

IV.8 Activités biologiques

IV.8.1 Évaluation de l'activité antioxydants (test de DPPH)

L'activité anti-radicalaire est évaluée par la réduction du radical DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle), un radical synthétique caractérisé par une coloration violette intense. En présence d'un antioxydant, le radical est neutralisé grâce à la saturation de sa couche électronique, ce qui entraîne la disparition progressive de sa coloration, accompagnée d'un virage du violet vers le jaune pâle [8]. Cette perte de coloration traduit la capacité des extraits à neutraliser ce radical (figure IV.7), conformément à la réaction ci-dessous, laquelle peut être suivie par spectrophotométrie UV.

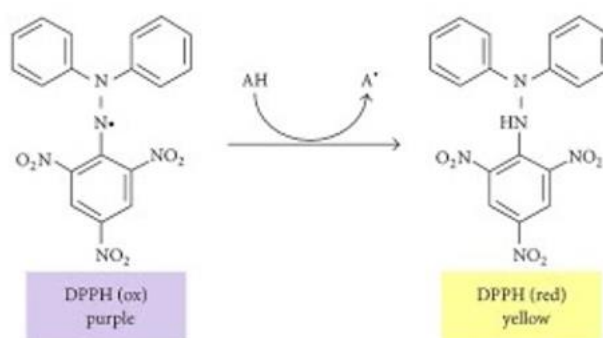


Fig. IV.7 : Principe de test de piégeage du radical DPPH

Au début, au 0,1 mL de différentes concentrations d'extrait à tester (gamme de dilutions) dans le solvant approprié, 3,9 mL de la solution méthanolique de DPPH à 0,00125 % (m/v) est ajoutée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, contre un blanc (méthanol pur). En parallèle un contrôle négatif (solution de DPPH sans extrait) pour déterminer l'absorbance initiale (contrôle). Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{Inhibition} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(\text{IV.1})$$

Où :

$A_{\text{contrôle}}$: absorbance de la solution de DPPH seule (sans extrait).

$A_{\text{échantillon}}$: absorbance en présence d'extrait testé.

IV.8.2 Activité antimicrobienne

Nous avons adopté une technique standard pour la détermination de la susceptibilité des microorganismes (bactérie et levures) aux agents antimicrobiens. Cette technique est réalisée selon les recommandations d'institut de laboratoire standard et clinique CLSI M02-A10 [9].

L'activité antimicrobiennes de nos échantillons d'extraits contre différentes bactéries et levure a été testé en appliquons la méthode de diffusion sur gélose (puits) décrite par [10]. Trois souches microbiennes à savoir ; une Gram⁻ *Escherichia coli* (*E. coli*), une Gram⁺ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et une levure *Candida albicans* (*C. albicans*) ont été utilisé dans cette évaluation.

Au début, une suspension microbienne d'une culture jeune de 18 à 24 heures est ajustée à une turbidité standard 0.5 McFarland [10]. 0,1 mL de cette dernière est étalé avec des écouvillons à la surface de gélose MHA (Muller Hinton Agar) préalablement coulé dans des boites de pétris. Des puits de 6 mm de diamètre sont remplis de 0,02 mL d'extrait (figure IV.8). Après 1 heure de conservation à 4 °C, les boites pétris sont incubées au 37 °C pendant 24 heures. Le pouvoir antimicrobien est estimé par la mesure de diamètre d'aréole au tour de puits.



Fig. IV.8 : Activité antimicrobienne

IV.8 Préparation des plans d'expérience

IV.8.1 Objectifs

Les conditions de préparation ont été optimisées grâce à la conception de Box-Behnken pour maximiser les qualités des deux variétés de grignons d'olive vis-à-vis l'activité antibactérienne,

l'activité antiradicalaire et leurs teneurs en polyphénols totaux (TPC) et flavonoïdes totaux (TFC).

IV.8.2 Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Dans ce travail, les paramètres de préparation suivants ont été étudiés : trois facteurs numériques, à savoir rapport liquide/solide (X1), la température (X2) et le temps (X3). Les niveaux bas, moyen et haut de chaque variable numérique sont respectivement codés -1, 0 et +1 (tableau 14). Ces trois variables ainsi que leurs plages respectives ont été choisies sur la base des données de la littérature et des résultats de nos expériences préliminaires.

IV.8.3 Nombre total d'expériences

Le nombre d'expériences (N) requis pour la matrice du BBD (*Bordered Block Diagonal*) [11] est défini par la relation :

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \dots\dots\dots (IV.2)$$

Où :

k : nombre de paramètres (facteurs numériques),

C₀ : nombre de points centraux.

Avec **trois facteurs numériques** ($k = 3$), le modèle BBD par défaut comprend **12 expériences factorielles** et **5 répétitions au point central**, soit :

$$N = 2 \times 3 \times (3 - 1) + 5 = 12 + 5 = 17 \text{ expériences}$$

Les points centraux (5 répétitions) permettent d'estimer l'erreur expérimentale et d'évaluer la reproductibilité des données.

Ce plan de **17 essais** est **identique pour chaque niveau du facteur catégoriel** (type de solvant).

Tableau 14 : Les facteurs étudiés et leurs domaines de variation

Paramètres	Code	Niveaux		
		-1	0	+1
Rapport liquide/solide (mL/g)	X1	15/1	25/1	35/1
T (°C)	X2	30	40	50
t (min)	X3	15	30	45

IV.8.4 Analyse statistique

Le logiciel Statgraphics centurion XVI.I a été utilisé pour générer les plans expérimentaux, les analyses statistiques et les modèles de régression. L'adéquation des modèles développés a été testée par le coefficient de détermination (R^2) et sa signification statistique a été vérifiée par un test F de Fisher. Le niveau de signification a été donné comme valeurs de la probabilité (Valeur-P) $< 0,05$.

Références bibliographiques

- [1]. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytical Chimica Acta*. 766:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- [2]. Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC. (2014). *Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2(5):1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- [3]. AOAC. Official method of analysis 19th ed., (2012). Washington DC. Association of Official Analytical Chemists.
- [4]. Chemat F, Zill-e-Huma, Khan MK. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18(4):813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- [5]. Daniela P., Paula C., Sorina R., Florina D., Mircea O. (2021). Physicochemical parameters prediction and authentication of different monofloral honeys based on FTIR spectra. *Journal of Food Composition and Analysis*. 102, 104021.
- [6]. V. L. Singleton, Joseph A. Rossi. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965 16:144-158 ; <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- [7]. Jia Zhishen, Tang Mengcheng, Wu Jianming. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*. 64(4): 555-559.
- [8]. Filomena Conforti. (2011). Bioactive phytonutrients (omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), in vitro inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activity of non-cultivated Mediterranean vegetables. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.05.085>
- [9]. CLSI-Publishes. Antimicrobial susceptibility testing standards. (2009).
- [10]. Hamideh J., Khosro P., Javad N. (2013). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chemistry*. 136, 237-244.
- [11]. Gulzar Ahmad N., Vikas N., Beenish Z., Dar B.N., Mohammad J. A., Sami Al O., Otilia B. (2022). Response surface approach to optimize temperature, pH and time on antioxidant

properties of wild bush (*Plectranthus rugosus*) honey from high altitude region (Kashmir Valley) of India. Saudi Journal of Biological Sciences. 29, 767–773

Chapitre V:
Résultats &
Discussions

V.1 Rendement en extrait

La figure V.1 représente les Rendement d'extraction du grignon d'olive des deux variétés noire (N) et vert (V).

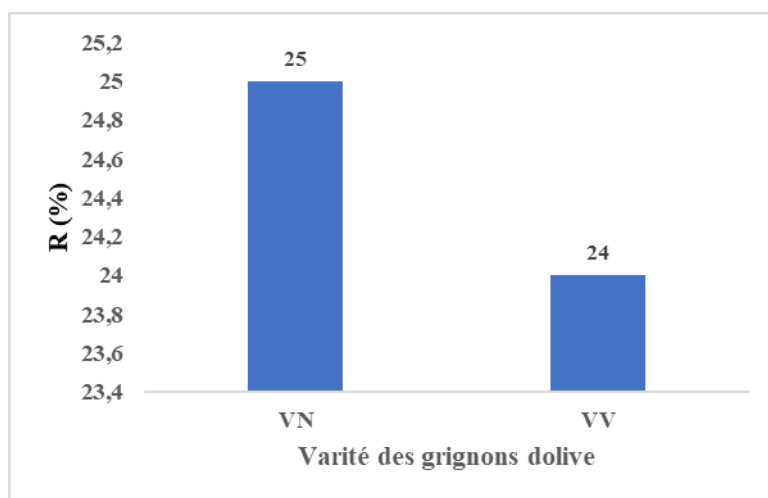


Fig. V.1 : Teneur en extrait des deux variétés du grignon d'olive.

D'après les résultats illustrés dans la figure V.1, Variété (N) montre un Rendement en extrait supérieure au Variété (V), la différence de rendement en extrait entre les deux variétés peut être expliquée par leurs compositions chimiques distinctes. Les différences observées entre ces résultats pourraient être attribuées à la nature et à la composition des composés présents dans chaque variété de grignon d'olive [1, 2]. En effet, les conditions expérimentales telles que le rapport solide/solvant, la nature du solvant utilisé, la température d'extraction et le temps d'extraction étaient identiques pour les deux variétés ; ainsi, la variation du rendement est principalement liée aux caractéristiques intrinsèques de chaque variété [3]. Cette différence pourrait être due notamment à la teneur en composés extractibles et à la structure de la matrice végétale propre à chaque variété de grignon d'olive [4] tel qu'il est illustré dans le tableau 15.

Tableau 15 : Rendement d'extraction de quelques extraits végétaux issus de la littérature [5-8].

Extrait végétal	Rendement d'extraction (%)
Extrait de feuilles d'olivier	15–30
Extrait de pépins de raisin	10–20

Extrait de pelures de grenade	15–25
Extrait de marc de café	10–18
Extrait de thé vert	20–35
Extrait de romarin	12–25

V.2 Analyses physico-chimiques

Bien que les solvants eutectiques naturels profonds (NADES) soient relativement récents dans le domaine d'extraction, ils suscitent un intérêt croissant auprès des chercheurs en raison de leurs propriétés écologiques, de leur faible toxicité, de leur biodégradabilité et de leur grande efficacité pour l'extraction des composés bioactifs [1, 2]. Les résultats d'étude des paramètres physico-chimiques d'échantillon de NADES, présentés dans le tableau 16, confirment la stabilité physico-chimique du système étudié ainsi que son aptitude à être utilisé comme solvant vert dans les procédés d'extraction des composés d'intérêt [2, 4].

Tableau 16 : Quelques paramètres physico-chimiques étudiés pour le solvant NADES.

Solvant	Paramètres physicochimique	
	pH	Densité
NADES	3	1.08

Les propriétés des NADES dépendent principalement de la nature des constituants utilisés, du rapport molaire entre l'accepteur de liaisons hydrogène (HBA) et le donneur de liaisons hydrogène (HBD), ainsi que de la teneur en eau du système [1, 3].

V.3 Détermination de la teneur en polyphénol et flavonoïde totaux

V.3.1 Détermination de la teneur en polyphénols totaux (TPC)

La teneur en TPC a été déterminée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

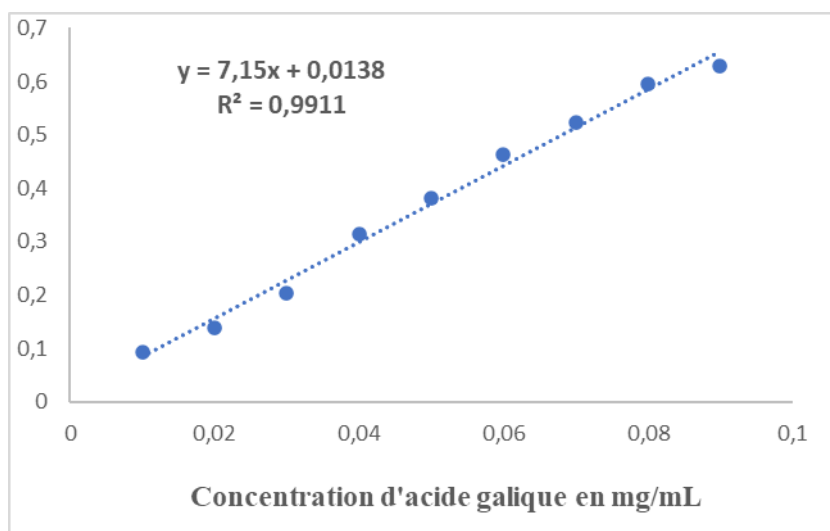


Fig. V.2 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme d'extraire sec (mg EAG/g), à partir des données d'absorbance mesurées à 765 nm pour différentes concentrations d'acide gallique (figure V.2).

La teneur en composés phénoliques des extraits de grignon d'olive a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique dont l'équation de régression est : $y = 7,15x + 0,013$ ($R^2 = 0,991$). Les résultats de TPC des différents échantillons des deux variétés de grignon d'olive, noire (N) et verte (V), sont représentés dans les figures V.3, V.4 et V.5.

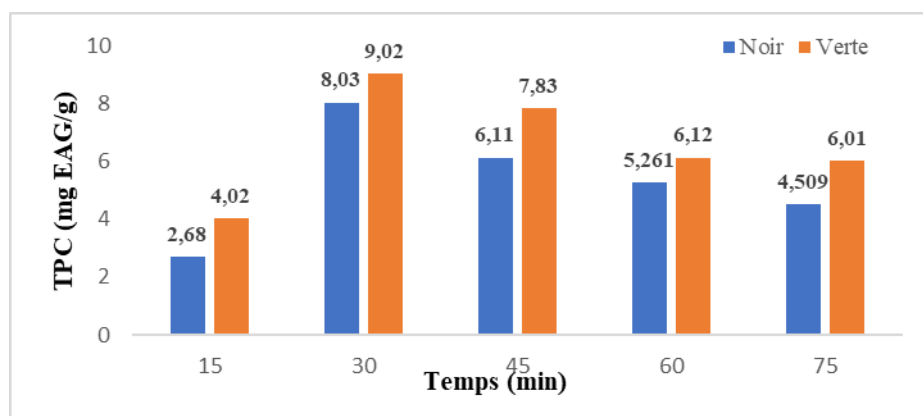


Fig. V.3 : Résultats de TPC des échantillons des grignon d'olive en fonction du temps d'extraction.

Les résultats montrent que le temps d'extraction influence la teneur en composés phénoliques totaux (TPC) des deux variétés vert et noir. Les teneurs augmentent au bout de 30 min, où les valeurs maximales sont obtenues (8,03 mg EAG/g pour la variété noire et 9,02 mg EAG/g

pour la variété verte), puis diminuent progressivement avec la progression du temps d'extraction en raison d'une possible dégradation des composés phénoliques.

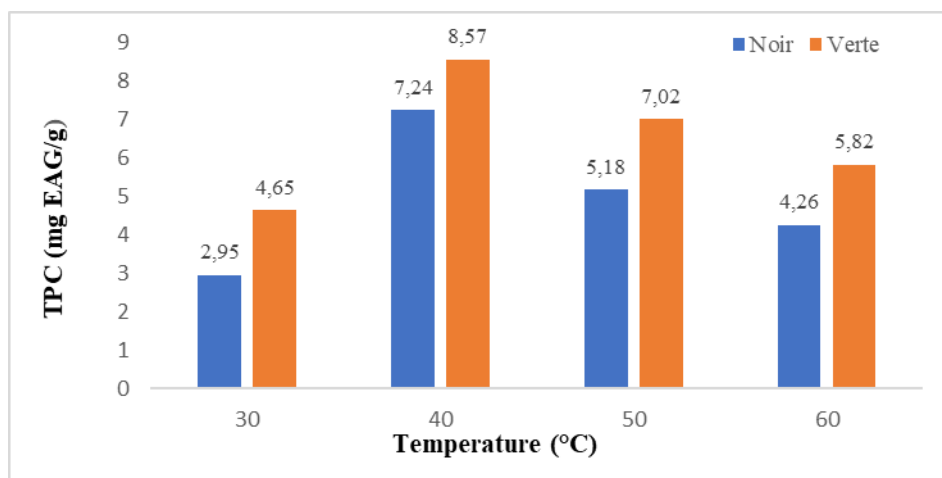


Fig. V.4 : Résultats de TPC des échantillons de grignon d'olive en fonction de la température d'extraction.

La variété verte présente des teneurs en TPC supérieures à celles de la variété noire pour tous les temps étudiés. Ainsi, 30 min constitue le temps d'extraction optimal pour les deux variétés.

Les résultats montrent que la température d'extraction influence significativement la teneur TPC. Les teneurs augmentent de 30 à 40 °C, où les valeurs maximales sont enregistrées (7,24 mg EAG/g pour la variété noire et 8,57 mg EAG/g pour la variété verte), puis diminuent progressivement à 50 °C et à 60 °C. Cette évolution s'explique par une amélioration d'extraction à température modérée, suivie d'une dégradation partielle des composés phénoliques à des températures plus élevées. La variété verte d'olivier présente des teneurs plus élevées que la variété noire, ce qui témoigne de sa plus grande richesse en polyphénols. Ainsi, 40 °C constitue la température optimale pour maximiser l'extraction des composés phénoliques totaux.

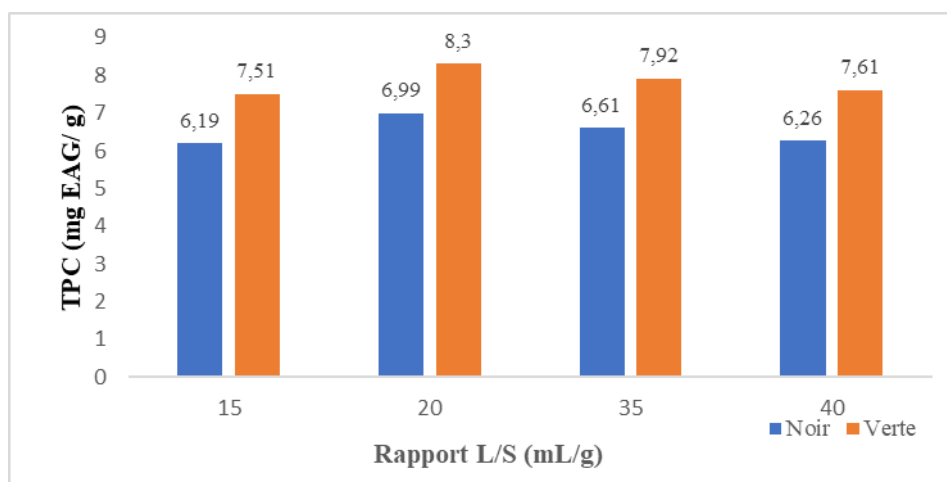


Fig. V.5 : Résultats de TPC des échantillons de grignon d'olive en fonction du rapport (L/S) d'extraction

Les résultats montrent que le rapport liquide/solide (L/S) influence la teneur en TPC des extraits d'olivier. Les deux échantillons atteignent leur teneur maximale au rapport de 25 mL/g, avec 6,99 mg EAG/g pour la variété noire et 8,30 mg EAG/g pour la variété verte. La variété verte d'olivier présente une teneur en composés phénoliques supérieure à celle de la variété noire. Ainsi, le rapport liquide/solide de 25 mL/g constitue la condition optimale pour maximiser l'extraction des composés phénoliques totaux des deux variétés.

V.3.2 Détermination de la teneur des flavonoïdes totaux (TFC)

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents échantillons de grignon d'olive [9]. L'absorbance est mesurée à 510 nm par spectroscopie UV. Les concentrations des flavonoïdes des différents échantillons de grignon d'olive sont déduites à partir de la courbe d'étalonnage (figure V.6).

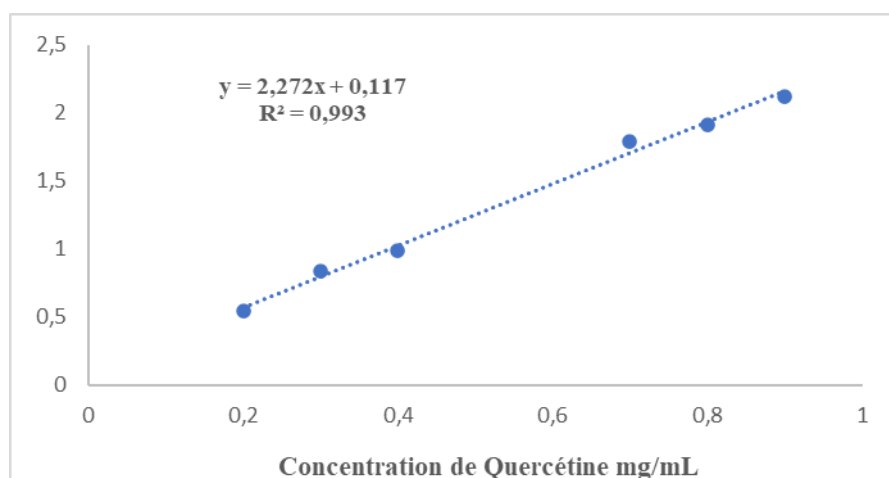


Fig. V.6 : Courbe étalonnage de quercétine

La teneur en flavonoïdes totaux (TFC) des extraits de grignon d'olive a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine dont l'équation de régression est : $y = 0,409x - 0,169$, ($R^2 = 0,985$). Les résultats des teneurs en TFC des extraits obtenus sous différentes conditions d'extraction, notamment le temps, la température et le rapport solide/liquide, sont présentés dans les figures V.7, V.8 et V.9.

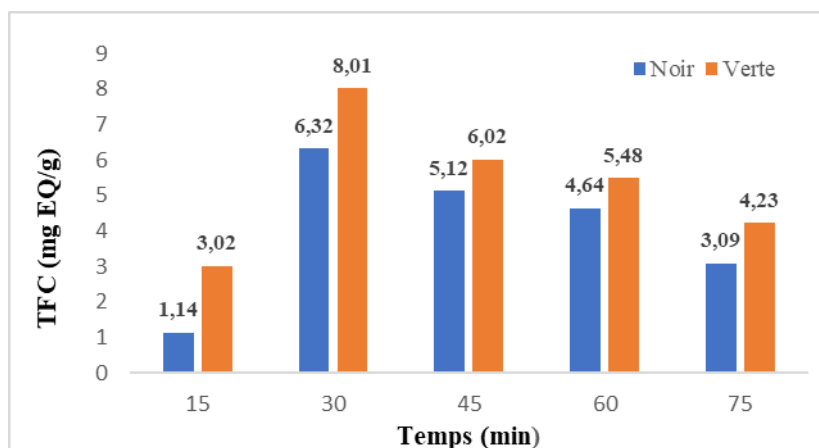


Fig. V.7 : Résultats de TFC des échantillons de grignon d'olive en fonction du temps d'extraction.

L'étude d'influence de ces paramètres a permis d'évaluer leur effet sur l'extraction des flavonoïdes présents dans le grignon d'olive des deux variétés étudiées, noire (N) et verte (V). Les résultats montrent que la teneur en TFC augmente au bout de 30 min, où les valeurs maximales sont obtenues (6,32 mg EQ/g pour la variété noire et 8,01 mg EQ/g pour la variété verte), puis diminue progressivement avec l'écoulement du temps d'extraction. Cette évolution est liée à une meilleure extraction des flavonoïdes au début du procédé, suivie de leur dégradation lors d'une exposition prolongée aux ultrasons. La variété verte présente des teneurs en flavonoïdes plus élevées que la variété noire, indiquant qu'elle est plus riche en composés bioactifs. Ainsi, le temps de 30 min constitue le temps d'extraction optimal pour les deux variétés, avec un rendement plus élevé pour la variété verte.

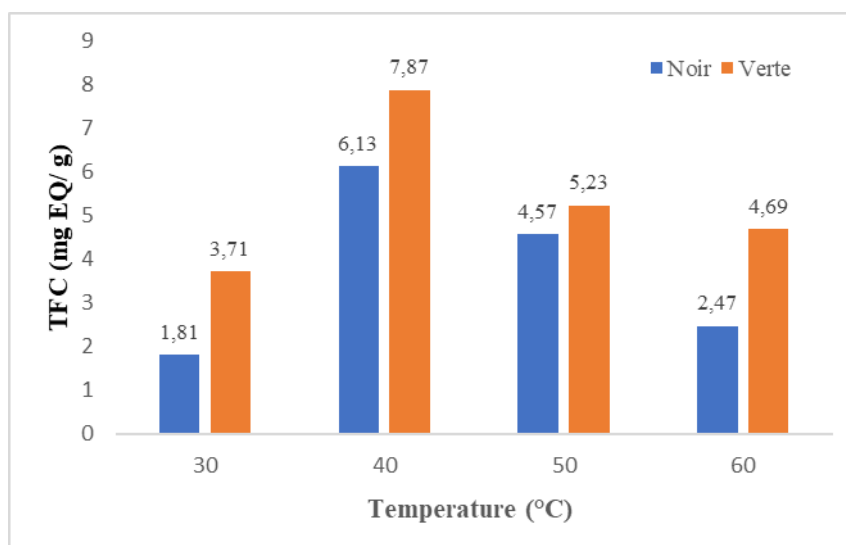


Fig. V.8 : Résultats de TFC des échantillons de grignon d'olive en fonction de la température d'extraction

Ces résultats montrent que la teneur en TFC augmente au 40 °C, où les valeurs maximales sont enregistrées (6,13 mg EQ/g pour la variété noire et 7,87 mg EQ/g pour la variété verte), puis diminue avec l'augmentation de la température.

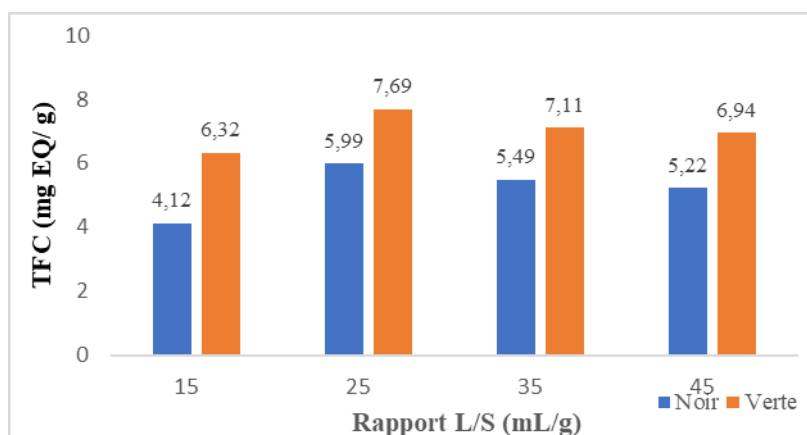


Fig. V.9 : Résultats de TFC des échantillons de grignon d'olive en fonction du rapport solide/solvant d'extraction.

Cette évolution est liée à une meilleure extraction des flavonoïdes à température modérée, suivie d'une dégradation partielle de ces composés à des températures plus élevées. La variété verte présente des teneurs plus élevées que la variété noire, indiquant une plus grande richesse en flavonoïdes. Ainsi, 40 °C constitue la température optimale d'extraction.

Le rapport liquide/solide (L/S) influence fortement la teneur TFC des extraits de deux variétés d'olivier. Les teneurs augmentent jusqu'à 25 mL/g, où elles atteignent un maximum (5,99 mg

EQ/g pour la variété noire et 7,69 mg EQ/g pour la variété verte), grâce à une meilleure extraction des composés. Au-delà de ce rapport, une diminution est observée en raison d'un effet de dilution et d'une baisse du gradient de concentration. La variété verte présente des teneurs plus élevées que la variété noire pour tous les rapports étudiés. Le rapport optimal est donc de 25 mL/g.

V.4 Analyse FT-IR

La figure V.10, illustre les spectre FT-IR des deux variétés noir et vert. Les spectres FT-IR des extraits de grignon d'olivier noire (AA-N) et verte (AA-V) obtenus par extraction assistée par ultrasons à l'aide du solvant eutectique profond naturel à base d'acide acétique comme donneur d'H présente des profils globalement similaires, indiquant la présence de composés bioactifs appartenant aux mêmes familles chimiques.

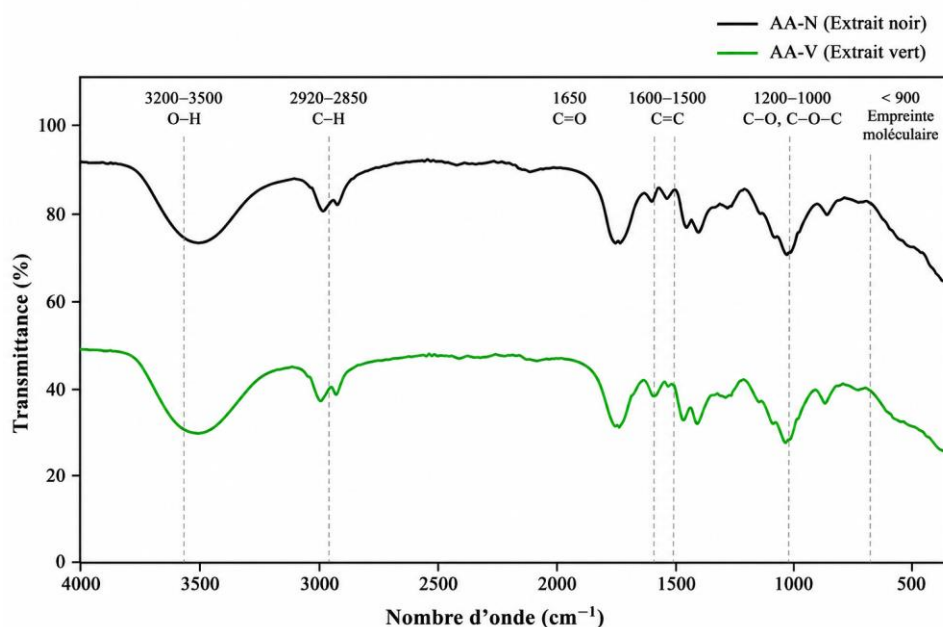


Fig. V.10 : Caractérisation FT-IR des extraits de grignon d'olivier AA-N et AA-V

Une large bande d'absorption observée entre **3200 et 3500 cm^{-1}** est attribuée aux vibrations d'élongation des groupements hydroxyles (**O-H**). Cette bande est caractéristique des composés phénoliques, des flavonoïdes, des alcools ainsi que des molécules d'eau impliquées dans des liaisons hydrogène. Son intensité importante traduit la richesse des extraits en composés hydroxylés connus pour leurs propriétés antioxydantes [9, 10]. Les bandes localisées aux environs de **2920–2850 cm^{-1}** correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons **C-H** des groupements aliphatiques **CH₂** et **CH₃**, témoignant de la présence de constituants organiques issus de la matrice végétale de grignon d'olivier [11]. Une bande

d'absorption est observée autour de 1650 cm^{-1} , correspondant principalement aux vibrations des groupements carbonyles (C=O) ainsi qu'à la déformation des molécules d'eau adsorbées. Cette région spectrale peut également être associée à la présence d'acides phénoliques et d'autres composés oxygénés présents dans les extraits [10]. Les bandes comprises entre 1600 et 1500 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations des doubles liaisons C=C des noyaux aromatiques. Elles sont caractéristiques des composés phénoliques et des flavonoïdes, principaux responsables des propriétés antioxydantes des extraits de grignon d'olivier [12, 13]. La région comprise entre 1200 et 1000 cm^{-1} présente plusieurs bandes correspondant aux vibrations des liaisons C-O , C-O-C et C-C , caractéristiques des alcools, des esters, des glucides ainsi que des composés phénoliques glycosylés présents dans les extraits [9]. Enfin, la région située en dessous de 900 cm^{-1} constitue l'empreinte moléculaire « fingerprint » des extraits. Les bandes observées dans cette zone sont spécifiques de la structure des composés organiques présents et confirment la complexité de la composition chimique des extraits étudiés [11].

La comparaison des spectres AA-N et AA-V montre la présence des mêmes principales bandes d'absorption avec quelques variations d'intensité attribuées aux différences de composition entre les extraits de grignons d'olivier noires et vertes. Les bandes associées aux groupements hydroxyles, carbonyles et aromatiques confirment la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes, en accord avec les résultats des dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et de l'activité antioxydante obtenus dans cette étude [13].

V.5. Résultats d'activité antioxydante des extraits

La méthode du radical libre DPPH est une technique simple, rapide et efficace pour évaluer l'activité antioxydante des extraits végétaux [14]. Elle repose sur la réduction du radical stable **2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)**, de couleur violette, par les composés antioxydants capables de lui céder un électron ou un atome d'hydrogène [15]. Cette réaction provoque un changement de couleur du violet au jaune pâle, accompagné d'une diminution d'absorbance mesurée à 515 nm [15, 16]. Le pourcentage d'inhibition du DPPH est alors utilisé pour estimer la capacité antioxydante des échantillons étudiés. Grâce à sa simplicité, sa rapidité et sa reproductibilité, cette méthode est largement utilisée pour l'évaluation du potentiel antioxydant des extraits naturels [16, 17].

Les figures V.11, V.12 et V.13 présentent l'influence des paramètres d'extraction, notamment le **temps**, la **température** et le **rapport liquide/solide** sur le pourcentage d'inhibition du

radical libre **DPPH** des extraits obtenus à partir des deux variétés de grignon d'olive, à savoir la variété **noire (N)** et la variété **verte (V)**.

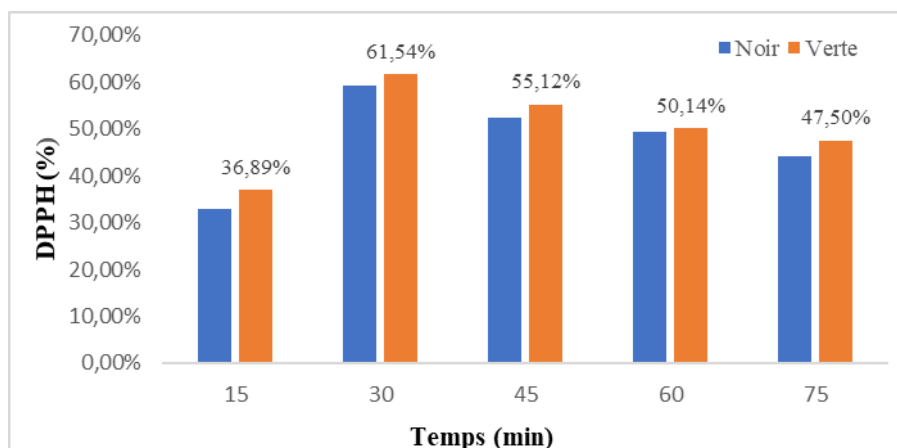


Fig. V.11 : Résultats de l'activité antioxydante (DPPH) des échantillons de grignon d'olive en fonction du temps d'extraction.

Les résultats montrent que l'activité antioxydante (DPPH) est influencée par le temps d'extraction. Les valeurs augmentent après 30 min, où les pourcentages d'inhibition maximaux sont obtenus (59,30 % pour la variété noire et 61,54 % pour la variété verte), puis diminuent progressivement avec l'augmentation du temps d'extraction.

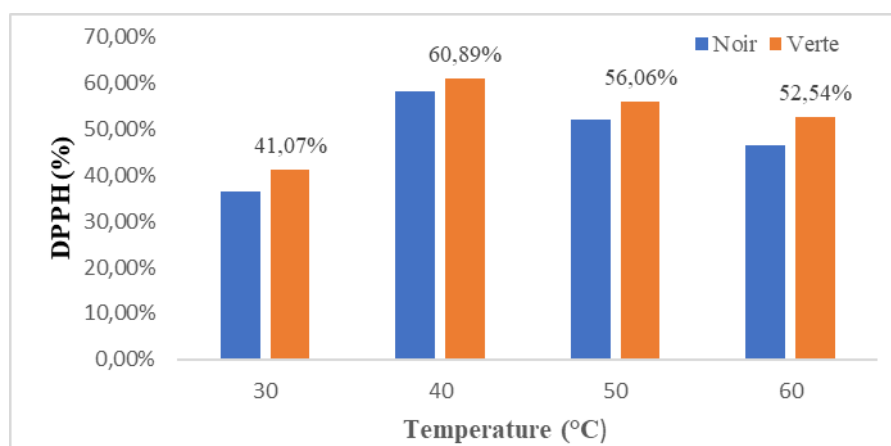


Fig. V.12 : Résultats de l'activité antioxydante (DPPH) des échantillons de grignon d'olive en fonction de la température d'extraction

Cette diminution est probablement due à la dégradation des composés antioxydants lors d'une exposition prolongée aux ultrasons. La variété verte d'olivier présente une activité

antioxydante supérieure à celle de la variété noire pour tous les temps étudiés. Ainsi, 30 min représente le temps optimal pour obtenir la meilleure activité antioxydante des extraits.

Les résultats montrent que la température d'extraction influence significativement l'activité antioxydante (DPPH) des extraits d'olivier. L'activité augmente avec l'augmentation de température de 30 à 40 °C, où les valeurs maximales sont enregistrées (58,10 % pour la variété noire et 60,89 % pour la variété verte), puis diminue progressivement en atteignant 50 °C et 60 °C. Cette évolution s'explique par une meilleure extraction des composés antioxydants à température modérée, suivie d'une dégradation partielle de ces molécules à des températures plus élevées. La variété verte d'olivier présente une activité antioxydante supérieure à celle de la variété noire, traduisant sa plus grande richesse en composés bioactifs. Ainsi, 40 °C constitue la température optimale pour maximiser l'activité antioxydante des extraits.

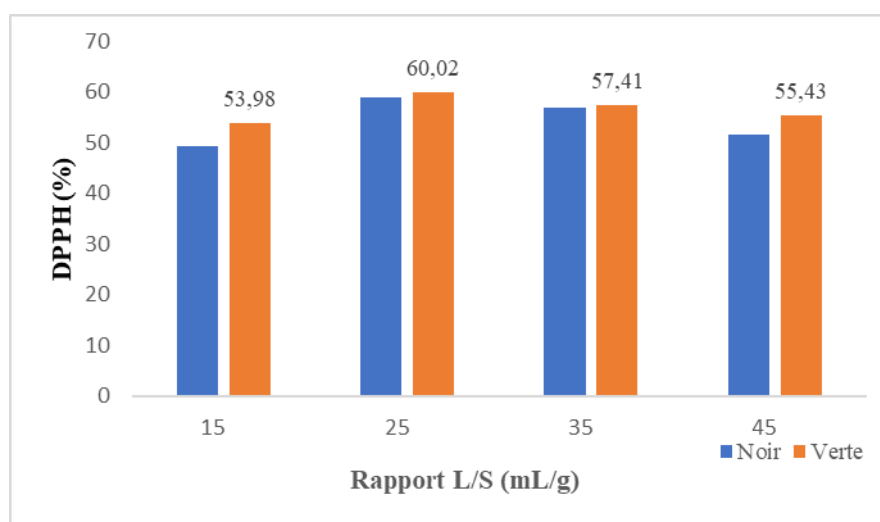


Fig. V.13 : Résultats d'activité antioxydante (DPPH) des échantillons de grignon d'olive en fonction du rapport solvant/solide d'extraction.

Le rapport liquide/solide influence l'activité antioxydante des extraits de deux variétés d'olivier. L'activité augmente avec l'augmentation de rapport jusqu'au 25 mL/g (maximum : 58,90 % pour la variété noire et 60,02 % pour la variété verte), puis diminue à des rapports plus élevés à cause d'un effet de dilution. La variété verte présente une activité plus élevée que la variété noire.

V.6 Résultats d'activité antimicrobienne des extraits

La figure V.14 présente l'impact des extraits idéals des deux variétés de grignon d'olive, à savoir la variété **noire (N)** et la variété **verte (V)** sur la croissance microbienne.

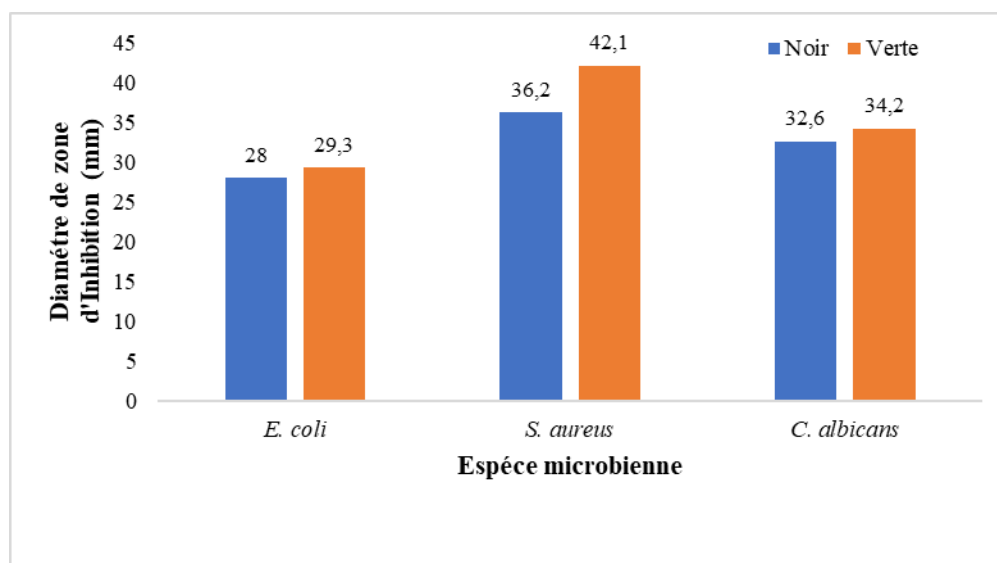


Fig. V.14 : Résultats d'activité antimicrobienne des échantillons de grignon d'olive.

Les résultats montrent que les espèces microbiennes objet d'étude sont influencées significativement aux extraits d'olivier. L'activité antimicrobienne est maximale sur l'espèce *S. aureus* (Gram⁺), où les valeurs les plus élevées sont enregistrées (36,2 mm et 42,1), suivie de *C. albicans* (levure) (32,6 mm et 34,2 mm), puis sur *E. coli* (Gram⁻), qui présente la plus faible zone d'inhibition (28 mm et 29,3 mm) pour la variété noire et verte, respectivement. Cette évolution s'explique par la structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif comme *E. coli*, dont la membrane externe riche en lipopolysaccharides dont elle constitue une barrière supplémentaire limitant la pénétration des composés phénoliques, contrairement au *S. aureus* dont la paroi reste plus perméable à ces composés. La variété verte d'olivier présente une activité antimicrobienne supérieure à celle de la variété noire pour les trois souches testées, traduisant sa plus grande richesse en composés bioactifs. Ainsi, *S. aureus* apparaît comme la souche la plus sensible aux extraits d'olivier étudiés.

V.7 Résultats du plan d'expérience

Comme décrit dans la section expérimentale, trois variables opérationnelles ont été choisies pour optimiser toutes les réponses à savoir TPC, TFC, DPPH et activité antimicrobienne des deux variétés de grignon d'olive : rapport L/S (mL/g), la température (°C) et le temps d'extraction (min).

V.7.1 Optimisation pour TPC, TFC, DPPH et activité antimicrobienne**V.7.1.1 Variété de grignon d'olive vert**

Une procédure expérimentale de Box-Behnken comprenant trois paramètres et trois niveaux différents d'expérience, a été mise en place pour étudier la performance de variété de grignon d'olive vert sur toutes les réponses à savoir TPC, TFC, DPPH et activité antimicrobienne et de même pour identifier les interactions entre les différentes variables.

Les conditions expérimentales des 17 expériences du BBD sont incluses dans le tableau 17, avec les réponses mesurées pour chacune des expériences.

Tableau 17 : Influence des variables (température, temps, rapport liquide/solide, type de solvant) sur les réponses (TPC, TFC, DPPH et activité antimicrobienne) de la variété grignon d'olive vert.

	Température (°C)	Temps (min)	Rapport L/S (mL/g)	TPC (mg EAG/g)	TFC (mg EQ/g)	Activité antioxyda nte (%)	Activité antibactérienne <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 DZI (mm)	Activité antibactérienne <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862 DZI (mm)	Activité antifongique <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 DZI (mm)
	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Repense 1	Repense 2	Repense 3	Repense 4	Repense 5	Repense 6
N°									
1	30	45	25	4.11	3.40	40.01	15.8	25.7	24.5
2	40	30	25	8.57	7.32	60.22	28.5	41.6	32.3
3	30	30	15	4.51	3.55	39.96	16.6	26.8	24.9
4	30	15	25	4.02	3.02	36.89	14.7	25.5	23.4
5	50	45	25	6.37	5.27	50.32	22.9	35.2	29.2
6	40	30	25	8.94	7.49	60.99	29.1	41.5	34.1
7	40	15	35	6.78	5.17	56.76	24.2	35.0	29.7
8	40	45	35	7.83	6.02	55.12	25.3	37.6	30.3
9	40	30	25	8.93	8.01	61.19	28.7	42.1	32.3
10	50	30	15	5.82	4.16	52.11	20.8	33.1	28.3
11	50	15	25	5.20	4.00	47.15	18.7	30.8	27.1
12	30	30	35	4.65	3.71	41.07	17.2	28.6	25.7
13	40	45	15	5.79	4.19	52.44	21.4	33.9	28.7
14	40	15	15	5.14	4.09	51.68	20.0	32.4	27.8
15	50	30	35	7.02	5.23	57.06	25.1	35.4	30.1
16	40	30	25	8.34	7.64	61.54	28.8	40.9	33.0
17	40	30	25	9.02	7.87	60.89	29.3	40.8	34.2

❖ Analyse statistique

L'analyse de la variance a été réalisée sur les résultats obtenus (tableau 17). Cette analyse permet de tester la pertinence des variables impliquées dans le plan expérimental et de représenter graphiquement l'importance de chaque paramètre sur les réponses obtenues.

Le principe d'analyse consiste à comparer la variance des expériences réalisées entre elles de manière à évaluer si elles sont différentes ou non de la moyenne. Il faut alors comparer la variance de diverses répétitions d'un échantillon à la variance des moyennes entre tous les échantillons [18]. Le rapport entre ces deux variances est appelé "ratio-F". Ainsi, la pertinence statistique de chaque facteur est déterminée et peut être représentée dans le tableau 17. La valeur "ratio-F" dépend du nombre de degrés de liberté (DI) impliqués dans le modèle et représentée dans la colonne valeur-P à un niveau de confiance de 95% par référence à une table statistique. De ce fait, les effets inférieurs à 0,05 dans cette colonne sont considérés comme significatifs.

Tableau 18 : Paramètres statistiques de la conception Box-Behnken de TPC, TFC, activité antioxydante (DPPH) et activité antimicrobienne pour la variété de grignon d'olive vert.

Réponse	Source	Somme des carrés	Ratio-F	Valeur-P
TPC	A-Température	6,34	41,96	0,0003
	B-Temps	1,10	7,25	0,0310
	C-Rapport L/S	3,15	20,86	0,0026
	AB	0,2916	1,93	0,2073
	AC	0,2809	1,86	0,2149
	BC	0,0400	0,2648	0,6227
	A ²	23,45	155,27	< 0,0001
	B ²	9,16	60,65	0,0001
	C ²	3,41	22,58	0,0021
TFC	A-Température	3,10	27,46	0,0012
	B-Temps	0,8450	7,49	0,0291
	C-Rapport L/S	2,14	18,98	0,0033
	AB	0,1980	1,75	0,2269
	AC	0,2070	1,83	0,2177
	BC	0,1406	1,25	0,3012
	A ²	20,83	184,54	< 0,0001
	B ²	9,72	86,09	< 0,0001
	C ²	6,89	61,04	0,0001
DPPH	A-Température	296,58	139,40	< 0,0001
	B-Temps	3,66	1,72	0,2311
	C-Rapport L/S	23,87	11,22	0,0123
	AB	0,0006	0,0003	0,9868
	AC	3,69	1,73	0,2295
	BC	1,44	0,6768	0,4378

	A ²	597,43	280,80	< 0.0001
	B ²	125,60	59,04	0,0001
	C ²	9,53	4,48	0,0721
<i>E. coli</i>	A-Température	67,28	168,62	< 0.0001
	B-Temps	7,61	19,06	0,0033
	C-Rapport L/S	21,13	52,94	0,0002
	AB	2,40	6,02	0,0439
	AC	3,42	8,58	0,0221
	BC	0,0225	0,0564	0,8191
	A ²	196,27	491,91	< 0.0001
	B ²	68,30	171,17	< 0.0001
	C ²	19,06	47,76	0,0002
<i>S. aureus</i>	A-Température	97,30	317,46	< 0.0001
	B-Temps	9,46	30,87	0,0009
	C-Rapport L/S	13,52	44,11	0,0003
	AB	4,41	14,39	0,0068
	AC	0,0625	0,2039	0,6652
	BC	0,3025	0,9869	0,3536
	A ²	263,78	860,61	< 0.0001
	B ²	73,04	238,31	< 0.0001
	C ²	26,11	85,17	< 0.0001
<i>C. albicans</i>	A-Température	32,81	57,76	0,0001
	B-Temps	2,76	4,86	0,0633
	C-Rapport L/S	4,65	8,19	0,0243
	AB	0,2500	0,4402	0,5283
	AC	0,2500	0,4402	0,5283
	BC	0,0225	0,0396	0,8479
	A ²	85,36	150,30	< 0.0001
	B ²	29,07	51,18	0,0002
	C ²	8,58	15,11	0,0060

Selon le tableau ci-dessus, toute valeur est jugée comme significatif pour toutes les réponses étudiées si son Valeur- $p < 0,05$.

La figure 15 montre les tracés de diagnostic de cette étude d'optimisation. Pour évaluer le degré d'explication du modèle par rapport aux réponses mesurées, le coefficient de corrélation R^2 est établi. La valeur R^2 obtenue est supérieure à 0,981 pour les différentes réponses (TPC, TFC, activité antioxydante (DPPH), activité antimicrobienne (*E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*), soit plus de 98,1 % de la variation de variable réponse qui s'explique par un modèle, dont on assure un ajustement satisfaisant du modèle quadratique avec les données expérimentales. Ces corrélations sont confirmées par les valeurs de R^2 ajusté ($R^2_{\text{adj}} > 0,9492$).

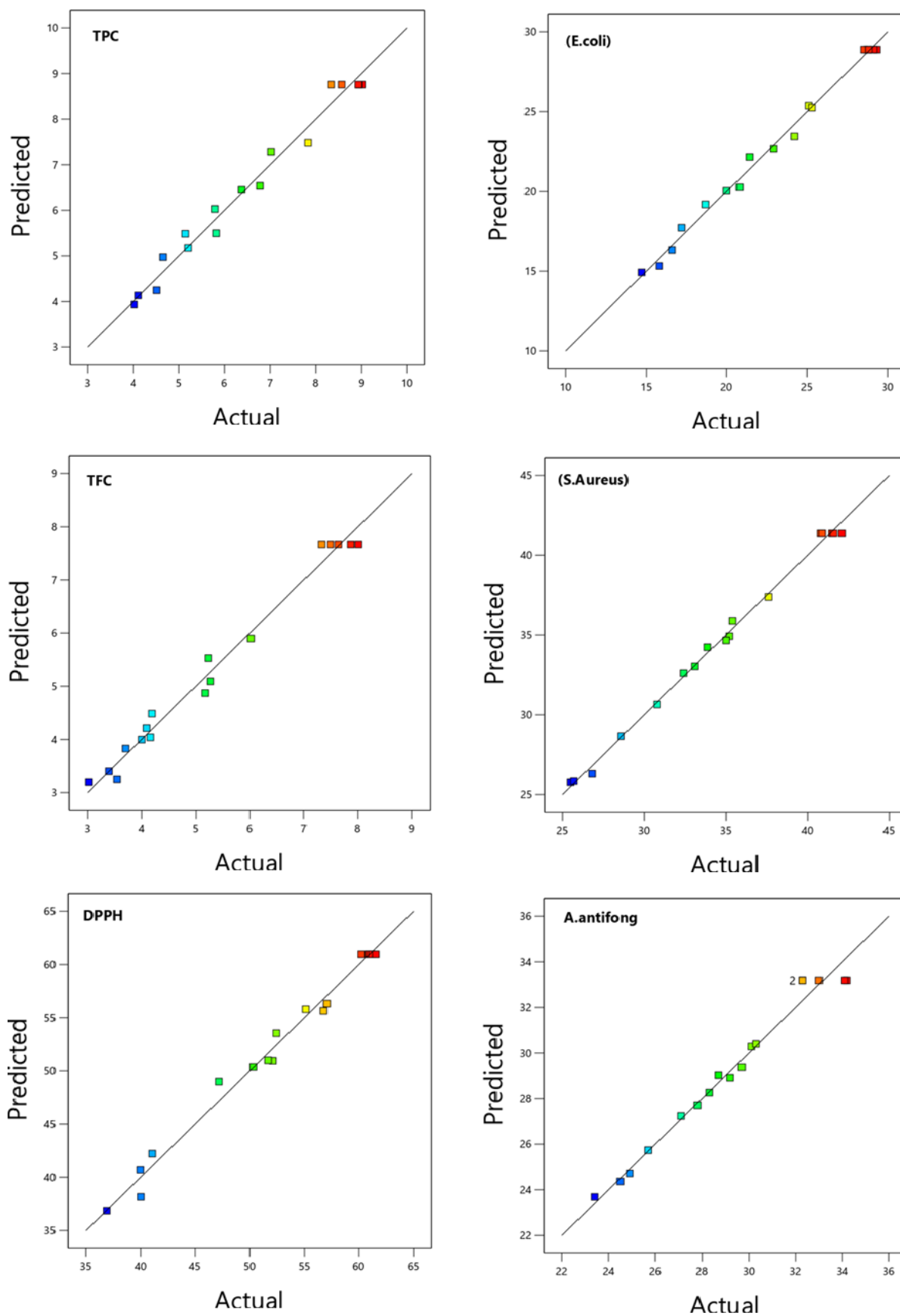


Fig. V.15 : Comparaison des réponses prévu et observé pour la variété du grignon d'olive vert

❖ Analyse de la surface de réponse

Des courbes de réponse (figure 16) sont tracées en fixant successivement les trois facteurs à des valeurs centrales.

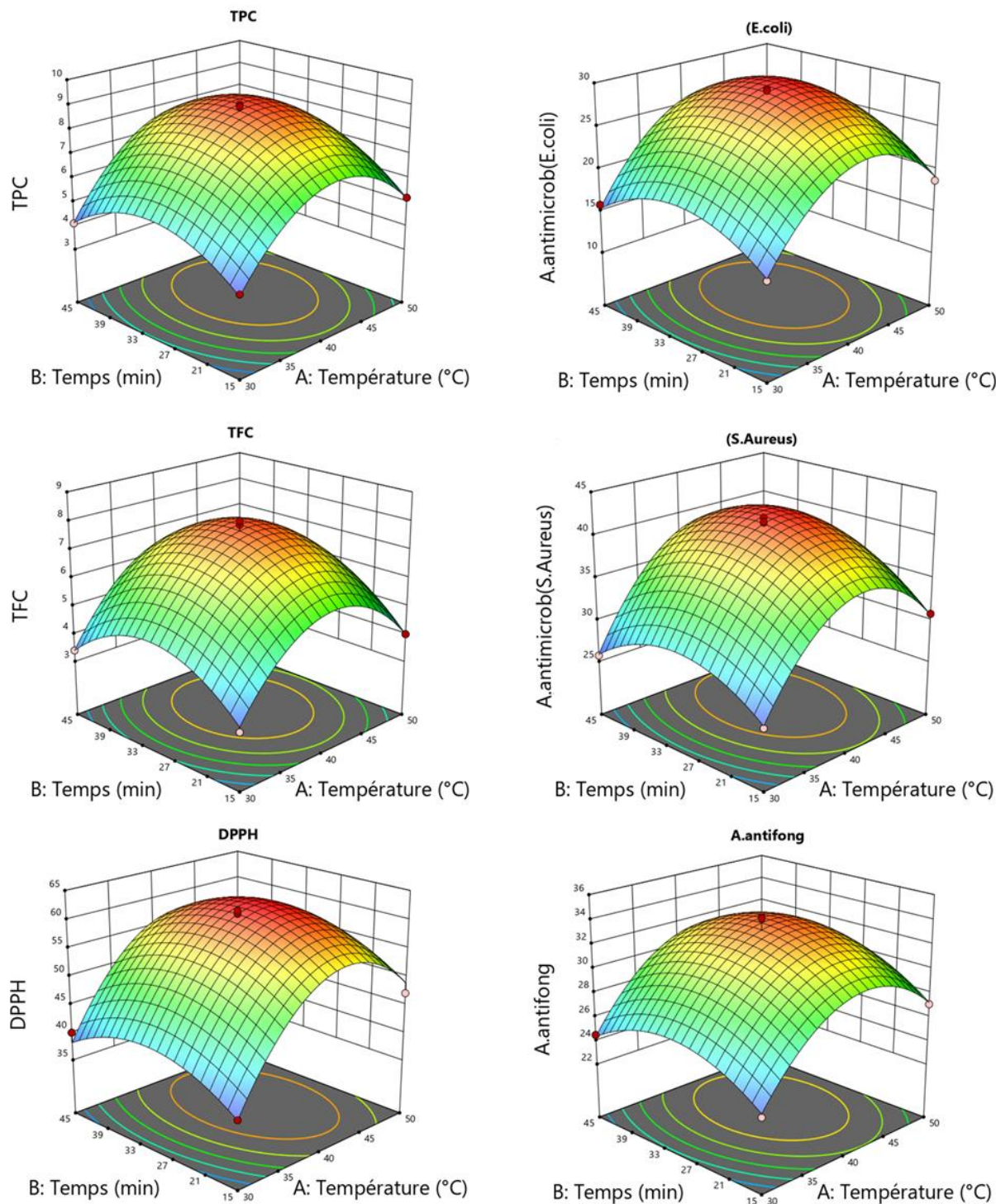


Fig. V.16 : Surfaces des réponses pour la variété du grignon d'olive vert Temps vs. Température

Les résultats ont confirmé que les effets de température et le temps d'extraction étaient significatifs pour toutes les réponses.

V.7.1.2 Variété de grignon d'olive noir

La procédure expérimentale de Box-Behnken comprenant trois paramètres et trois niveaux différents d'expérience, a été aussi mise en place pour étudier la performance de deuxième variété de grignon d'olive ; il s'agit de celle de grignon d'olive noir vis-à-vis les mêmes réponses précédemment décrit, et de même pour vérifier les interactions entre les différentes variables.

Les conditions expérimentales des 17 expériences du BBD sont incluses dans le tableau 19, avec les réponses mesurées pour chacune des expériences.

Tableau 19 : Influence des variables (température, temps, rapport liquide/solide) sur les réponses (TPC, TFC, DPPH et activité antimicrobienne, activité antifongique) de la variété grignon d'olive noir.

	Température (°C)	Temps (min)	Rapport L/S (mL/g)	TPC (mg EAG/g)	TFC (mg EQ/g)	Activité antioxydante (%)	Activité antimicrobienne <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 DZI (mm)	Activité antimicrobienne <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862 DZI (mm)	Activité antifongique <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 DZI (mm)
	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Repense 1	Repense 2	Repense 3	Repense 4		Repense 5
N°									
1	30	45	25	2.87	1.23	33.69	13.9	21.1	19.7
2	40	30	25	7.07	6.32	57.20	27.5	36.1	31.8
3	30	30	15	2.51	1.65	35.00	16.1	22.8	21.6
4	30	15	25	2.68	1.14	32.89	13.7	20.0	19.1
5	50	45	25	5.00	3.77	48.91	20.9	33.2	26.4
6	40	30	25	7.24	5.99	59.07	27.1	35.5	32.4
7	40	15	35	5.18	4.00	52.26	21.8	33.3	26.8
8	40	45	35	6.11	5.12	52.37	22.3	34.2	28.9
9	40	30	25	6.99	6.07	57.59	27.3	35.0	32.1
10	50	30	15	3.82	2.46	40.70	18.8	24.8	23.9
11	50	15	25	3.39	2.06	40.05	17.7	24.0	23.1
12	30	30	35	2.95	1.81	36.36	16.8	22.9	21.8
13	40	45	15	4.10	2.99	44.44	18.9	27.6	24.3
14	40	15	15	4.59	3.19	47.09	20.1	30.6	25.3
15	50	30	35	5.70	4.83	52.14	22.6	33.9	28.1
16	40	30	25	8.03	5.89	59.33	26.9	35.6	31.9
17	40	30	25	7.83	6.13	58.12	28.0	36.2	32.6

❖ Analyse statistique

Une analyse de la variance a été effectuée sur les résultats obtenus (tableau 20). Cela permet de vérifier la pertinence des variables impliquées dans le plan expérimental et de représenter graphiquement l'importance de chaque paramètre sur la réponse obtenue. Le principe de l'analyse est la même précédemment décrit.

Tableau 20 : Paramètres statistiques de la conception Box-Behnken de TPC, TFC, activité antioxydante et activité antimicrobienne pour la variété de grignon d'olive noir.

Réponse	Source	Somme des carrés	Ratio-F	Valeur-P
TPC	A-Température	5,95	31,89	0,0008
	B-Temps	0,6272	3,36	0,1094
	C-Rapport L/S	3,03	16,21	0,0050
	AB	0,5041	2,70	0,1443
	AC	0,5184	2,78	0,1395
	BC	0,5041	2,70	0,1443
	A ²	28,43	152,34	< 0,0001
	B ²	7,66	41,03	0,0004
	C ²	4,99	26,73	0,0013
TFC	A-Température	6,64	194,30	< 0,0001
	B-Temps	0,9248	27,05	0,0013
	C-Rapport L/S	3,74	109,39	< 0,0001
	AB	0,6561	19,19	0,0032
	AC	1,22	35,71	0,0006
	BC	0,4356	12,74	0,0091
	A ²	28,11	822,14	< 0,0001
	B ²	8,81	257,59	< 0,0001
	C ²	2,75	80,55	< 0,0001
DPPH	A-Température	240,46	76,13	< 0,0001
	B-Temps	6,34	2,01	0,1996
	C-Rapport L/S	83,85	26,55	0,0013
	AB	16,24	5,14	0,0577
	AC	25,40	8,04	0,0252
	BC	1,90	0,6029	0,4629
	A ²	788,37	249,59	< 0,0001
	B ²	136,49	43,21	0,0003
	C ²	52,42	16,60	0,0047
E. coli	A-Température	47,53	91,42	< 0,0001
	B-Temps	0,9112	1,75	0,2271
	C-Rapport L/S	11,52	22,16	0,0022
	AB	2,25	4,33	0,0761
	AC	2,40	4,62	0,0687
	BC	0,7225	1,39	0,2770
	A ²	178,17	342,68	< 0,0001
	B ²	78,03	150,09	< 0,0001
	C ²	21,89	42,10	0,0003
S. aureus	A-Température	105,85	34,67	0,0006

	B-Temps	8,41	2,75	0,1410
	C-Rapport L/S	42,78	14,01	0,0072
	AB	16,40	5,37	0,0536
	AC	20,25	6,63	0,0367
	BC	3,80	1,25	0,3012
	A ²	284,15	93,08	< 0.0001
	B ²	35,17	11,52	0,0115
	C ²	7,85	2,57	0,1530
C. albicans	A-Température	46,56	139,02	< 0.0001
	B-Temps	3,13	9,33	0,0185
	C-Rapport L/S	13,78	41,15	0,0004
	AB	1,82	5,44	0,0524
	AC	4,00	11,94	0,0106
	BC	2,40	7,17	0,0316
	A ²	166,06	495,80	< 0.0001
	B ²	60,96	182,01	< 0.0001
	C ²	17,35	51,81	0,0002

Selon le tableau ci-dessus, toute valeur est jugée comme significatif pour toutes les réponses étudiées si son Valeur-p < 0,05.

Un modèle quadratique a été choisi pour déterminer les relations mathématiques entre les réponses étudiées et les facteurs efficaces.

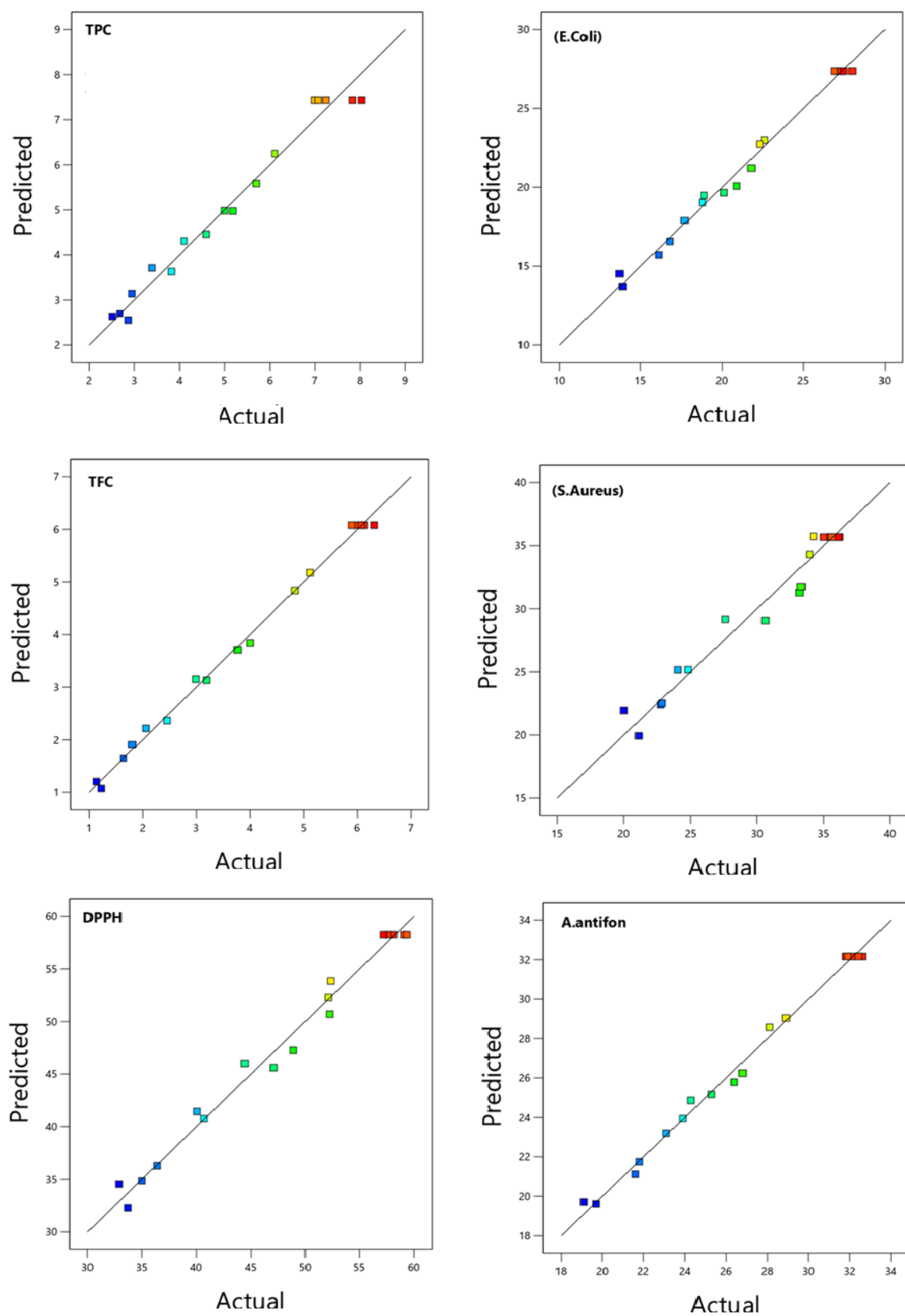


Fig. V.17 : Comparaison des réponses prévu et observé pour la variété du grignon d'olive

noir

La figure 17 illustre les tracés de diagnostic de cette étude d'optimisation. Pour évaluer le degré d'explication du modèle par rapport aux réponses mesurées, le coefficient de corrélation R^2 est établi. La valeur R^2 obtenue est supérieure à 0,99 pour les pour les différentes réponses (TPC, TFC, activité antioxydante DPPH, activité antimicrobienne (*E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*), soit plus de 91,3 % de la variation de variable réponse qui s'explique par un modèle, dont on assure un ajustement satisfaisant du modèle quadratique avec les données expérimentales. Ces corrélations sont confirmées par les valeurs de R^2 ajusté ($R^2_{\text{adj}} > 0,913$).

❖ Analyse de la surface de réponse

Des courbes de réponse (figure 18) sont tracées en fixant successivement les trois facteurs à des valeurs centrales.

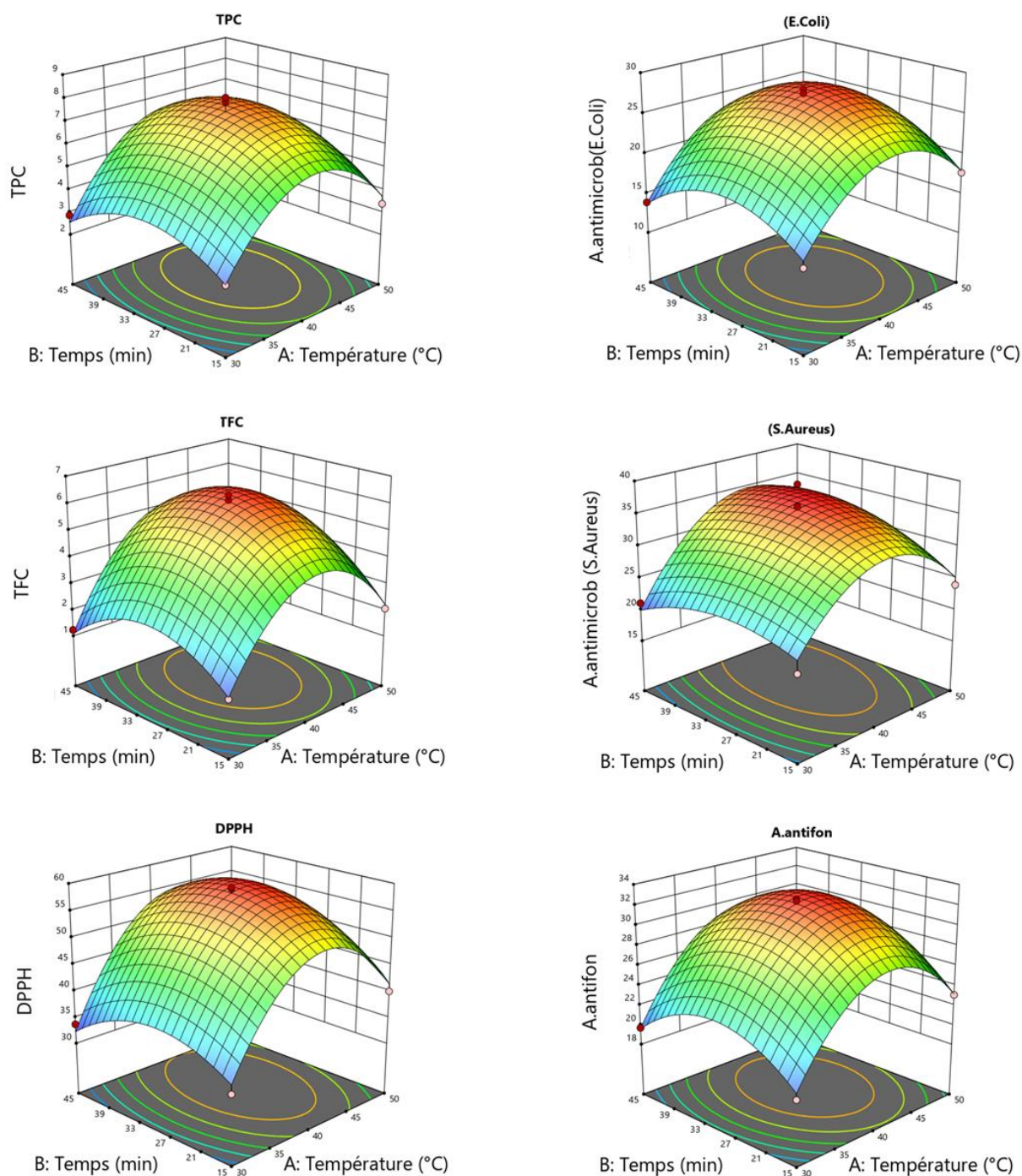


Fig. V.18 : Surfaces des réponses pour la variété du grignon d'olive vert Temps vs. Température

Les résultats ont confirmé que les effets de température et le temps d'extraction étaient significatifs pour toutes les réponses.

Référence bibliographique

- [1]. Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26, 960-969.
- [2]. Ferhat, R. (2017). Effect of extraction solvent on total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activities of Algerian pomace olive oil. *International Food Research Journal*, 24(6), 2295-2303.
- [3]. Martínez-Patiño, J.C. (2019). Ultrasound-assisted extraction as a first step in a biorefinery strategy for valorisation of extracted olive pomace. *Energies*, 12, 2679.
- [4]. Khemakhem, I. (2023). Intensification of Biophenols Extraction Yield from Olive Pomace Using Innovative Green Technologies. *Foods*, 12, 271.
- [5]. Aktaş, B., Basmacıoğlu Malayoğlu, H. (2019). Comparison of Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of the Extracts of Grape Seed, Rosemary, Green Tea and Olive Leaf. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 56(1), 77-82.
- [6]. Clodoveo, M. L., Crupi, P., Annunziato, A., Corbo, F. (2022). Innovative Extraction Technologies for Development of Functional Ingredients Based on Polyphenols from Olive Leaves. *Foods*, 11(1), 103.
- [7]. Solomakou, N., Loukri, A., Tsafrakidou, P., Michaelidou, A. M., Mourtzinou, I., Goula, A. M. (2022). Recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds through optimized extraction processes. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 100592.
- [8]. Martínez-Patiño, J. C., Gómez-Cruz, I., Romero, I., Gullón, B., Ruiz, E., Brnčić, M., Castro, E. (2019). Ultrasound-assisted extraction as a first step in a biorefinery strategy for valorisation of extracted olive pomace. *Energies*, 12(14), 2679.
- [9]. Coates J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley. p. 10815-10837.
- [10]. Stuart B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Chichester: John Wiley & Sons.
- [11]. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ, Bryce DL. (2014). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 8th ed. New York: Wiley.
- [12]. Markham KR. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*. London: Academic Press.
- [13]. Bouaziz M, Fki I, Jemai H, Ayadi M, Sayadi S. (2008). Phenolic composition and antioxidant activities of olive leaf extracts. *Food Chemistry*. 109:13-19.

- [14]. Keceli, T. M., Gordon, M. H. (2001). The antioxidant activity and stability of some phenolic compounds and extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(14), 1391-1398.
- [15]. 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), 25-30.
- [16]. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- [17]. Villano, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230-235.
- [18]. Gulzar Ahmad N., Vikas N., Beenish Z., Dar B.N., Mohammad J. A., Sami Al O., Otilia B. Response surface approach to optimize temperature, pH and time on antioxidant properties of wild bush (*Plectranthus rugosus*) honey from high altitude region (Kashmir Valley) of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022. 29, 767–773

Conclusion

Générale

Conclusion générale

Les solvants eutectiques naturels profonds (NADES) représentent une alternative verte et prometteuse aux solvants organiques conventionnels pour l'extraction des composés bioactifs. C'est pour cette raison que leur optimisation doit être correctement étudiée et rigoureusement contrôlée, afin de garantir un rendement d'extraction élevé tout en préservant les propriétés biologiques des composés extraits.

À des fins de valorisation, les grignons d'olive, sous-produits agro-industriels abondants et peu exploités, se prêtent particulièrement bien à ce type d'extraction. Mais pour atteindre un rendement optimal en composés phénoliques, certains paramètres d'extraction (temps, température, rapport liquide/solide) doivent être optimisés et contrôlés. Globalement, ce travail de recherche a vu le jour pour répondre à des questions pertinentes concernant l'optimisation d'extraction des composés bioactifs des grignons d'olive par un NADES à base d'acide acétique, tout en évaluant leur activité antioxydante et antimicrobienne. Suite à cela, notre étude a abouti aux conclusions suivantes :

- La détermination de la teneur en polyphénols totaux (TPC) est importante pour évaluer le potentiel bioactif des extraits de grignons d'olive. Les résultats obtenus montrent que la teneur maximale en TPC est de 8,03 mg EAG/g pour la variété noire et 9,02 mg EAG/g pour la variété verte (temps optimal de 30 min), et que la variété verte présente systématiquement des teneurs plus élevées que la variété noire pour tous les paramètres étudiés.
- La détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (TFC) révèle des valeurs maximales de 6,32 mg EQ/g pour la variété noire et 8,01 mg EQ/g pour la variété verte, confirmant la plus grande richesse de la variété verte en composés bioactifs.
- L'étude de l'influence des paramètres d'extraction a montré qu'un temps de 30 min, une température de 40 °C et un rapport liquide/solide de 25 mL/g constituent les conditions optimales pour maximiser l'extraction des composés phénoliques des deux variétés.
- Les analyses infrarouges (FT-IR) réalisées sur les extraits AA-N et AA-V dévoilent l'existence de plusieurs groupements fonctionnels caractéristiques (hydroxyyles, carbonyles, aromatiques), confirmant la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes en accord avec les résultats des dosages.

- L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH révèle que les extraits obtenus présentent un fort pouvoir de piégeage des radicaux libres, avec des valeurs maximales de 58,10 % pour la variété noire et 60,89 % pour la variété verte à 40 °C, confirmant la supériorité constante de la variété verte pour tous les paramètres étudiés.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne montre que les extraits des deux variétés présentent une inhibition notable vis-à-vis de *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*, avec une sensibilité plus marquée pour *S. aureus* (36,2 mm pour la variété noire et 42,1 mm pour la variété verte), confirmant leurs pouvoir antimicrobien dû aux richesses en composés phénoliques.

Finalement, nous pouvons affirmer que les grignons d'olive, valorisés par extraction NADES, offrent des possibilités intéressantes quant à leur utilisation dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire, et qu'il serait intéressant de les développer davantage dans les futurs travaux.

Nous proposons les perspectives suivantes à notre étude :

- Élargir l'étude en testant d'autres types de NADES (à base d'autres donneurs/accepteurs de liaisons hydrogène) sur le même substrat.
- Approfondir la caractérisation phytochimique par des techniques complémentaires (HPLC, LC-MS) afin d'identifier précisément les molécules responsables des activités observées.
- Envisager une application concrète de ces extraits à l'échelle pilote ou industrielle (formulation cosmétique, complément alimentaire, conservateur naturel).