

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique**  
**Université Saad Dahleb de Blida**  
**Faculté des Sciences**  
**Département de Chimie**



Mémoire présenté par  
**FERROUKHI Imane**  
En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière  
Filière : Chimie  
Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Extraction et étude de l'activité antioxydante des  
composés phénoliques et des lignines des grignons  
d'olives de l'espèce « *Olea Europaea* »**

Soutenu publiquement en Septembre 2015 devant le jury composé de :

M. EL HATTAB	Pr	Président	Université de Blida
O. TOUAFEK	MCB	Examinatrice	Université de Blida
K. BOUTEMAK	MCB	Promotrice	Université de Blida

Promotion 2014-1015

# Remerciements

En premier lieu, je remercie Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à ma promotrice Mme BOUTEMAK Khalida, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, par sa grande patience, par sa disponibilité et ses conseils judicieux.

J'exprime ma profonde gratitude à tous les ingénieurs du Laboratoire de Chimie notamment Mesdames Asma et Meriem, Monsieur Issa ainsi que Melle BOUDJEMAA Amina pour m'y avoir accueillie durant la réalisation de ce travail et permis de mener dans de bonnes conditions.

Un remerciement chaleureux et sincère à Mr M. EL-HATTAB à Mme Y. DAGHBOUCHE, N. BOUZIDI et S. KASMI qui ont fournis beaucoup d'efforts durant tout le long du cycle Master.

Je réserve une attention toute particulière à toute l'équipe de BIOFARM / Blida de m'avoir donné toutes les facilitations quant à la réalisation de l'étude de l'activité antioxydante « test de blanchissement de  $\beta$  carotène » au sein de leur unité de production et d'analyse.

A tous les étudiants de Master de la promotion 2015.

A toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous.

# **Dédicace**

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail :

## **A mes très chers parents**

Sans eux je ne peux être ce que je suis, aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimée toute ma reconnaissance et tout l'amour que je leur porte.

Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices et vos encouragements.

Que dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

## **A mes frères et ma sœur**

Pour leur soutien tout le long de mes études.

## **A mes chers neveux et nièces**

Que j'aime profondément, que dieu les protège.

## **A mes amies ainsi que les étudiants de ma promotion de Master**

## **A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour**

**Imene.**

## ملخص

هذا العمل يحتوي على تثمين نوع من نفايات صناعة الزيتون و المتمثل في الثفل بحيث نهتم من خلال هذه الدراسة على تقييم خصائص مضاد الاكسدة لثفل الزيتون الخام بعد التجفيف.

الجزء الأول من هذه الدراسة يخص الاستخلاص بالنقع للجنين عن طريق عملية CIMV و الفينولات الاجمالية من خلال مزيج من المذيبات المتمثل في الميثانول / الماء. مردود المستخلص المائي/ الكحولي يقدر بـ 5.72% وأشار تحليل هذا المستخلص من خلال CCM وجود المركبات الفينولية في محتوى المستخلص وهذا ما يؤكد نتائج التحليل الكمي باستعمال المتفاعل Follin Ciocalteu حيث وجد 7.5 ميكروغرام مكافئ حمض الغال/ غ مستخلص. على عكس نتائج استخلاص اللجنين حيث قدرت الكمية الموجودة في الثفل بنسبة  $0.22 \pm 7.18\%$ . هذه القيمة جد ضعيفة مقارنة مع القيم المتحصل عليها في الدراسات السابقة.

الشرط الثاني مخصص لدراسة نشاط مضاد الاكسدة للمستخلصات المتحصل عليها سابقا بإتباع اختبارات أي طرق مختلفة : اختبار DPPH، خاصية إرجاع مركب الحديد FRAP و اختبار البتاكروتين/حمض اللينوليك حيث تمت مقارنة النتائج مع مضادات اصطناعية للأكسدة المتمثلة في فيتامين C، BHA، BHT و حمض الغل. بعد تقييم النشاط المضاد للأكسدة تبين أن جميع المستخلصات المتحصل عليها من ثفل الزيتون تحتوي على خصائص مضادة للأكسدة وفق مستويات و قيم مختلفة، ومن هذا تم استنتاج ان مستخرج اللجنين يملك خاصية الارجاع أي النشاط المضاد للأكسدة بنسبة عالية مقارنة مع مستخلص الفينول الكلية.

الكلمات المفتاحية : ثفل/ زيتون/ تثمين مركبات فينولية / لجنين نشاط مضاد الاكسدة / اختبار DPPH / إرجاع مركب الحديد FRAP / اختبار البتاكروتين-حمض اللينوليك.

## Résumé

Le présent travail consiste à valoriser l'un des rejets d'industrie oléicole, en l'occurrence le grignon d'olives. Nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'évaluation des propriétés antioxydantes des grignons d'olives brut après séchage.

La première partie de cette étude concerne l'extraction par macération des lignines par le procédé CIMV et les phénols totaux par un mélange de solvant Méthanol/Eau. Le rendement d'extraction hydro-alcoolique est de l'ordre 5.72%, l'analyse de cet extrait par CCM a révélé la présence des composés phénoliques dans l'extrait, ce qui confirme les résultats de dosage par la méthode de Follin Ciocalteu ou la teneur est de 7.5µg EAG/mg. Par contre les résultats d'extraction des lignines ont donné une teneur de 7.18±0.22%, cette valeur est extrêmes faible par rapport à celle de littérature.

la deuxième partie est consacrée pour l'étude de l'activité antioxydante des extraits obtenus par le biais de divers tests à savoir : piégeage du radical libre DPPH , réduction de fer « FRAP » et le test de blanchissement par β carotène, en les comparant avec des antioxydants synthétiques vitamine C, BHA, BHT et l'acide gallique. L'évaluation de l'activité antioxydante montre que tous les extraits issus de grignons d'olives représentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux, de telle sorte que l'extrait des lignines possède une meilleure capacité réductrice par rapport à l'extrait des phénols totaux.

**Mots clés :** Grignons /Olive/ Valorisation Composés phénoliques / lignines activité antioxydante / DDPH / Pouvoir réducteur FRAP / Blanchissement β carotène.

## Abstract

This work is to develop one of the discharges olive industry, in this case the olive pomace. We were interested in this work to the study of antioxidant properties of crude olive cake after drying.

The first part of this study concerns the extraction by maceration of lignin by the process CIMV and total phenols by a solvent mixture of methanol / water. The hydro-alcoholic extraction yield is about 5.72%, analysis of this extract by CTL indicated the presence of phenolic compounds in the extract, which confirms the assay results by the method of Follin Ciocalteu or the content of EAG 7.5 $\mu$ g / mg. As against the lignin extraction results gave a grade of  $7.18 \pm 0.22\%$ , this value is extreme low compared to that of literature.

The second part is devoted to the study of the antioxidant activity of the extracts obtained through various tests namely: trapping the free radical DPPH, iron reduction "FRAP" and bleaching test for  $\beta$ -carotene, in comparison with synthetic antioxidants vitamin C, BHA, BHT and gallic acid. Evaluation of antioxidant activity shows that all samples from olive pomace represent antioxidant properties at different levels; so as to extract lignin has a better reducing ability with respect to the extract of total phenols.

**Key words:** pomace / olives / valorization      phenolic compounds / lignins  
antioxidant activity / DPPH / reducing power FRAP / B-carotene bleaching.

## Liste des abréviations

**AAR** : Activité Antioxydante Relative;

**Abs** : Absorbance;

**ARP** : Pouvoir Anti Radicalaire;

**BHA** : Butyl- hydroxyanisol;

**BHT** : Butyl- hydroxytoluène;

**CE<sub>50</sub>** : Concentration Effective nécessaire pour donner une absorbance égale 0,5;

**CP** : Composés Phénoliques;

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince;

**°C** : Degré Celsius;

**CIMV** : Compagnie Industrielle de la Matière Végétale;

**DPPH** : 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl;

**EXT** : Extrait;

**ERF** : Efficacité de Réduction de Fer;

**FC** : Folin-Ciocalteu;

**FTIR** : Infrarouge à Transformer de Fourier;

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxydant Power;

**g** : Gramme;

**I** : Inhibition;

**IC<sub>50</sub>** : Concentration d'Inhibition requise pour diminuer la concentration initiale de 50% ;

**IR** : Infra-Rouge;

**mg** : Milligramme;

**mg EQAG/ mg ext** : Milligramme d'équivalent acide gallique par milligramme d'extrait;

**ml** : Millilitre;

**min** : Minutes;

**nm** : Nanomètre;

**PH** : Potentiel Hydrogène;

**Rf** : Rapport frontal;

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire;

**UV**: Ultra-Violet;

**Vis** : Visible;

**Vit C** : Vitamine C;

**%** : Pourcentage.

## Liste des figures

<b>Figure N°01 : Olea Europaea.....</b>	<b>02</b>
<b>Figure N°02 : Composition de l'olive.....</b>	<b>03</b>
<b>Figure N°03 : Les grignons d'olives.....</b>	<b>06</b>
<b>Figure N°04 : Les différentes filières de valorisation des grignons d'olives.....</b>	<b>10</b>
<b>Figure N°05 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate.....</b>	<b>13</b>
<b>Figure N°06 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'extraction et de l'analyse des composés phénolique solubles d'un matériel végétal.....</b>	<b>16</b>
<b>Figure N°07 : Composition typique de la biomasse lignocellulosique .....</b>	<b>18</b>
<b>Figure N°08 : Les principaux liaisons covalents entre la lignine et les polysaccharides.....</b>	<b>19</b>
<b>Figure N°09 : Unités précurseurs de la synthèse de la lignine.....</b>	<b>19</b>
<b>Figure N°10 : Structure de base de la lignine.....</b>	<b>20</b>
<b>Figure N°11 : Représentation schématique des étapes expérimentales de notre étude .....</b>	<b>26</b>
<b>FigureN°12 : Grignon d'olives brut après séchage.....</b>	<b>27</b>
<b>Figure N°13 : Schéma représentatif du procédé d'extraction des phénols.....</b>	<b>29</b>
<b>Figure N°14 : Protocole d'extraction des lignines par le procédé organosolv CIMV.....</b>	<b>33</b>
<b>Figure N°15 : Réduction du radical DPPH.....</b>	<b>37</b>
<b>Figure N°16 : Extrait hydroalcoolique de grignon d'olives.....</b>	<b>41</b>
<b>Figure N°17 : Profil chromatographique de l'extrait hydroalcoolique des composés phénoliques issus des grignons d'olives.....</b>	<b>42</b>
<b>Figure N°18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des composés phénoliques.....</b>	<b>44</b>

<b>Figure N°19</b> : Les lignines extraites à partir de grignon d'olives.....	45
<b>Figure N°20</b> : Le spectre UV-Vis des lignines extraites de grignon d'olives par le procédé CIMV.....	48
<b>Figure N°21</b> : Le spectre FTIR des lignines extraites de grignon d'olives par le procédé CIMV.....	49
<b>Figure N°22</b> : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des extraits de grignon d'olives et de l'antioxydant standard Vit C.....	50
<b>Figure N°23</b> : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des extraits de grignon d'olives et de l'antioxydant standard BHT.....	51
<b>Figure N°24</b> : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des extraits de grignon d'olives et de l'antioxydant standard BHA .....	51
<b>Figure N°25</b> : Représentation graphique des extraits et des antioxydants standards selon leurs ARP « test DPPH ».....	53
<b>Figure N°26</b> : Pouvoir réducteur des extraits de grignon d'olives et de l'antioxydant standard l'acide gallique en fonction de différentes concentrations.....	54
<b>Figure N° 27</b> : Pouvoir réducteur des extraits de grignon d'olives et de l'antioxydant standard BHT en fonction de différentes concentrations.....	54
<b>Figure N°28</b> : Représentation graphique de l'efficacité de réduction de fer « ERF » pour chaque extrait et étalon standard.....	55
<b>Figure N°29</b> : Cinétique de blanchissement du $\beta$ - carotène à 470 nm des extraits de grignon d'olives et du témoin positif BHT.....	56
<b>Figure N°30</b> : Représentation graphique des activités anti-oxydantes relatives des extraits et du BHT.....	57
<b>Figure N°31</b> : Photographies représentatives de différentes étapes d'extraction des phénols.....	68
<b>Figure N°32</b> : Photographies représentatives des lignines extraites par le procédé CIMV avant et après séchage.....	70

<b>Figure N°33</b> : Photographie représentative du changement de couleur de violette à jaune pâle de la gamme étudiée au test de DPPH.....	73
<b>Figure N°34</b> : Photographies représentatives du changement de couleur de l'extrait des phénols totaux au test du pouvoir réducteur.....	76
<b>Figure N°35</b> : Photographies représentatives du changement de couleur de l'extrait des lignines au test du pouvoir réducteur.....	76
<b>Figure N°36</b> : Photographie représentative du changement de couleur de l'acide gallique au test du pouvoir réducteur.....	76

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°01</b> : La composition chimique des différents types de grignon d'olive.....	06
<b>Tableau N°02</b> : La composition de grignon d'olive dans la littérature.....	07
<b>Tableau N°03</b> : Les principales classes de composés phénoliques .....	14
<b>Tableau N°04</b> : Les principaux procédés organosolv et leurs système solvants.....	22
<b>Tableau N°05</b> : Principale applications de la lignine.....	24
<b>Tableau N°06</b> : Les propriétés organoleptiques de l'extrait de grignon d'olives.....	41
<b>Tableau N°07</b> : Les rapports frontaux Rf des différents spots d'extrait et du témoin.....	43
<b>Tableau N°08</b> : Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.....	44
<b>Tableau N°09</b> : Paramètres physico-chimiques de la lignine extraite.....	47
<b>Tableau N°10</b> : Principales bandes d'absorption de la lignine extraite de grignon d'olives...	49
<b>Tableau N°11</b> : La variation les valeurs d'IC50 et ARP pour chaque extrait et pour les antioxydants standards.....	52
<b>Tableau N°12</b> : Les valeurs de concentrations effectives à 50% et leurs efficacités de réduction de fer pour chaque extrait et étalon.....	55
<b>Tableau N°13</b> : La variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des composés phénoliques.....	72
<b>Tableau N°14</b> : La variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des lignines.....	72
<b>Tableau N°15</b> : La variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des antioxydants standards.....	73
<b>Tableau N°16</b> : Les résultats de test du pouvoir réducteur des lignines extraites.....	74
<b>Tableau N°17</b> : Les résultats de test du pouvoir réducteur d'extrait des phénols totaux.....	75

**Tableau N°18 :** Les résultats de test du pouvoir réducteur des antioxydants standards « Acide gallique et BHT ».....75

**Tableau N°19 :** Les résultats de test de blanchissement de  $\beta$ -carotène des extraits étudiés et l'étalon standard BHT.....77

## SOMMAIRE

Remerciements.....	I
Dédicace.....	II
ملخص.....	III
Résumé.....	IV
Abstract.....	V
Liste des abréviations.....	VI
Liste des figures.....	VIII
Liste des tableaux.....	XI
Introduction.....	1

### Synthèse Bibliographique

<b>1. Généralités sur les grignons d'olives .....</b>	<b>2</b>
1.1 L'olivier.....	2
1.2 Oléiculture en Algérie .....	4
1.3 Sous-produits oléicole .....	4
1.4 Grignon d'olives.....	5
1.4.1 Définition .....	5
1.4.2 Types de grignon.....	5
1.5 Composition chimique.....	6
1.6 Pouvoir polluant .....	7
1.7 Différentes filières de valorisation .....	7
1.7.1 Extraction de l'huile de grignon.....	7
1.7.2 Utilisation comme engrais.....	8
1.7.3 Utilisation comme alimentation du bétail .....	8
1.7.4 Milieu de culture pour les levures.....	8
1.7.5 Utilisation comme combustible pour le chauffage.....	9
1.7.6 Bio sorption des métaux lourds et des phénols .....	9
1.7.7 Charbon actif.....	9

1.7.8	Ingrédient des matériaux de construction.....	10
1.7.9	Production de bio pesticide .....	10
1.7.10	Production de lipases.....	11
1.7.11	Extraction des composés phénoliques.....	11
<b>2.</b>	<b>Les composés phénoliques.....</b>	<b>12</b>
2.1	Généralités.....	12
2.2	Biosynthèse.....	13
2.3	Classes des composés phénoliques.....	14
2.4	Extraction, caractérisation et dosage des composés phénoliques.....	15
2.5	Le rôle antioxydant des composés phénoliques .....	16
2.5.1	Radicaux libres .....	17
2.5.2	Rôle anti-radicalaire.....	17
<b>3.</b>	<b>Les lignines .....</b>	<b>18</b>
3.1	Généralités.....	18
3.1.1	Le rôle de la lignine dans la matière végétale .....	18
3.1.2	La biosynthèse.....	19
3.1.3	La composition chimique.....	20
3.2	Principaux procédés d'extraction de la lignine .....	20
3.2.1	Procédé Kraft au sulfure, alcalin.....	20
3.2.2	Procédé au sulfite, acide.....	21
3.2.3	Procédé organosolv « extraction par solvolysé » .....	21
3.3	Valorisation de la lignine.....	22
3.3.1	Applications établies .....	23
3.3.2	Applications à moyen terme.....	23
3.3.3	Applications à long terme / à haute valeur ajoutée .....	23

## Partie Expérimentale

	Introduction .....	25
<b>1.</b>	<b>Matériel.....</b>	<b>27</b>
1.1	Matière.....	27
1.2	Produits et réactifs chimiques.....	27
<b>2.</b>	<b>Méthodes.....</b>	<b>28</b>

2.1	Extraction des phénols.....	28
2.2	Caractérisation qualitative et quantitative des phénols extraits.....	30
2.2.1	Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM).....	30
2.2.2	Caractérisation quantitative par la méthode de Follin Ciocalteu, dosage des phénols totaux par Colorimétrie .....	31
2.3	Extraction des lignines .....	32
2.4	Caractérisation des lignines extraites .....	33
2.4.1	Caractérisation physico-chimiques .....	33
2.4.2.1	Détermination de la densité.....	34
2.4.2.2	Détermination de l'indice de réfraction .....	34
2.4.2.3	Détermination de pouvoir rotatoire.....	35
2.4.2.4	Solubilité .....	35
2.4.2	Caractérisation structurale.....	35
2.4.2.1	Caractérisation par infrarouge à transformée de Fourier « FTIR » .....	36
2.4.2.2	Caractérisation par spectroscopie UV-Visible.....	36
2.5	Etude de l'activité antioxydante .....	36
2.5.1	Test de piégeage du radical libre DPPH.....	37
2.5.2	Test du pouvoir réducteur (Méthode de FRAP).....	38
2.5.3	Test de blanchissement de $\beta$ -carotène.....	39
<b>3.</b>	<b>Résultats et discussions .....</b>	<b>41</b>
3.1	Rendement d'extraction des phénols.....	41
3.2	Caractérisation qualitative et quantitatives des phénols extraits.....	42
3.2.1	Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM).....	42
3.2.2	Caractérisation quantitative par le dosage calorimétrique de Follin-Ciocalteu ....	43
3.3	Rendement d'extraction en lignines .....	45
3.4	Caractérisation des lignines extraites .....	46
3.4.1	Caractérisation physico-chimiques des lignines .....	46
3.4.2	Analyse structurale des lignines extraites .....	47
2.4.2.1	Analyse structurale par spectroscopie Ultraviolet-Visible.....	47
3.4.2.2	Analyse structurale par FTIR .....	48
	Le spectre FTIR de la lignine extraite est représenté dans la figure suivante :.....	48
3.5	Etude de l'activité antioxydante .....	49

3.5.1	Test de piégeage du radical libre DPPH.....	50
3.5.2	Test de potentiel réducteur « méthode de FRAP ».....	53
3.5.3	Test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	56
	<b>Conclusion.....</b>	<b>58</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>60</b>
	<b>Annexe.....</b>	<b>68</b>

L'olivier, arbre sacré des civilisations antiques, a de tout temps joué un rôle très important dans la vie des populations méditerranéennes et mondiale [1]. L'Algérie est l'un des pays méditerranéen dont la culture oléicole compte parmi l'une des plus importantes activités agricoles. En effet, le climat du bassin méditerranéen favorise le développement et la croissance de ce type d'arbres. Un nouveau plan de développement de l'agriculture (PNDA) a été adopté par le Ministère de l'Agriculture dont l'objectif principal était d'encourager la culture de l'olivier [2].

Actuellement, avec la promotion des vertus bénéfiques de l'huile d'olive pour la santé humaine, sa demande ne cesse d'augmenter et par conséquent croît constamment. L'industrie oléicole qui produit principalement l'huile d'olive, engendre des quantités énormes de déchets solides, connus sous l'appellation de grignons d'olives [3]. Ce résidu solide renferme une forte quantité d'acide gras et d'eau, en effet ce déchet oléicole humide abandonné à l'air libre rancisse rapidement et devient contaminé par des champignons et par la suite ce dernier rejette des substances phyto-toxiques dans l'environnement (Air, sols, eaux). Son rejet dans la nature constitue une importante source de pollution, ainsi une menace sur la santé humaine. Pour cela, la valorisation de ce résidu est devenue une double nécessité voire écologique et économique. En effet, elle permettrait de réduire une pollution de plus en plus conséquente et de contribuer à l'amélioration de la rentabilité du secteur visant surtout les pays du sud de la Méditerranée à l'instar de l'Algérie [4].

Cette problématique nous amène à faire des recherches plus approfondies, d'où il ressort une nouvelle valorisation de ce résidu à partir de ces constituants et leurs propriétés biologiques qu'il renferme. Dans ce contexte, ce travail vise à transformer ce résidu en valeur ajoutée.

Le présent travail comporte deux parties principales :

- La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle le premier chapitre présentera des généralités sur les grignons d'olives. Par la suite, le second chapitre exposera et décrira la classe et le rôle des différents composés phénoliques et le troisième chapitre sera consacré à la présentation des lignines.
- La seconde partie est une étude expérimentale consacrée à :
  - L'extraction des composés phénoliques ;
  - La caractérisation qualitative et quantitative de l'extrait phénolique ;
  - L'extraction et la caractérisation structurale des lignines ;
  - L'évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits.

A partir de l'interprétation des résultats expérimentaux, nous terminerons par une conclusion générale, qui nous permettra d'avoir des perspectives liées à ce travail.

# **Synthèse**

# **Bibliographique**

### 1. Généralités sur les grignons d'olives

#### 1.1 L'olivier

L'olivier appartient à la famille largement distribuée des Oleaceae qui comprend 25 genres et plus de 500 espèces. C'est une famille caractérisée par ses fleurs régulières, souvent de parfum agréable. Le genre le plus cultivé dans le bassin méditerranéen est l'Olea, il regroupe 30 à 40 espèces différentes. *Olea Europaea* est l'unique espèce méditerranéenne représentative du genre *Olea*. Certaines classifications distinguent deux sous-espèces : l'olivier cultivé « *Olea Europaea saliva* » et l'olivier sauvage, encore appelé Oléastre.

- **Classification Systématique**

- Règne : végétal ;
- Embranchement : spermatophytes ;
- Sous embranchement : angiospermes ;
- Classe : dicotylédones ligustrales ;
- Ordre : phylum de terebinthales ;
- Famille : oléacées ;
- Genre : olea ;
- Espèce : olea europaea [2].

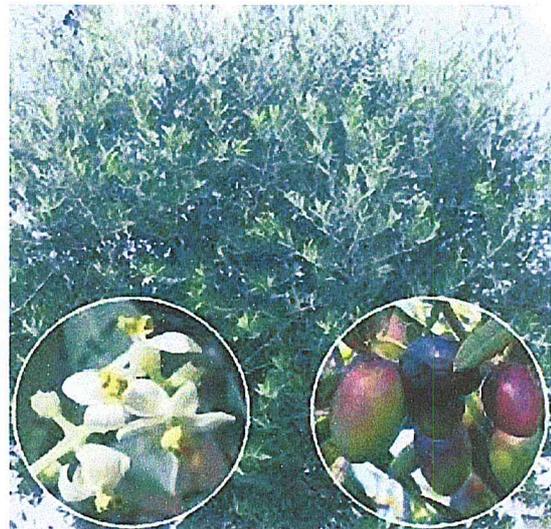


Figure N°01 : *Olea Europaea*.

L'olivier cultivé est un arbre ayant des feuilles vertes tout au long de l'année. Ses dimensions et sa forme varient avec les conditions climatiques ; l'olivier est un arbre auquel le climat méditerranéen lui convient parfaitement : hiver doux, automne au printemps pluvieux, été chaud et sec, une grande luminosité ; la fertilité du sol et la variété [5].

L'olivier bénéficie d'une longue durée de vie ; il peut même être considéré comme immortel car si le tronc disparaît, des rejets reconstituent spontanément l'arbre. Il se multiplie très facilement par voie végétative ou à partir de bouture [6].

Afin de comprendre plus facilement les variations de composition physico-chimique des sous-produits de l'olivier et la qualité d'huile d'olive, il est utile de rappeler la composition physico-chimique d'olive.

L'olive est le fruit de l'olivier. C'est une drupe à mésocarpe (la partie la plus riche en huile) sa forme est ovoïde. Ses dimensions sont très variables suivant la variété. Sa couleur change au cours de son cycle de maturation passant de la couleur verte à la couleur violette ou rouge puis noire à maturité et en même temps il se charge en l'huile. Elle est constituée d'un épicarpe (la peau de l'olive) fin et lisse qui recouvre le mésocarpe (la pulpe de fruit) et d'un endocarpe constitué par un noyau fusiforme très dur protégeant une seule graine à albumen huileux. L'olive est généralement composée de lipides, glucides, protides, cendres et eau [7].

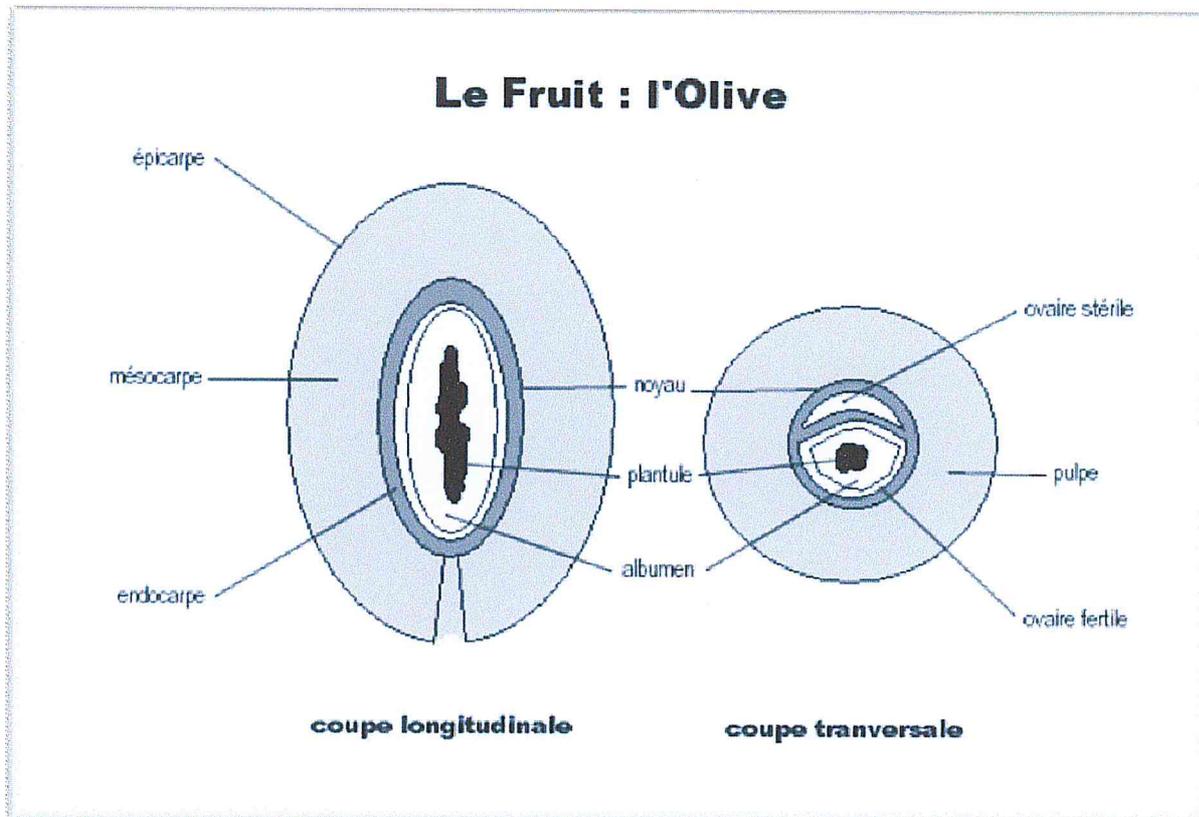


Figure N°02 : Composition de l'olive.

Les olives peuvent avoir deux grandes utilisations : la première est l'utilisation tant que fruit entier ou encore appelé « olives de table », la seconde est pour la production d'huile. La production d'huile d'olive a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. La production mondiale d'olives de table est d'environ un million de tonnes soit 10% de la récolte totale d'olives. La grande majorité d'olives est donc utilisée pour la fabrication de l'huile d'olive [8].



### 1.2 Oléiculture en Algérie

La production d'olives destinée à l'obtention d'huile d'olive est principalement concentrée dans les pays du bassin méditerranéen. Cette production millénaire joue un rôle important dans l'économie de ce bassin ainsi sa culture et son régime alimentaire [9].

L'Algérie fait partie des pays du pourtour méditerranéen dont le climat est le plus favorable à la culture de l'olivier. L'oléiculture algérienne est très encouragée par l'état, depuis la mise en place du Plan National de Développement Agricole (PNDA) en 2000 [10]. Le nombre d'oliviers y est estimé à environ 20 millions et occupent une superficie de l'ordre de 239350 hectares répartie en trois régions : le centre, l'est et l'ouest avec respectivement 54,3%, 28,3% et 17% de la surface totale [11]. Elle est placée après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont, par un ordre important, les plus grands producteurs du monde d'huile d'olive.

La production moyenne annuelle se situe entre 10000 et 15000 tonnes d'huile d'olive, avec cette production l'Algérie occupe la dixième place parmi les producteurs mondiaux. Toutefois 90% des huileries sont traditionnelles [12].

### 1.3 Sous-produits oléicole

Il est important de définir les différents sous-produits car il existe une certaine confusion dans les publications qui ne permet pas toujours d'identifier clairement de quel sous-produit s'agit-il. Donc on distinguera :

- a) Les sous-produits d'huilerie :
  - Grignon ;
  - Margine : c'est le résidu liquide aqueux brun qui s'est séparé de l'huile par centrifugation ou sédimentation après le pressage ;
  - Les feuilles collectées à l'huilerie : ne sont pas les résidus de la taille, mais des feuilles obtenus après le lavage et le nettoyage des olives à l'entrée de l'huilerie.
- b) Les résidus de la taille et de la récolte : les oliviers subissent en général une taille sévère un an sur deux et une taille légère l'autre année. Après séparation des grosses

branches les feuilles et ramilles (diamètre inférieur à 3cm) peuvent être distribuées aux ruminants [13].

L'industrie oléicole génère de grande quantité de sous-produits, 100 Kg d'olives produisent en moyenne 35 Kg de grignon et 100 L de margine. La taille de l'olivier laisse en moyenne 25 Kg de feuilles et brindille annuellement [14].

### 1.4 Grignon d'olives

#### 1.4.1 Définition

Le grignon d'olives est un sous-produit résultant de l'extraction de l'huile d'olive. Il est constitué des peaux, des résidus de la pulpe et des fragments des noyaux. Les grignons sont des produits plus ou moins pâteux [15].



Figure N°03 : les grignons d'olives.

#### 1.4.2 Types de grignon

Selon le procédé d'extraction et l'équipement des huileries, il est possible de distinguer quatre types de grignon :

- Grignon brut : c'est le résidu de la 1<sup>ère</sup> extraction de l'huile d'olive ;
- Grignon épuisé : issus après traitement des grignons bruts par solvants, l'hexane généralement (produit après seconde extraction) ;
- Grignon partiellement dénoyauté : résulte de la séparation partielle du noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation.

-Il est dit gras si son huile n'est pas extraite par solvant ;

-Il est dit dégraissé ou épuisé si son huile est extraite par un solvant.

- Grignon épuisé et partiellement dénoyauté : sont constitués essentiellement par la pulpe et encore une petite proportion de coques qui ne peuvent pas être séparés complètement par les procédés de tamisage ou de ventilation [16].

Il existe un autre type de grignon qui se trouve sous forme d'une pâte obtenue lorsque le noyau est séparé de la pulpe préalablement à l'extraction de l'huile. Elle est riche en eau 60% et de conservation très difficile qui s'appelle : la pulpe d'olive [2].

### 1.5 Composition chimique

La composition chimique des grignons d'olives varie dans de très larges limites selon le stade de maturité des olives, le procédé d'extraction de l'huile et l'épuisement par les solvants, le tableau suivant résume la composition chimique des grignons issus lors de la production de l'huile d'olives avec divers procédés :

**Tableau N°01 : La composition chimique des différents types de grignon d'olives.**

Type	Matière sèche (%)	Matière minérale (%)	Matière azotée totale (%)	Cellulose brute (%)	Matière grasse (%)
Grignon brut	75-80	3-5	5-10	35-50	8-15
Grignon épuisé	85-90	7-10	8-10	35-40	4-6
Grignon épuisé partiellement dénoyauté	85-90	6-8	9-14	15-30	4-6
Grignon gras partiellement dénoyauté	80-95	6-7	9-12	20-30	15-30
Pulpe grasse	35-40	5-8	9-13	16-25	26-33

Les grignons d'olives bruts sont pauvres en matières azotées et riches en cellulose brute. Il reste relativement riche en matière grasse (huile d'olive). L'épuisement par le solvant diminue la teneur en matière grasse et augmente les autres teneurs.

Le dénoyautage partiel réduit les teneurs en cellulose brute par l'élimination partielle des noyaux d'olive.

Les pulpes, du fait de la séparation totale du noyau avant pression, ont la valeur la plus faible en cellulose brute [8].

Le grignon d'olives est composé par une fraction riche en lignine provenant des fragments de noyaux et l'autre renfermant principalement des glucides, comme la cellulose et hémicellulose et dans une moindre mesure, des protéines et de l'huile résiduelle qui dépend de la technique d'extraction. Le tableau ci-dessous montre que la lignine représente entre le tiers et la moitié de la masse des grignons d'olives.

**Tableau N°02 :** La composition de grignon d'olives en hémicellulose, cellulose et lignine dans la littérature [9].

Hémicellulose (%)	Cellulose (%)	Lignine (%)	Auteurs
23.6	24	48.4	Demirbas, 2004
	44	45	Jauhiainen et al, 2005
21.5	24.3	38	Garcia-Ibanez et al, 2006

### 1.6 Pouvoir polluant

La majorité des grignons sont rejetés dans la nature et constituent une source de pollution soit parce qu'ils sont contaminés par des champignons, soit parce qu'ils rejettent des substances toxiques dans l'environnement. Les toxines fongiques ou qui résistent à la dégradation bactérienne peuvent alors se lixivier, menaçant ainsi la santé humaine et l'environnement. Certaines sources d'eau ont été polluées par ces déchets [17].

La disponibilité de ces résidus dépasse un million de tonne par année donc des quantités appréciables de ce sous-produit constitue une grande menace pour l'environnement et la valorisation de ces résidus est devenue une nécessité pour éviter une pollution de plus en plus sérieuse, contribuer à l'alimentation de la rentabilité du secteur et à combler les déficits fourragers surtout des pays du sud de la méditerranéen [18].

### 1.7 Différentes filières de valorisation

Le champ d'applications des grignons est multiple et varié, beaucoup de débouchés sont constatés notamment dans les pays développés. On peut citer :

#### 1.7.1 Extraction de l'huile de grignon

Les grignons bruts ont une teneur en huile résiduelle de l'ordre de 4-8%, ce qui justifie leur extraction par solvant afin de récupérer cette l'huile.

L'huile de grignon d'olives est utilisée pour la consommation humaine après le raffinage et même en industrie notamment pour la fabrication du savon [19].

Les grignons épuisés constituent une matière première pour la production du furfural. En effet, le débris de coques est assez riche en pentosanes (hydrate de carbone complexe) qui, par hydrolyse, donnent des pentoses et après dessiccation du furfural. La même réaction produit du méthanol et de l'acide acétique [20].

### **1.7.2 Utilisation comme engrais**

Les grignons d'olives sont utilisés en agriculture pour améliorer la fertilisation des terres et les rendre plus reproductives.

Dans la composition chimique des grignons se trouve les cendres qui peuvent être utilisés comme fertilisant en raison de leurs teneurs élevées en oxyde de potassium et en phosphore mais après avoir subi une prédécomposition ou un compostage pour faciliter sa dégradation et éliminer ces effets phytotoxiques [21].

### **1.7.3 Utilisation comme alimentation du bétail**

Des essais ont été conduits pour l'utilisation de ces produits dans l'alimentation animale, le grignon ne contenant pas des substances toxiques ou inhibitrices peut servir à l'alimentation du bétail (ovins et bovins) [22].

### **1.7.4 Milieu de culture pour les levures**

Des grignons des super presses sont particulièrement riches en eau et se fermentent très rapidement. Différentes levures ont été cultivées sur milieu à base de grignons d'olives enrichis en éléments minéraux et notamment en sulfate d'ammonium et en oligo-éléments.

La fermentation des grignons d'olives en milieu solide par des champignons thermophiles et filamenteux produit une panoplie de composés d'arômes utilisés dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et même pharmaceutique.

Pour la fermentation anaérobique du lisier de vaches avec des grignons engendre du méthane à 57-65% du biogaz produit [23].

### 1.7.5 Utilisation comme combustible pour le chauffage

Avec un pouvoir calorifique de 3500 kcal/kg les grignons sont utilisés comme combustible. Cette quantité de chaleur est portée principalement par la coque qui représente 60% du total et qui a un pouvoir calorifique relativement élevé 4000 kcal/kg [17].

Le méthane obtenu par la fermentation anaérobie est utilisé comme une source d'énergie pour le chauffage de l'eau et la production de l'électricité à usage domestique.

Dans la valorisation thermique des grignons d'olives se trouve plusieurs procédés qui convertissent ce sous-produit oléicole en énergie utilisable sous différentes formes. Les trois conversions thermo-chimiques des grignons d'olives couramment développées correspondent à la combustion, la pyrolyse et à la gazéification [24].

### 1.7.6 Bio sorption des métaux lourds et des phénols

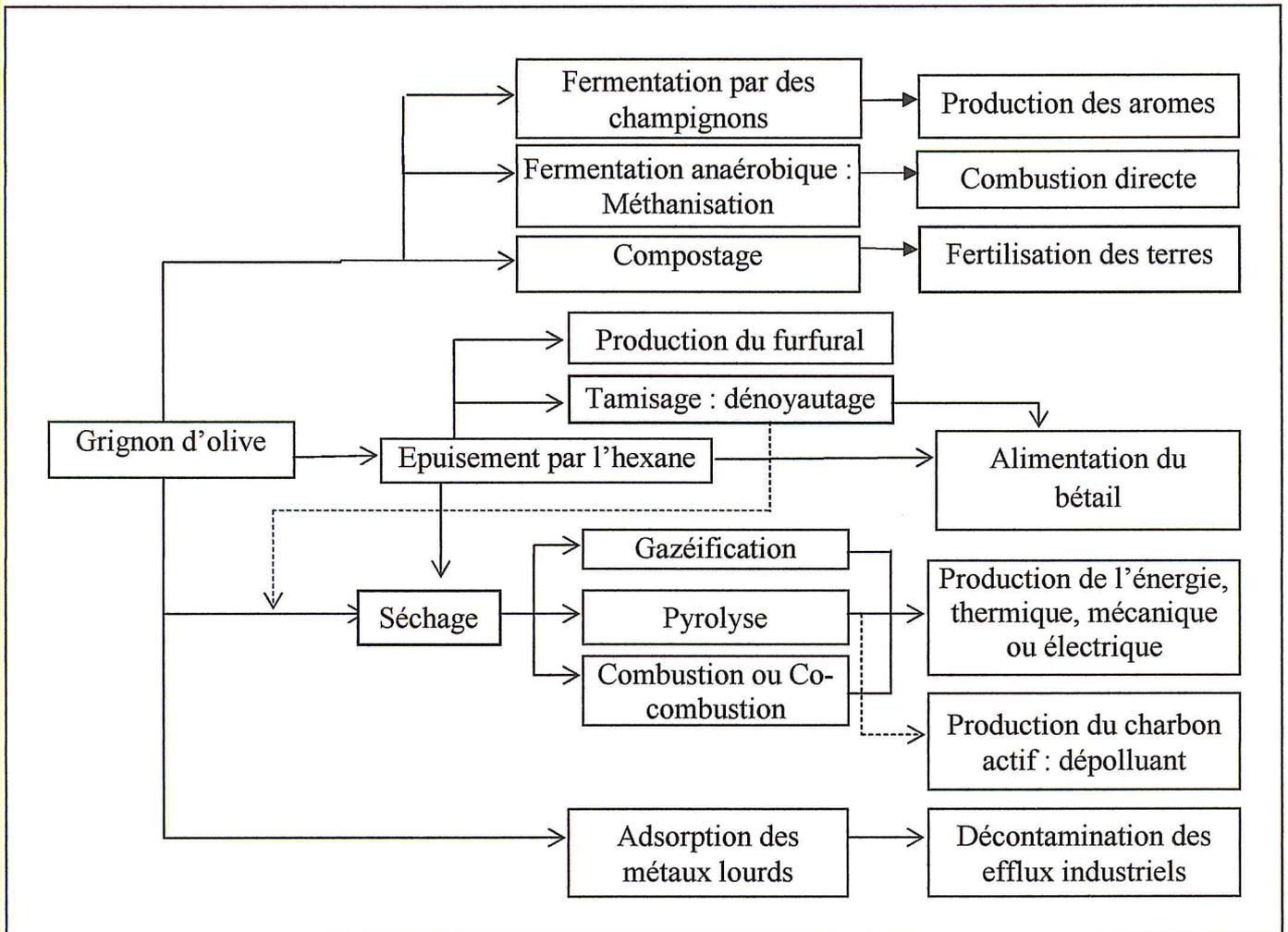
La bio sorption des métaux lourds et des phénols par les grignons d'olives est une technologie alternative dans le traitement des eaux usées et de la margine. Cette technique remplace les méthodes conventionnelles qui sont très chères et peu efficace. Les grignons d'olives possèdent une capacité élevée de rétention de plusieurs métaux à savoir, le cadmium, le plomb, le zinc, etc. [25].

### 1.7.7 Charbon actif

Le grignon d'olives a toutes les caractéristiques propices pour qu'il bénéficie d'une très importante absorption vis-à-vis de matière organique. Ce dernier subi des traitements chimiques et même thermiques.

La préparation de charbon actif à partir de grignon d'olives a fait l'objet de plusieurs recherches. L'utilisation de ce carbone a été étudiée pour l'adsorption du phénol ainsi que pour l'adsorption des métaux lourds [15]. Il est encore utilisé comme adsorbant pour la coloration de rejet de l'industrie textile [26].

La figure suivante résume les différentes filières de valorisation des grignons d'olives :



**Figure N°04 :** Les différentes filières de valorisation des grignons d'olives.

D'autres domaines d'utilisation ont été constatés comme :

### 1.7.8 Ingrédient des matériaux de construction

L'usage du grignon d'olives dans la fabrication de la brique constitue une percée intéressante à plusieurs points de vue ; il diminue la masse volumique des briques ce qu'il rend plus légères. Il crée aussi des pores, c'est une caractéristique recherchée aujourd'hui dans le but d'économiser l'énergie car la présence des pores dans les matériaux contribue à diminuer la conductivité thermique et augmenter ainsi son pouvoir d'isolation. [27]

### 1.7.9 Production de bio pesticide

Les grignons d'olive mélangés à d'autres déchets agro-industriels (margines, feuilles d'oliviers, autres substrats lignocellulosiques) constituent un excellent substrat solide pour

réaliser des cultures de champignons filamenteux entomopathogènes ou nématophage. Dans la mesure où des conditions optimales de culture sont obtenues pour chaque microorganisme, le produit fermenté obtenu, enrichi en mycélium de ce type de champignon pourrait s'avérer, après retour au champ, être un excellent agent pour une lutte biologique contre certains agresseurs de l'olivier. Les procédés les plus prometteurs sont validés à une échelle préindustrielle.

### 1.7.10 Production de lipases

Des grignons d'olives mélangés avec de la bagasse de canne à sucre ont été utilisés pour la croissance de champignons filamenteux thermophiles pour la production de lipases thermostables ( $>80^{\circ}\text{C}$ ). La technique de Fermentation en Milieu Solide s'avère plus adaptée pour la croissance des champignons thermophiles que la culture liquide, la production de lipases est plus élevée (10 à 20fois) et ces enzymes sont extracellulaires. La présence dans les grignons d'olives d'acide oléique, utilisé comme inducteur, augmente la production de lipases en FMS (8 fois). L'addition à la bagasse de canne à sucre, de grignons d'olives augmente la production de lipases (26 fois). Ces enzymes sont stables pendant la culture. [28]

### 1.7.11 Extraction des composés phénoliques

Ces composés qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leurs pouvoirs antioxydants [29]. Les teneurs en composés phénoliques dépendent de nombreux facteurs tels que la variété, la technique d'extraction de l'huile, le solvant et la méthode d'extraction et de dosage utilisés. Le pourcentage des composés phénoliques contenant dans le grignon varie entre 1 à 2.5%, ce dernier est riche en lignine. Donc le grignon contient deux types de composés phénoliques : d'une part des composés phénoliques simples et d'autre part des composés complexes de type tannins condensés [30].

## 2. Les composés phénoliques

### 2.1 Généralités

Les polyphénols ou composés phénoliques constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires leur élément structural de base est un noyau benzénique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique. A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques. Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 [31].

La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques [32].

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs [33].

L'intérêt des composés phénoliques est lié aux propriétés suivantes : propriété antioxydante, capacité de chélater les métaux, pouvoir anti inflammatoire, effet antimicrobien, réducteur de divers radicaux libre et l'intervention sur l'activité de nombreuses enzymes.

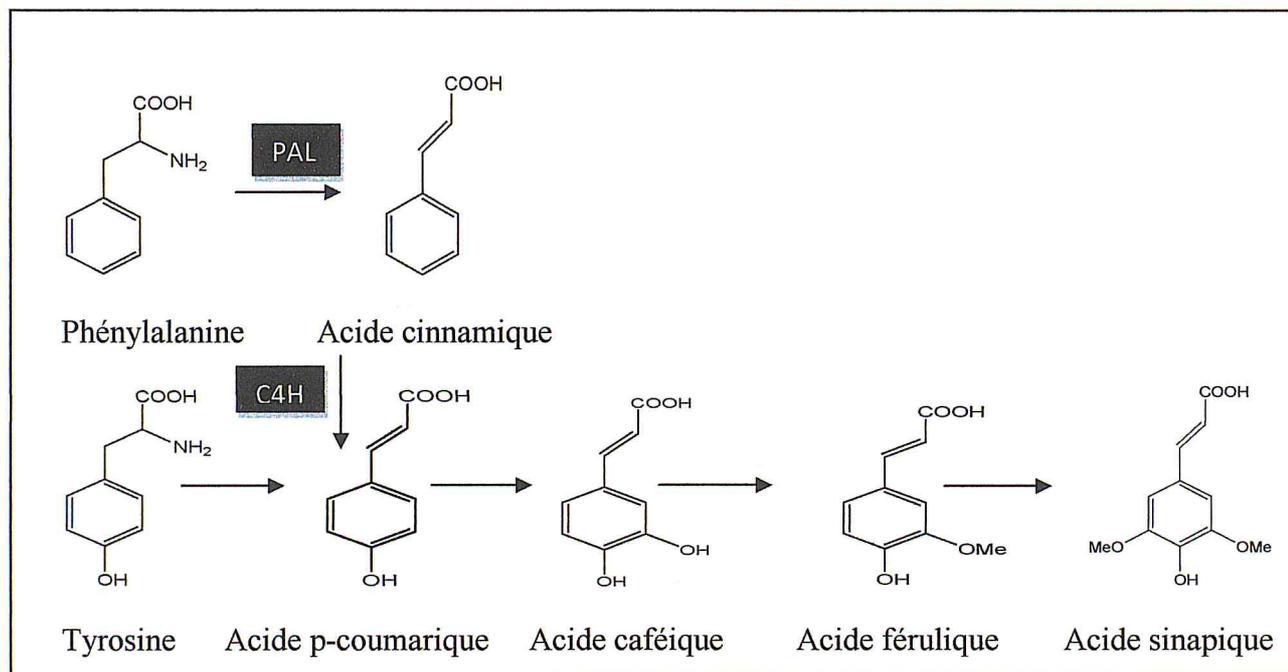
Ainsi des travaux plus anciens, ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ses propriétés antifongiques. Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs. [34].

## 2.2 Biosynthèse

Les composés phénoliques sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- Celle de l'acide shikimique : l'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique. Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïque, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines [35].
- celle issue de l'acétate, qui conduit à des poly  $\beta$ -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les anthraquinones ou les naphtoquinones.

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes.



PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate4-hydroxylase

Figure N°04 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate.

### 2.3 Classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C<sub>6</sub> à des formes très polymérisée), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques...).

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux et les principales classes de ces composés sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau N°03 : les principales classes de composés phénoliques [36].**

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxy benzoïques	p-Hydroxy benzoïque	Epices, fraise
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acide hydroxy cinnamiques Coumarines	acides caféique, fêrulique scopolétine	Pomme de terre, pomme Citrus
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	juglone	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	resvératrol	Vigne
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes -Flavonol -anthocyanes -flavanols -flavanones Iso flavonoïdes	kaempférol cyanidine catéchine naringénine daïdzéine	Fruits, légumes Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Cirtus Soja, pois
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	pinorésinol	Pin
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyau de fruit
C <sub>15</sub>	Tannins		Raisin rouge, kaki

### 2.4 Extraction, caractérisation et dosage des composés phénoliques

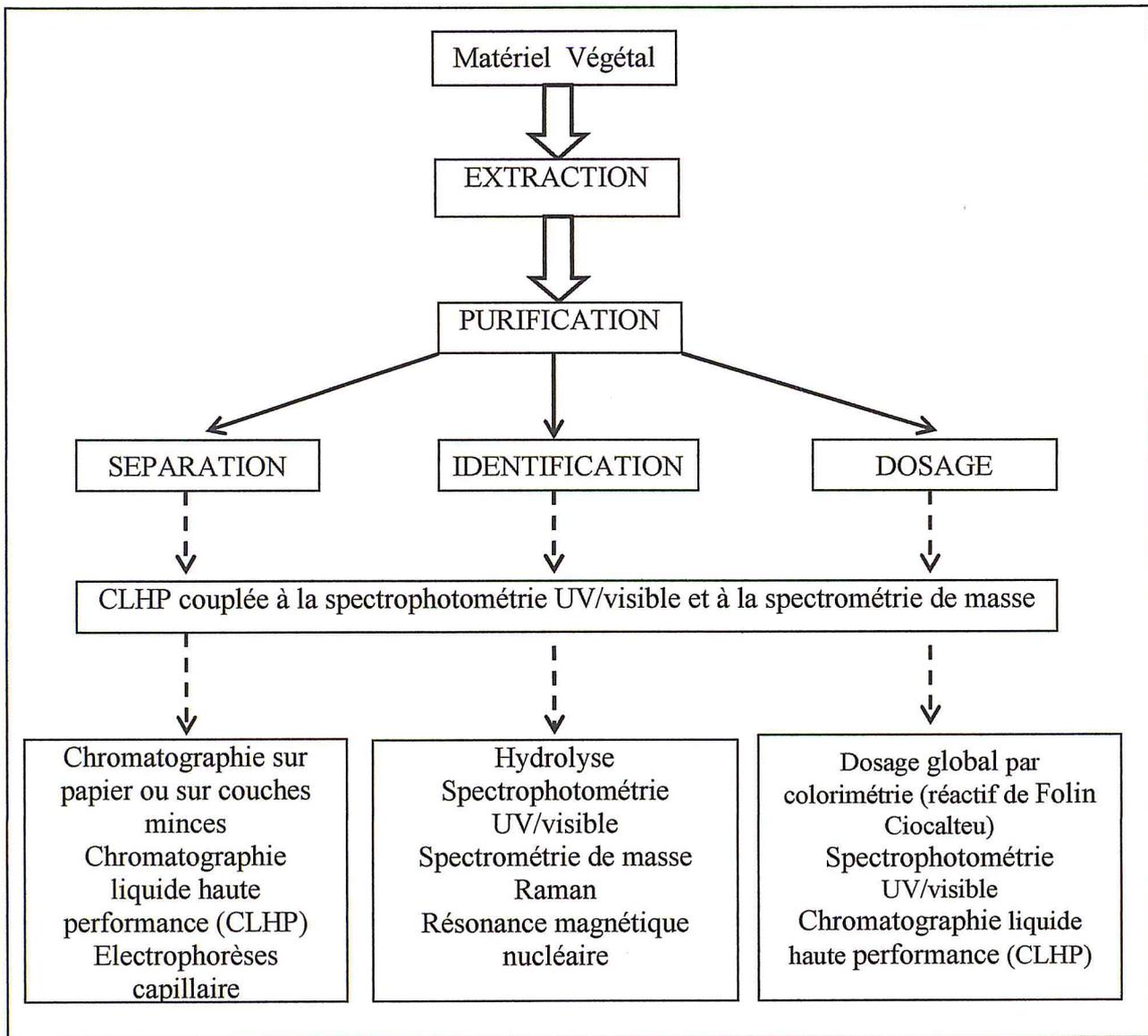
Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des composés phénoliques ont fait des progrès spectaculaires au cours des trente dernières années, grâce en particulier à l'utilisation quasi systématique de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et des détecteurs à barrette de diode permettant l'analyse des spectres d'absorption en ultraviolet et le couplage de la CLHP avec des techniques physico-chimiques modernes (spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire...).

La plupart des phénols simples présents dans la vacuole peuvent aisément être extraits avec des mélanges méthanol/eau (80/20, v/v). Comme ils sont facilement oxydables, il est recommandé de travailler à une température de 0 à 4°C et d'assurer une protection en ajoutant un agent réducteur (acide ascorbique ou méta bisulfite de sodium) au milieu d'extraction [37].

Il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée les composés phénoliques présents dans un extrait végétal non purifié. Néanmoins, une estimation rapide de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes, en particulier par utilisation d'un mélange de phosphomolybdate et de phosphotungstate commercialisé sous la dénomination de réactif de Folin-Ciocalteu.

D'innombrables travaux ont été consacrés à la détermination du spectre d'absorption des composés phénoliques et à son utilisation pour les caractériser et les doser. Dans la mesure où ils sont préalablement séparés par chromatographie. Le spectre d'absorption résulte de la présence combiné du (ou des) cycle(s) benzénique(s), des fonctions hydroxyles (phénoliques) portées par ce(s) cycle(s) et des différentes doubles liaisons présentes dans la molécule.

Le dosage des composés phénoliques utilise très fréquemment leur spectre d'absorption, soit dans le visible, soit dans l'UV pour la plupart des autres composés, en choisissant pour chacun d'eux la longueur d'onde d'absorption maximale. Le spectre d'absorption résulte de la présence combiné du (ou des) cycle(s) benzénique(s), des fonctions hydroxyles (phénoliques) portées par ce(s) cycle(s) et des différentes doubles liaisons présentes dans la molécule. [38]



**Figure N°06 :** Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'extraction et de l'analyse des composés phénoliques solubles d'un matériel végétal.

## 2.5 Le rôle antioxydant des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont considérés comme étant le groupe majeur de métabolites secondaires, sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires et antioxydantes [39].

En plus de leur rôle important dans certaines propriétés sensorielles, plusieurs études ont souligné que beaucoup d'entre eux montrent des activités biologiques liées à leurs propriétés antioxydantes et antiradicalaires car ces composés possèdent une forte propriété antioxydante [40].

### 2.5.1 Radicaux libres

Notre organisme produit en permanence des radicaux libres en réponse à des agressions environnementales (cigarettes, polluants, infections.....). Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement. Leur structure comprend un électron célibataire qu'ils cherchent à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines [41]

Grâce à la mobilité de l'hydrogène phénolique, les composés phénoliques sont capables de piéger les radicaux libres oxygènes en particulier les radicaux peroxydes ( $\text{ROO}^\cdot$ ), alkoxydes ( $\text{RO}^\cdot$ ), superoxydes ( $\text{O}_2^\cdot$ ) et les hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ).

### 2.5.2 Rôle anti-radicalaire

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments. Les antioxydants naturels permettent à l'organisme de lutter contre les agressions de l'oxygène qui sont à l'origine d'un grand nombre de maladies, ce qui suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer et des maladies cardiovasculaires [42].

Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux bon-mauvais (qui peuvent être les deux), comme l'oxyde nitrique qui permet une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier.

En raison de ces vertus, les composés phénoliques sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques et cosmétiques [43].

### 3. Les lignines

#### 3.1 Généralités

La biomasse lignocellulosique, appelée parfois simplement biomasse, est constituée de trois composants majeurs: la cellulose (polysaccharide linéaire de glucose), les hémicelluloses (polysaccharides branchés de sucres à 5 et 6 atomes de carbone) et la lignine (un polymère complexe aromatique). En moyenne, la biomasse lignocellulosique (bois, paille) contient 45% de cellulose, 25% d'hémicelluloses et 25% de lignine (Figure 7) [44].

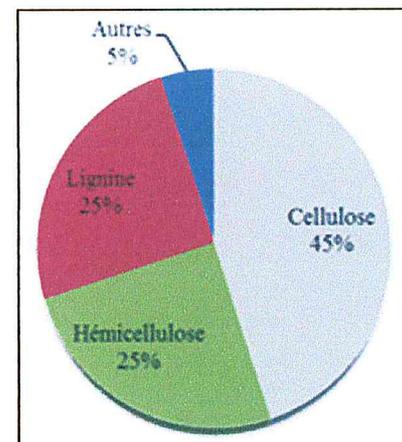


Figure N°07 : Composition typique de la biomasse lignocellulosique.

La lignine et le polymère naturel le plus abondant sur terre après la cellulose ; cette dernière est considéré parmi les constituants les plus complexe et le plus difficile à étudier.

##### 3.1.1 Le rôle de la lignine dans la matière végétale

La lignine est une molécule qui fait partie des différents composants du bois, on retrouve aussi dans certaines algues et dans les plantes qui possèdent des racines. Cet élément apporte à la matière végétale sa rigidité, son imperméabilité et sa force face à la décomposition. La molécule de la lignine permette aux végétaux pour accéder à la lumière. La lignine possède également des propriétés aromatiques en raison du phénol qui la compose.

La matière végétale est constituée essentiellement de polysaccharides et de la lignine qui sont des polymères de masses moléculaires élevées. La composition de la matière végétale varie selon leur nature de 70 à 80% de polysaccharides qui est constituée de cellulose en majorité et l'hémicellulose et de 15 à 30% de lignine.

La lignine est déposée principalement dans les parois secondaires des cellules végétales, les rendant rigides et imperméables. La lignine, qui protège les polysaccharides de la paroi cellulaire de la dégradation enzymatique et microbienne, est par la même occasion un des facteurs limitant les plus importants à la conversion de la biomasse lignocellulosique.

La figure suivante illustre la nature de liaisons entre les principaux constituants de la matière végétale. La lignine joue le rôle de lien entre les molécules de cellulose et d'hémicelluloses. Ces liens sont principalement des liaisons covalentes de type éther et ester.

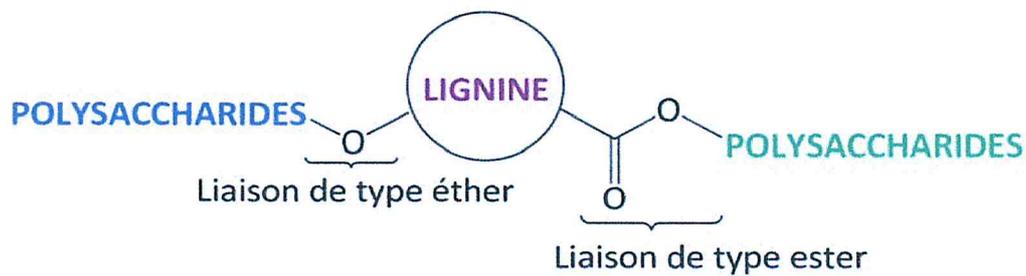


Figure N°08 : les principales liaisons covalents entre la lignine et les polysaccharides [45].

### 3.1.2 La biosynthèse

Sa biosynthèse au sein de la matière végétale est assurée par un couplage de trois monomères alcools phénylpropane différents :

- Les alcools coumarylique ;
- Coniférylique ;
- Sinapylique.

Elles sont biosynthétisées par polymérisation enzymatique oxydative à partir de ces trois précurseurs pour former les unités ou noyaux p-hydroxyphényl (H), guaiacyl (G) et syringyl (S) (figure N°9). Sa structure très complexe a été étudiée pendant de nombreuses années et reste toujours délicate à élucider [46].

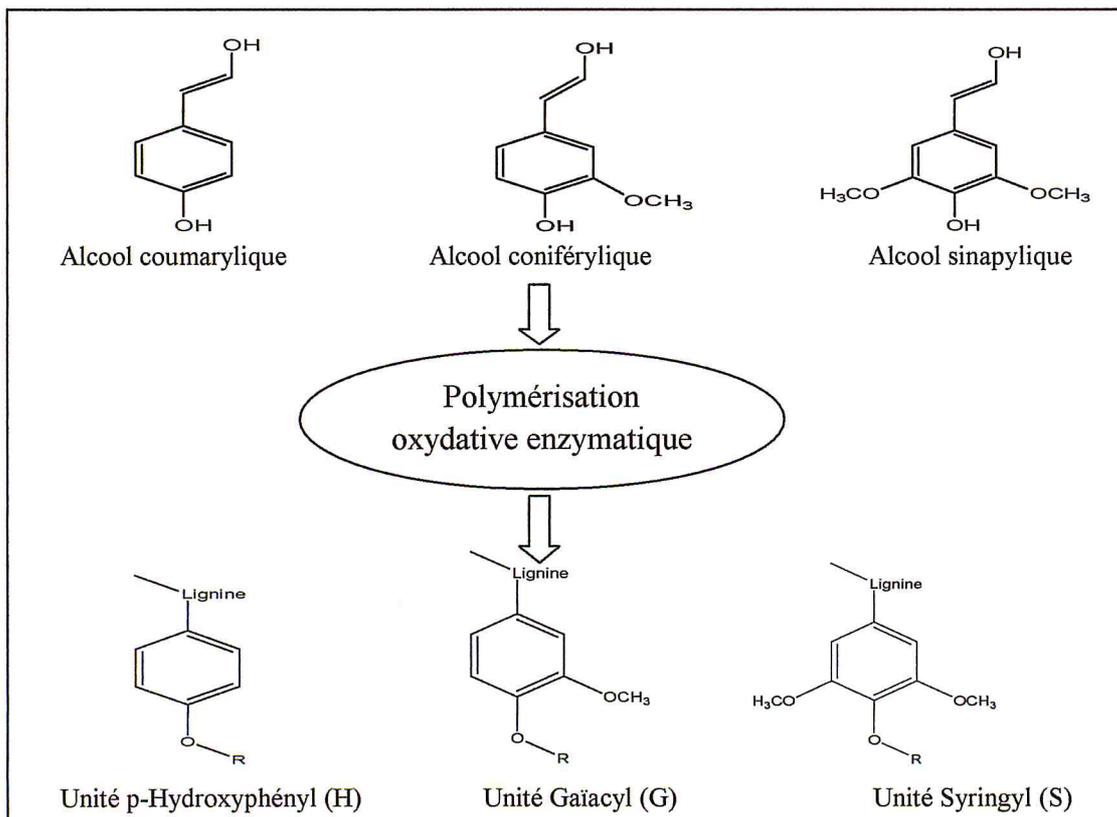


Figure N°09 : Unités précurseurs de la biosynthèse de la lignine.

### 3.1.3 La composition chimique

La structure de base de la lignine se compose d'un groupement phénolique auquel un substituant propanoïde se greffe en position para du noyau aromatique. La lignine existe sous trois principales unités phénylpropanoïdes et ces unités se différencient par la présence d'un groupement méthoxyle en position méta.

Ces trois unités phénylpropanoïdes sont: le guaiacyle (avec un seul méthoxyle), le syringyle (avec deux groupements méthoxyles) et le parahydroxyphényle (n'ayant aucun méthoxyle) (Figure N°10).

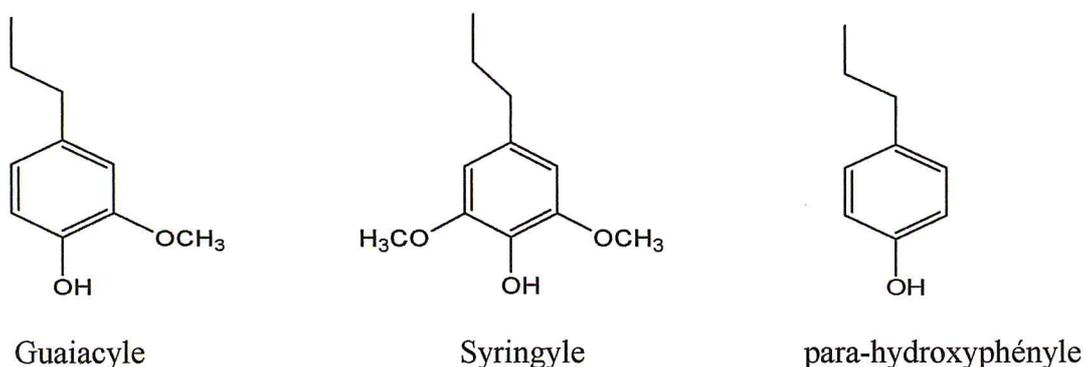


Figure N°10 : Structure de base de la lignine.

L'abondance des trois monomères précurseurs de la biosynthèse de la lignine diffère selon l'origine des plantes. Ils sont liés entre eux par des liaisons carbone-carbone et par des liaisons alkyles aryles éther. Ce sont des substances polyphénoliques les plus abondantes chez les végétaux. Les polymères de lignine ont pour base des unités phénylpropane [47].

## 3.2 Principaux procédés d'extraction de la lignine

Tous les procédés chimiques d'extraction de la lignine à partir d'une biomasse procèdent en deux étapes pour la séparation des polymères lignocellulosiques :

- Libération et solubilisation des hémicelluloses et de la lignine sous forme de «liqueur noire» ;
- Filtration de la cellulose restée insoluble, et concentration du filtrat (liqueur noire).

### 3.2.1 Procédé Kraft au sulfure, alcalin

Le procédé Kraft est le procédé chimique principal de fabrication de la pâte à papier dans le monde. Il utilise une base forte avec le sulfure de sodium comme catalyseur pour

séparer la lignine des fibres de cellulose [48]. Le procédé d'extraction Kraft est basé sur la formation de soude à partir du sulfure de sodium. Le sulfure de sodium,  $\text{Na}_2\text{S}$ , est obtenu par chauffage du sulfate de sodium  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Lors du traitement papetier, le sulfure de sodium est hydrolysé pour former de la soude,  $\text{NaSH}$  et  $\text{H}_2\text{S}$ . Ce mélange agit sur la matière végétale pendant 2 à 5 heures à  $175^\circ\text{C}$  sous une pression de 5 bars environ (l'hydrolyse basique de liaisons éther entre la lignine et le polysaccharide nécessite des conditions opératoires très dures à cause principalement de la haute énergie des liaisons C-O-C haute température et pression élevé).

Les lignines et les hémicelluloses sont libérées dans le milieu réactionnel, et les différents composés soufrés présents réagissent avec la lignine pour donner des thiolignines solubles dans le milieu, il apparaît que le soufre est présent dans la lignine comme soufre inorganique, comme soufre élémentaire, comme polysulfure adsorbé et/ou sulfure organiquement liée. Elles sont obtenues ensuite par précipitation en présence d'acide organique concentré [49].

### 3.2.2 Procédé au sulfite, acide

La technique repose sur la production d'acide sulfureux à partir de l'oxydation du soufre en dioxyde de soufre suivi immédiatement de son hydrolyse. La matière végétale est mise en contact avec ce mélange pendant plusieurs heures entre  $120^\circ\text{C}$  et  $160^\circ\text{C}$  sous pression élevée. Le clivage des liaisons éthers et esters permet la libération de la lignine. Mais celle-ci est aussi dégradée en même temps par réaction avec l'ion bisulfite ( $\text{HSO}_3^-$ ) menant à la formation de lignosulfonate.

Les lignosulfonates formés sont facilement solubles dans divers solvants, mais représentent formellement une lignine fragmentée et chimiquement modifiée [50].

### 3.2.3 Procédé organosolv « extraction par solvolysse »

La solvolysse est une méthode de séparation basée sur la solubilisation de la lignine dans un solvant organique. On appelle plus communément les lignines ainsi extraites des lignines organosolubles. Le but principal de la solvolysse consiste à solubiliser le maximum de lignine dans un solvant organique sans la modifier ou la fragmenter contrairement aux procédés décrits précédemment [51].

Les procédés de prétraitement organosolv utilisent un solvant organique ou des mélanges de solvants organiques avec de l'eau pour solubiliser la lignine avant l'hydrolyse

enzymatique de la fraction cellulosique. Des solvants habituels pour ces procédés incluent l'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'éthylène glycol et des acides organiques.

Développés originellement dans les années 1980-1990 comme une alternative respectueuse de l'environnement aux procédés Kraft et sulfite, ces procédés ont connu récemment un regain d'intérêt suite au développement des bioraffineries [52].

Il existe un nombre important de solvants organiques qui, associés à des molécules d'eau, sont utilisés pour la solvolysé :

**Tableau N°04 : les principaux procédés organosolv et leurs systèmes solvants.**

Nom du procédé	Système solvant
Asam	Eau + sulfure alcalin + anthraquinone + méthanol
Organocell	Eau + hydroxyde de sodium+ méthanol
Alcell	Eau+ éthanol
Milox	Eau + acide formique + peroxyde d'hydrogène (formant de l'acide peroxyformique)
Acetosolv	Eau + acide acétique + acide chlorhydrique
Acetocell	Eau + acide acétique
Formacell	Eau + acide acétique + acide formique
Formosolv	Eau + acide formique + acide chlorhydrique

Chaque type de procédé organosolv possède ses conditions opératoire ça soit au niveau de température, de pression et même du temps d'extraction [53].

### 3.3 Valorisation de la lignine

La lignine est le second polymère biobasé sur Terre après la cellulose. Mondialement, environ 50 millions de tonnes de lignine sont produites annuellement comme résidu de la fabrication du papier. La plus grande partie de la lignine est brûlée pour générer de l'énergie pour les usines de pâte à papier. Cependant, la lignine offre des perspectives pour des applications à plus haute valeur ajoutée dans des produits biobasés [54]

La valorisation de lignine présente de nombreux défis pour le bioraffinage. Chimiquement, elle diffère des sucres par une sous-structure aromatique complexe la lignine à un haut degré de variabilité de structure, qui diffère suivant la source de biomasse et le procédé de récupération employé. Outre sa variabilité structurale, la lignine est aussi réactive.

Les applications offertes par l'utilisation de la lignine tombent dans trois catégories : court terme (~2015), moyen terme (~2019) et long terme (~2025) [55].

### **3.3.1 Applications établies**

Plusieurs applications à la fois établies et à relativement basse valeur ajoutée existent pour la lignine :

- ✓ Combustible, fournissant plus d'énergie par unité de masse que la cellulose, électricité, gaz de synthèse;
- ✓ Additif pour le ciment, en particulier comme retardateur de prise;
- ✓ Additif d'asphalte, en particulier en raison de ses caractéristiques anti-oxydantes;
- ✓ Liant dans l'alimentation animale pour plastifier et assurer la cohésion des pellets et additif pour les pellets de biomasse servant de combustible.

La production de vanilline est une application établie à haute valeur ajoutée [56].

### **3.3.2 Applications à moyen terme**

Les applications à moyen terme, et moyenne à haute valeur ajoutée incluent :

- ✓ Synthèse de macromolécules;
- ✓ Composites à base de lignine et composant de matériaux polymères tels que film d'amidon, polymères conducteurs, polyesters et polyuréthanes;
- ✓ Molécule plateforme pour la production de fibres de carbone et conditionneur de sol.

### **3.3.3 Applications à long terme / à haute valeur ajoutée**

Les applications potentielles à haute valeur ajoutée et à long terme pour la lignine incluent:

- ✓ Produits chimiques à base aromatique (tels que les phénols, benzène, toluène, xylènes) résultant de la dépolymérisation de la lignine, qui peut s'obtenir par catalyse

alcaline suivie par une hydrodéoxygénation, une pyrolyse et un fractionnement, une liquéfaction catalytique ou une dépolymérisation supercritique ;

- ✓ Stabilisant UV et agent colorant ;
- ✓ Tensioactif. Un résumé des applications présentes et potentielles de la lignine est donné au tableau suivant :

**Tableau N° 05 : Principale applications de la lignine [57].**

<b>Catégorie</b>		<b>Exemples</b>
Court terme/faible valeur Ajoutée	Bioénergie, gaz de synthèse	Chaleur, électricité
Moyen terme/moyenne à haute valeur ajoutée	Macromolécules	Fibres de carbone Modificateurs de polymère Résines/colles/liants
Long terme ou haute valeur Ajoutée	Monomères et oligomères Aromatiques	Benzène, toluène, xylène Vanilline Molécules de lignine monomères Molécules plateformes (phénoliques, styrène)

# **Partie Expérimentale**

### Introduction

Plusieurs études et recherches ont montré l'importance de ce résidu et leur valorisation biotechnologique à partir des champs d'applications très nombreux et variés. Cette biomasse nous amène à faire des recherches plus approfondies d'où il ressort une nouvelle valorisation de ce déchet à partir de ces constituants et leurs propriétés biologiques qu'il renferme.

L'objectif de notre travail est consacré d'une part à l'extraction hydroalcoolique et le dosage des phénols totaux dans les grignons d'olives et d'autre part à l'extraction et la caractérisation physico-chimiques et structurale des lignines.

Ce travail a pour objectif aussi, d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait et des lignines par le biais de la méthode de réduction de fer (FRAP), la méthode de piégeage de radical libre DPPH et la méthode de blanchissement de  $\beta$ -carotène. Le schéma directeur de l'expérimentation est donné dans la figure suivante :

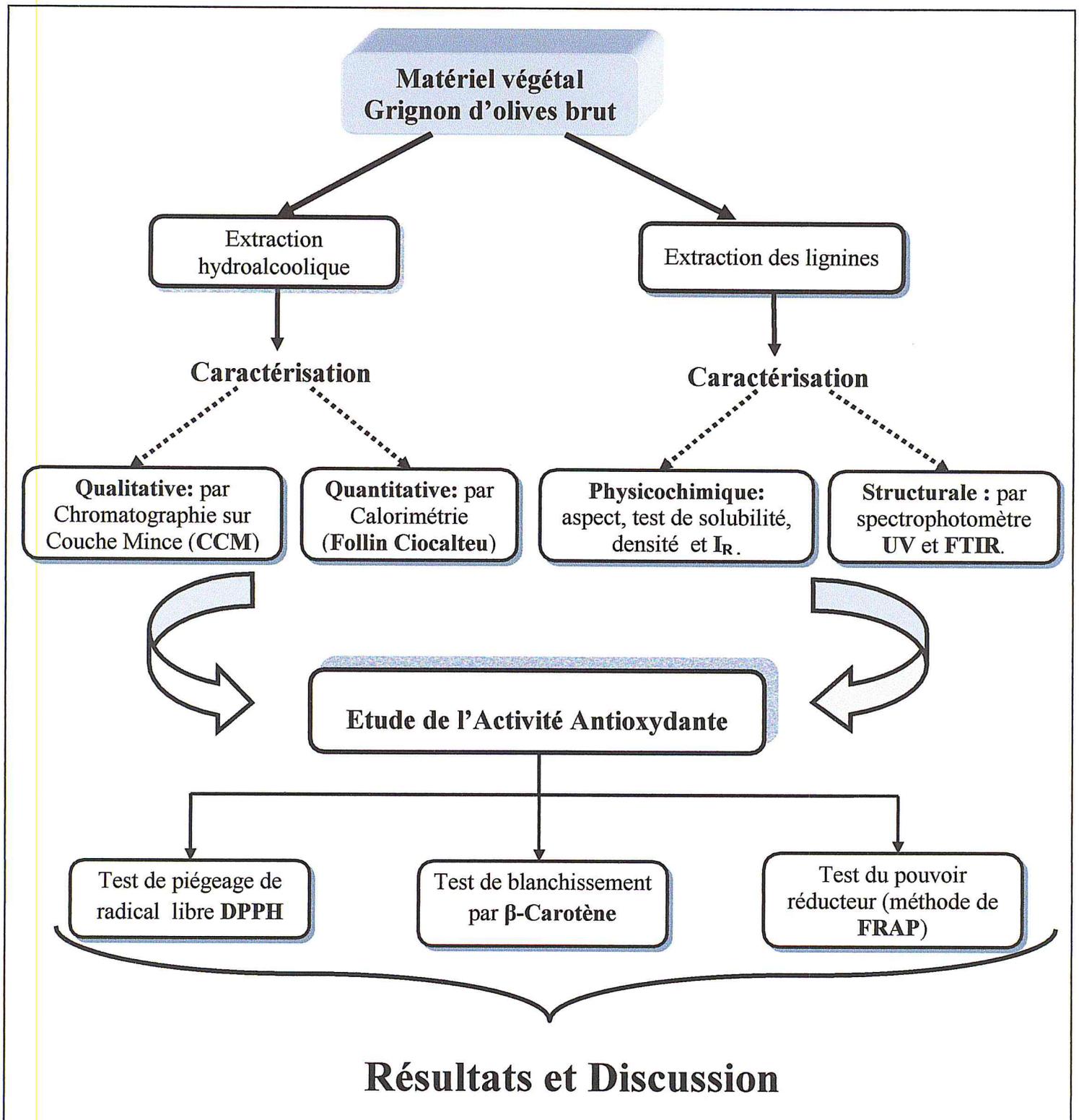


Figure N°11 : Représentation schématique des étapes expérimentales de notre étude.

### 1. Matériel

#### 1.1 Matière végétal

Le substrat végétal qui a fait l'objet de notre étude est le grignon d'olives brut provenant des olives mûres (*Olea Europeae Sativa*) de variété Limli, de la région de Khemis Miliana récolté durant la période oléicole 2014/2015 (de Novembre à Janvier).

Les grignons d'olives utilisés au cours de cette études ont été prélevé de l'huilerie « Tristar » situé à Blida « Sidi Abdel Kader ». Cette huilerie fonctionne avec un système à deux phases auquel son équipement est sophistiqué.

L'échantillon prélevé est constitué de pulpes et des fragments de noyaux. Les grignons sont séchés à l'air libre jusqu'à l'obtention d'un taux d'humidité plus bas et conditionnés ainsi dans des bidons en plastiques.

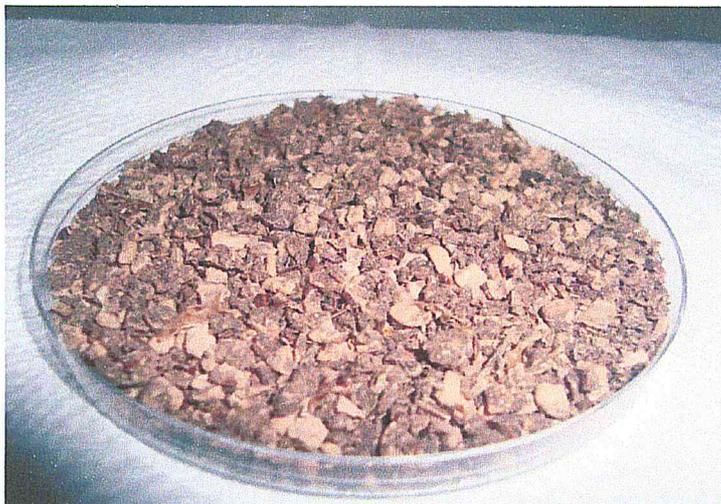


Figure N°12 : Grignon d'olives brut après séchage.

#### 1.2 Produits et réactifs chimiques

1. Les solvants organiques utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont: le méthanol, le chloroforme fournis par Sigma-Aldrich, l'hexane par Prolabo, l'acétate d'éthyle par Fisher Laboratory, dioxane et l'eau oxygénée  $H_2O_2$  ;
2. Les différents acides sont : l'acide acétique ( $C_2H_4O_2$ ), l'acide formique ( $CH_2O_2$ ) du Biochem, l'acide gallique, l'acide ascorbique de Sigma Aldrich, l'acide trichloracétique (TCA) de Fluka et l'acide linoléique ;

3. Les réactifs chimiques : le DPPH diphenylpicryl  $\beta$  hydrazyl ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ), Follin Ciocalteu (FC) par prolabo et  $\beta$ -carotène ;
4. Les sels sont : Bicarbonate de Sodium ( $Na_2CO_3$ ), l'hydroxyle de sodium et (NaOH) l'hydroxyle de potassium (KOH) par Panreac Quimica, bromure de potassium (KBr) et ferrocyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  ;
5. D'autres produits : Butyle-hydroxy-anisol « BHA », Butyle-hydroxy-toluène « BHT » (utilisé comme des étalons de référence) et le Tween40 ;

## 2. Méthodes

### 2.1 Extraction des phénols

#### ✓ Protocole d'extraction

La méthode d'extraction utilisée dans notre cas est basée sur la macération. Une prise d'essai de 25g d'échantillon ajouté à 200ml de solvants méthanol /eau avec une proportion de 80% (v/v), le mélange a été soumis à une agitation pendant 12h, après une filtration sous vide à l'aide d'un verre fritté de porosité N°3, le filtrat a été évaporé sous vide à l'aide d'un rota vapeur de type Heidolph à température de 40°C pour une élimination totale du méthanol et l'obtention d'un extrait aqueux.

Le premier résidu a été récupéré pour une deuxième extraction mais cette fois avec une proportion de 50% (v/v), le mélange a été agité pendant 6h puis filtré sous vide afin de passer le filtrat à la centrifugeuse à une vitesse de 3000 tours pendant 10mn, la phase surnageant a été récupérée et évaporée sous vide dans les mêmes conditions que la précédente.

Les étapes de cette extraction sont détaillées ci-dessous par des phases photographiques dans l'annexe 1.

Cette expérimentation est schématisée par la figure suivante :

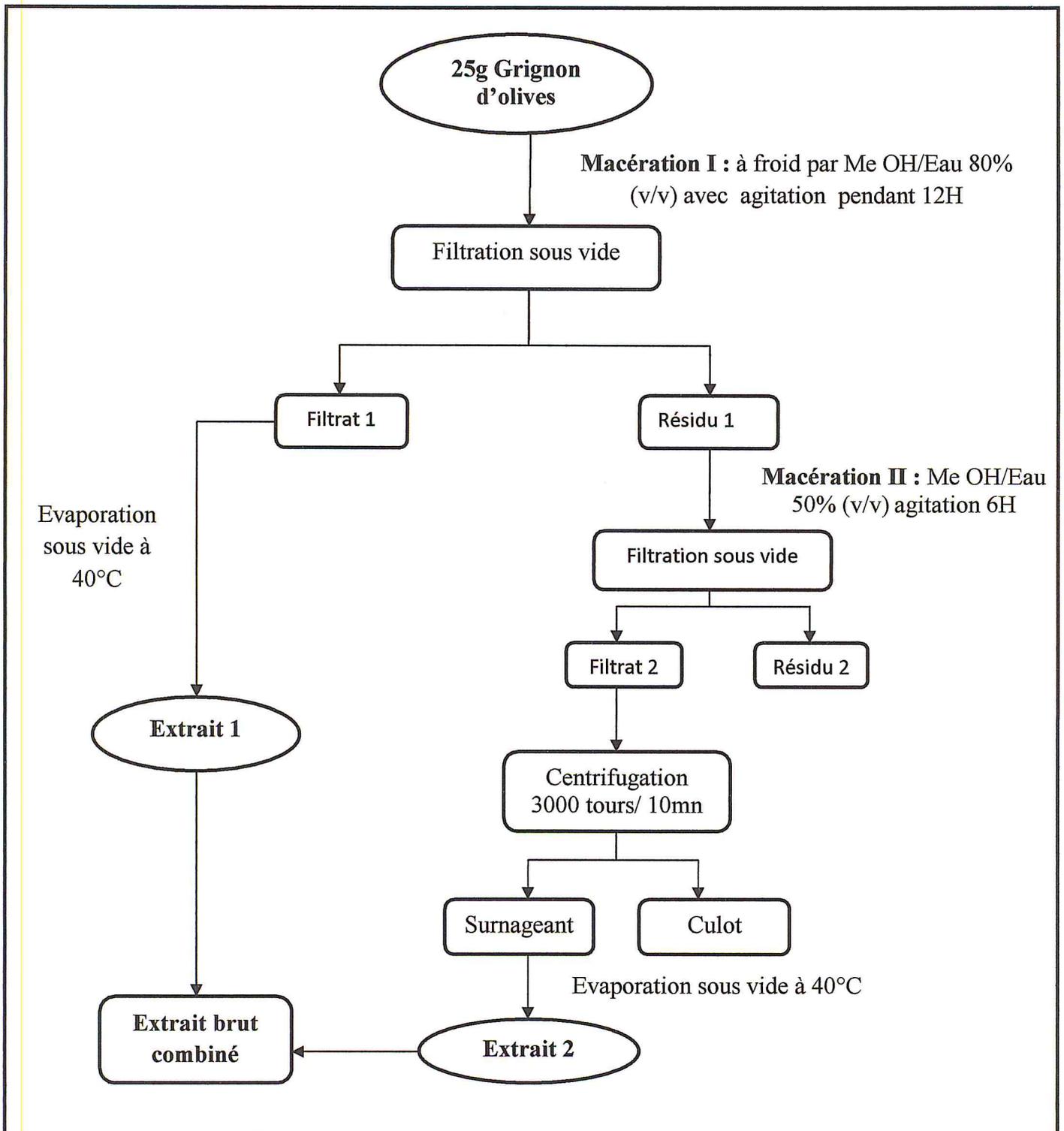


Figure N°13 : Schéma représentatif du procédé d'extraction des phénols [58].

## 2.2 Caractérisation qualitative et quantitative des phénols extraits

### 2.2.1 Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM)

#### ✓ Principe

Toute méthode de chromatographie est basée sur la distribution des substances à séparer entre deux phases. La phase mobile s'écoule au tout long d'une phase stationnaire. Selon leur affinité, les substances en solution sont plus en moins retenue par la phase stationnaire, ce qui rend possible leurs séparation. Les phases peuvent être liquides, solide ou gazeux.

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse tout le long d'une phase stationnaire solide fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de plastique ou d'aluminium.

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans une cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace avec sa propre vitesse derrière le front de solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile [59].

#### ✓ Protocole expérimental

Les échantillons sont analysés en utilisant des plaque CCM commerciales prêtes à être utiliser, de gel de silice de dimension (20/20cm).

Après avoir déposé les échantillons sur des points repères à environ 1cm du bord inférieur de la plaque, les dépôts sont séchés et la plaque est introduite dans une cuve de migration dans l'enceinte est préalablement saturé. La révélation des composés séparés se fait par la méthode d'iode, les tâches sont ensuite cerclées au crayon.

Plusieurs systèmes du solvant « éluant » ont été essayés :

- I. Acétate d'éthyle / Méthanol / Eau (76,5/13,5/10) (v/v/v) ;
- II. Chloroforme / Acétate d'éthyle / Acide acétique (40/50/10) (v/v/v) ;
- III. Chloroforme /Méthanol /Acide acétique /Eau (84,2/15/0,3/0,5) (v/v/v) ;

IV. Chloroforme/ Acétate d'éthyle/ Acide formique (50/40/10) (v/v/v) ;

Seuls les deux systèmes (II) et (IV) ont montrés une bonne séparation.

Calcul du rapport frontal ( $R_f$ ) est donné par la relation suivante :

$$R_f = D_c / D_s$$

Où :  $D_c$  : la distance parcourue par le composé (mesurer au centre de la tâche) ;

$D_s$  : la distance parcourue par le front du solvant.

### **2.2.2 Caractérisation quantitative par la méthode de Follin Ciocalteu, dosage des phénols totaux par Colorimétrie**

#### **✓ Principe**

Le dosage des composés phénoliques en utilisant le réactif de Follin Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi. Ce dosage permet de quantifier globalement les composés phénoliques provenant des extraits végétaux d'origine plus diverse [60].

Le réactif est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des substances phénoliques, en mélange bleu d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 750-760 nm. Elle est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques oxydés [61].

Après avoir tracé la droite d'étalonnage de ce dosage (absorbance en fonction des concentrations connues à partir d'une gamme étudiée); on peut déterminer graphiquement la concentration puis la teneur des composés phénoliques dans notre extrait.

#### **✓ Protocole expérimental**

4mg d'extrait de grignon d'olive a été dissout dans 8 ml de mélange de solvant Méthanol/Eau (50/50%). 1ml de cette solution d'extrait a été mélangée avec 5ml eau distillée et 6ml de solution de carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  de concentration de 290 mg/ml puis 0.5ml de réactif de Follin Ciocalteu a été ajouté au mélange. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 30 mn à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 760 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations, le domaine choisi est de (0- 0.06 mg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique par 1mg poids sec d'extrait de grignon ( $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait).

### 2.3 Extraction des lignines

Le procédé CIMV est basé sur le raffinage de la matière végétale pour séparer ces trois principaux composants qui sont la cellulose, l'hémicellulose, et la lignine [62]

#### ✓ Principe :

CIMV est un procédé organosolv en milieu acide utilisant un mélange d'acide formique, d'acide acétique et d'eau (30/55/15 v/v/v). L'extraction est réalisée à pression atmosphérique, entre 105 °C et 110°C pendant 3 heures [63]. Après réaction et filtration de la cellulose, les solvants sont recyclés par évaporation sous pression réduite et par distillation sous une pression de 8 bars. La liqueur d'extraction est additionnée d'eau pour solubiliser les hémicelluloses et précipiter la lignine qui est extraite par filtration. Dans ce procédé, l'acide acétique constitue le solvant de la lignine et des hémicelluloses, tandis que l'acide formique est l'agent chimique qui sert de catalyseur pour rompre les liaisons éthers et esters des polysaccharides liés à la lignine. Le temps de réaction et l'efficacité du procédé permettent d'extraire la lignine sous une forme faiblement dégradée et peu estérifiée [64,65].

#### ✓ Protocole expérimental

Les lignines sont extraites par dissolution dans un mélange acide acétique - acide formique - eau (55/30/15 v/v/v) de telle sorte le rapport solide / liquide est de 1/12, soit 60ml pour 5g de grignon d'olives.

Dans une première étape, la matière végétale est traitée pendant 3h à reflux entre 105 et 110°C à pression atmosphérique par les acides (point azéotrope d'ébullition du mélange acides/eau) qui dissolvent la lignine et hydrolysent l'hémicellulose en oligo- et monosaccharides. Après réaction et filtration, les solvants sont recyclés par évaporation environ 100°C et la liqueur d'extraction est additionnée d'eau pour précipiter les lignines qui sont extraites par filtration. Les lignines sont ensuite lavées 3 fois par l'eau distillée (50ml) puis séchées à l'étuve pendant 24h à température environ 120°C. Le schéma suivant présente les différentes étapes de l'extraction des lignines suivant le procédé CIMV.

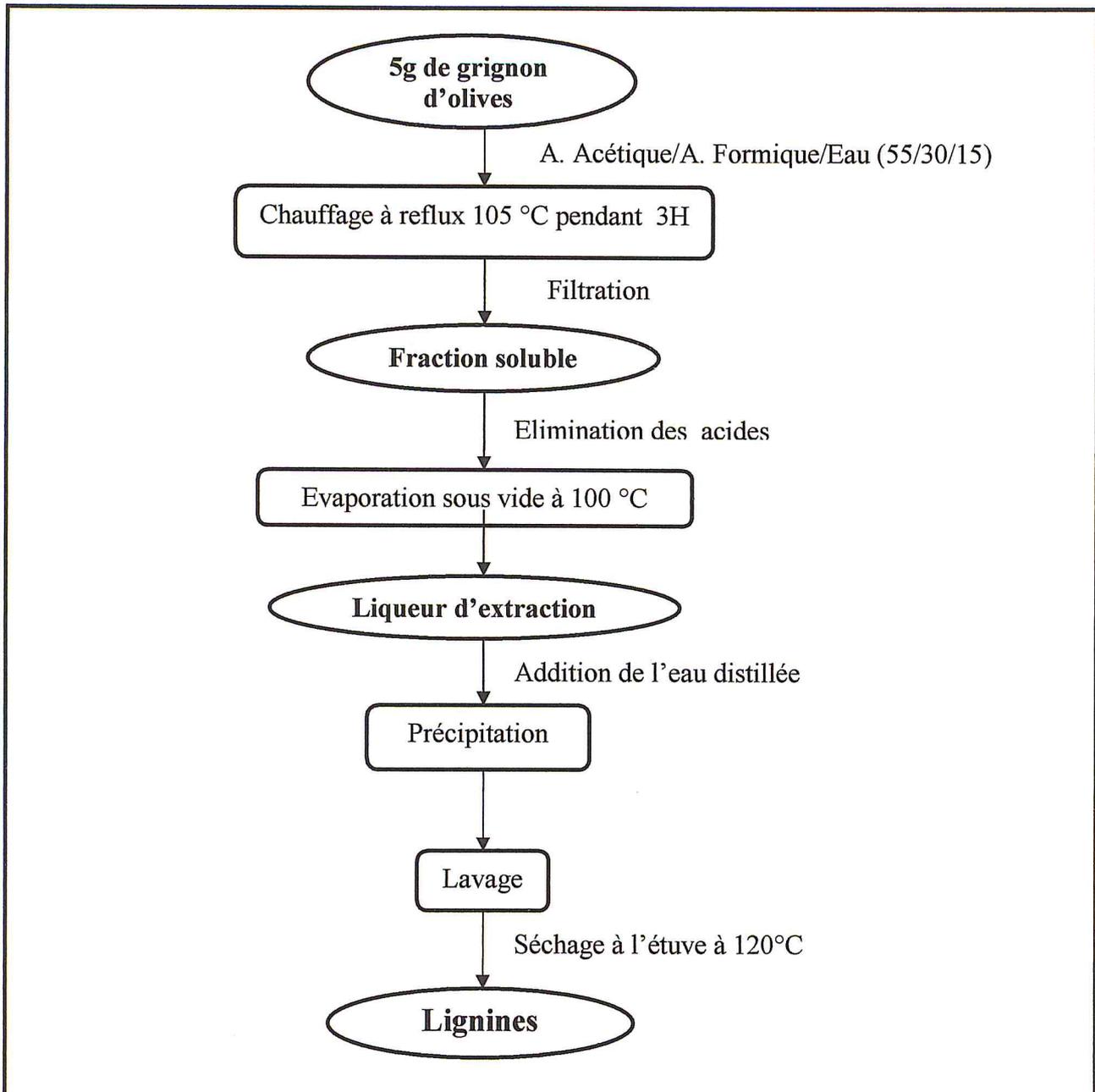


Figure N°14 : Protocole d'extraction des lignines par le procédé organosolv CIMV [66].

## 2.4 Caractérisation des lignines extraites

### 2.4.1 Caractérisation physico-chimiques

Afin de caractériser la lignine obtenue précédemment par solvolysé, nous avons déterminé les propriétés organoleptique (aspect, couleur, odeur) et physico-chimiques (solubilité, densité, pouvoir rotatoire et l'indice de réfraction) suivant les normes A.F.N.O.R.

### 2.4.2.1 Détermination de la densité

#### ✓ Principe

La densité est définie comme étant la masse volumique de la solution d'extrait rapportée à celle de l'eau pour une température donnée. Elle est mesurée à l'aide d'un pycnomètre d'un volume de 10 ml.

La densité de notre extrait est déterminée par la formule suivante :

$$\rho_{\text{ext}} = [d - m_{\text{solv}} / m_{\text{T}} \cdot \rho_{\text{solv}}] \cdot m_{\text{T}} / m_{\text{ext}}$$

Avec :  $\rho_{\text{ext}} = (m_{\text{pycnomètre remplie}} - m_{\text{pycnomètre vide}}) / 10\text{ml}$

Où :

$\rho_{\text{ext}}$  : masse volumique de la solution d'extrait en g/ml ;

$\rho_{\text{solv}}$  : masse volumique de solvant en g/ml ;

$d$  : densité de l'extrait ;

$m_{\text{solv}}$  : masse du solvant « Dioxane » en g ;

$m_{\text{ext}}$  : masse d'extrait en g ;

$m_{\text{T}}$  : masse totale « extrait + solvant ».

### 2.4.2.2 Détermination de l'indice de réfraction

#### ✓ Principe

On mesure l'indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre, ce paramètre est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans la solution d'extrait maintenue à une température ambiante [67]. L'indice de réfraction est donné par la relation suivante :

$$\eta_{\text{ext}} = [\eta - m_{\text{solv}}/m_{\text{T}} \cdot \eta_{\text{solv}}] \cdot m_{\text{T}}/m_{\text{ext}}$$

Avec :

$\eta_{\text{ext}}$  : indice de réfraction de la solution d'extrait ;

$\eta$  : indice de réfraction d'extrait brut ;

$\eta_{\text{solv}}$  : indice de réfraction de solvant.

### 2.4.2.3 Détermination de pouvoir rotatoire

#### ✓ Principe

La polarimétrie est une technique expérimentale basée sur la mesure de la déviation du plan de polarisation d'une lumière polarisée traversant une solution composée d'une ou de plusieurs molécules chirales. Une molécule chirale possède la propriété de faire dévier le plan de polarisation d'une lumière incidente polarisée. Il suffit donc de placer une solution contenant la substance chirale entre les deux polaroïds pour vérifier si celle-ci fait dévier le plan de polarisation de la lumière. Si c'est le cas, l'angle pour lequel on obtient l'extinction correspond à l'angle de rotation propre à la substance chirale [68]

### 2.4.2.4 Solubilité

#### ✓ Principe

La solubilité représente la quantité maximale de soluté que l'on peut dissoudre dans un solvant à une température donnée. Une fois cette quantité atteinte, on dit que la solution est maintenant saturée [69].

D'après la documentation et les travaux exécutés sur la lignine nous avons constaté que ce dernier est soluble dans les milieux alcalins, dans les acides faibles et les éthers cycliques. Pour cela l'étude de la solubilité a été effectuée par dissolution des lignines extraites dans le dioxane, l'acide acétique, l'acide formique, la solution de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , d'hydroxyde de sodium  $\text{NaOH}$  et d'hydroxyde de potassium  $\text{KOH}$  à température ambiante.

### 2.4.2 Caractérisation structurale

Jusqu'à présent, la plupart des caractéristiques importantes de la structure de la lignine sont bien connues et nous sommes capables de traiter en détail la structure chimique de la lignine sur la base des résultats de réactions chimiques spécifiques et d'analyses spectroscopiques.

À cause du grand nombre de combinaisons possibles, plusieurs méthodes analytiques sont requises pour caractériser la lignine. La spectroscopie UV-visible, la spectroscopie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire (RMN) et en particulier lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec des modifications chimiques, ont contribué à l'estimation des groupements fonctionnels et des types de liaison [70].

Les méthodes décrites ci-dessous ont été utilisées pour caractériser la lignine extraite précédemment par le procédé organosolv.

### 2.4.2.1 Caractérisation par infrarouge à transformée de Fourier « FTIR »

#### ✓ Principe

Les échantillons en phase solide ont été préparés à l'aide d'une solution solide de bromure de potassium, KBr, où la concentration de l'échantillon à analyser est de 1,0 mg de lignine pour 200 mg de KBr. Le spectre de la référence de KBr est pris dans les mêmes conditions d'analyse pour être soustrait du spectre des échantillons. Il en résulte un spectre expérimental n'incluant pas la référence et la réduction du bruit de fond permet de maximiser l'interprétation. La région étudiée s'étend de 4000 à 600  $\text{cm}^{-1}$  [71].

### 2.4.2.2 Caractérisation par spectroscopie UV-Visible

#### ✓ Principe

L'absorption UV-Visible est un instrument très utilisée pour la détection qualitative et quantitative de la lignine. Cette méthode permet de déterminer la présence de toutes structures ayant des groupements insaturés: les noyaux aromatiques, les groupements carbonyles, etc.

L'analyse de notre échantillon est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à bailliage dont la longueur d'onde varie de 200 à 800 nm. La mesure a été réalisée à partir de dissolution de 5mg de lignine dans 95% (v/v) de Dioxane/Eau [72].

## 2.5 Etude de l'activité antioxydante

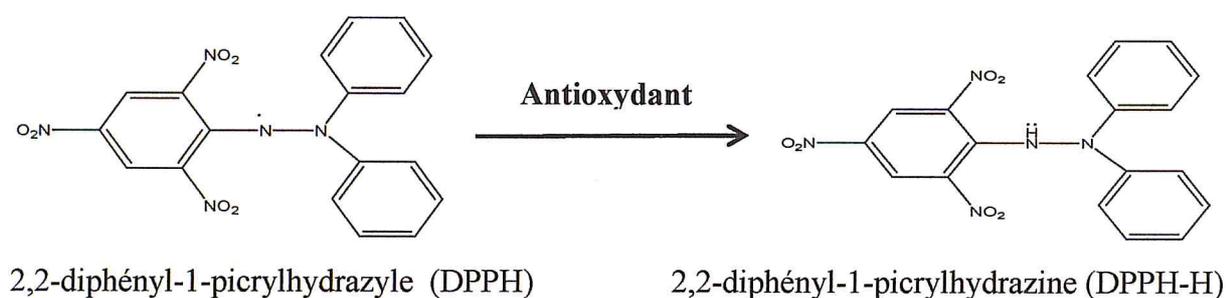
De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé trois différents tests chimiques à savoir : le piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur (méthode de FRAP) et le test de blanchissement par  $\beta$ -carotène.

Afin d'évaluer l'activité antioxydante de notre matière végétale nous avons appliqué ces trois tests sur l'extrait des composés phénoliques et de la lignine extraite du grignon d'olives.

### 2.5.1 Test de piégeage du radical libre DPPH

#### ✓ Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre de couleur violacée qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517nm. Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (figure). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire [73].



**Figure N°15 : Réduction du radical DPPH.**

Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine), dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu a donné des protons. Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu éthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non couteux [74]

#### ✓ Protocole expérimental

Un volume de 1 ml de différentes concentrations de chaque extrait ainsi exprimées en mg/ml (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.2) ajoutées à 1ml de la solution méthanolique du DPPH (0.04mg/ml) fraîchement préparé. Le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Les absorbances sont mesurées à une longueur d'onde de 517nm. (3 répétitions pour chaque concentration)

Le blanc est représenté par un mélange de solvant méthanol/eau (50/50%) (v/v) puisque nous avons réalisé la dilution de notre gamme par ce mélange, le témoin négatif est

composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de solvant, le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard: l'acide ascorbique (vitamine C), butyle-hydroxy-anisol (BHA) et butyle-hydroxy-toluène (BHT).

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire (Radical Scavenger Activity) ou pourcentage d'inhibition (I%) est estimée selon l'équation suivante :

$$I\% = (\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle négatif}) \times 100$$

### Détermination d'IC<sub>50</sub> :

Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante [75]. Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et des standards.

### 2.5.2 Test du pouvoir réducteur (Méthode de FRAP)

#### ✓ Principe

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu, 1986 (Reducing Power Assay). Ce test permet de déterminer l'activité des extraits étudiés dans un milieu neutre. Le principe de ce test est basé sur la réduction des ions Fe<sup>3+</sup> présent dans le complexe K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en Fe<sup>2+</sup> en présence d'un antioxydant a le pouvoir de céder un électron. L'absorbance du milieu réactionnel est mesuré à 700nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés. L'évolution de l'activité antioxydante de nos extraits est comparée par rapport à l'acide gallique et le BHT et cela en traçant une courbe d'étalonnage [76].

#### ✓ Protocole expérimental

1ml de différentes concentrations des extraits dans le solvant adéquat sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné au mélange. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10min. A la fin, 2.5 ml de la phase surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de FeCl<sub>3</sub> (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

IC<sub>50</sub> sont calculés à partir du graphe. La concentration IC<sub>50</sub> qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactive.

### 2.5.3 Test de blanchissement de $\beta$ -carotène

#### ✓ Principe

Le  $\beta$ -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits [77].

Cependant, dans le test du blanchissement du  $\beta$ -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le  $\beta$ -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système d'émulsion aqueux en résultant le blanchissement du  $\beta$ -carotène (la disparition de sa couleur rouge). La présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du  $\beta$ -carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système [78].

Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de  $\beta$ -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

#### ✓ Protocole expérimental

Afin de réaliser le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, une émulsion  $\beta$ -carotène / acide linoléique préparée par solubilisation de 2 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml de chloroforme, a été additionnée de 25  $\mu$ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Après évaporation complète du chloroforme au rotavapeur, 100 ml d'eau saturée en oxygène sont ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée. Dans des tubes à essai 2,5 ml du mélange précédant sont additionnés de 350  $\mu$ l d'extrait puis incubés à l'obscurité à la température du laboratoire.

Deux tubes contrôles ont été aussi préparés avec la même procédure: l'un contenant un antioxydant de référence BHT (témoin positif) et l'autre sans antioxydant (témoin négatif) où l'échantillon est remplacé par 350  $\mu$ l de méthanol.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 470 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures.

L'activité antioxydante des extraits (AA %) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AA \%} = [\text{Abs 48h (échantillon)} / \text{Abs 48h (BHT)}] \times 100$$

### 3. Résultats et discussions

#### 3.1 Rendement d'extraction des phénols

Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$R(\%) = (M_{\text{extrait}} / M_{\text{échantillon}}) \cdot 100$$

Avec :

R(%) : rendement d'extraction en pourcentage ;

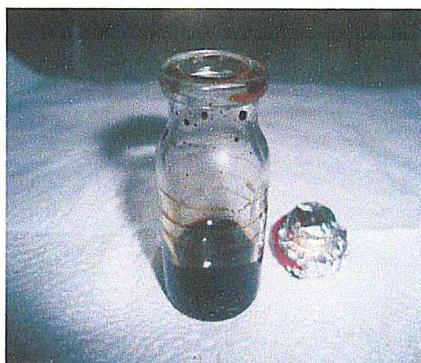
$M_{\text{extrait}}$  : masse de l'extrait en gramme ;

$M_{\text{échantillon}}$  : masse de l'échantillon en gramme.

L'opération de l'extraction par macération de grignon d'olives brut dans le mélange de solvant méthanol/eau a permis d'obtenir un rendement de 5.72% .Le tableau suivant résume les propriétés organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de notre extrait :

**Tableau N°06 :** Les propriétés organoleptiques de l'extrait de grignon d'olives.

Aspect	Couleur	Odeur
Pâteux	Marron foncé	Caractéristique



**Figure N°16 :** Extrait hydroalcoolique de grignon d'olives.

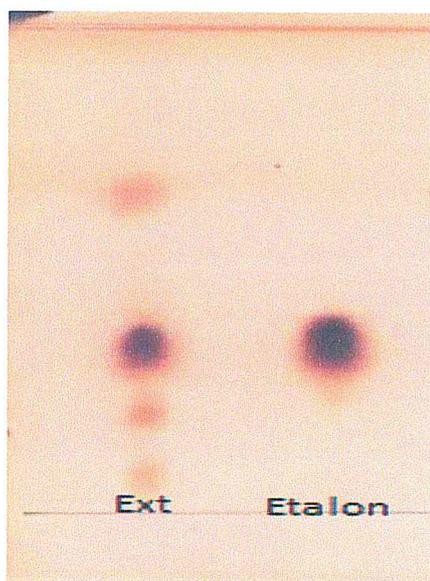
Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix de solvant), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous sur le contenu total des composés phénoliques, et par conséquent affecte sur les activités biologiques méditées par ces métabolites [79].

### 3.2 Caractérisation qualitative et quantitatives des phénols extraits

#### 3.2.1 Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple dont le principe est basé sur le phénomène d'adsorption. Elle est utilisée dans la séparation et l'identification des molécules pures, les extraits (mélange complexes de métabolites) et les échantillons biologiques. Après plusieurs essais de système, nous avons adopté, après optimisation le système suivant : Chloroforme/Acétate d'éthyle/ Acide acétique 40/50/10 (v/v/v) a permis d'avoir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots.

Après le développement dans une cuve en verre, la lecture a été faite par la méthode de révélation d'iode et les rapports frontaux des spots ont été calculés. Le profil chromatographique de l'extrait phénolique est représenté dans la figure suivante :



**Figure N°17 :** Profil chromatographique de l'extrait hydroalcoolique des composés phénoliques issus des grignons d'olives.

L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) a été effectuée afin d'avoir une idée préliminaire sur la présence des composés phénoliques dans notre extrait.

Il apparaît clairement sur ce chromatogramme que l'extrait hydroalcoolique issu des grignons d'olives brut est riche en phénols, montrant un nombre de spots avec des positions et d'intensité différente.

Les rapports frontaux des spots issus de la séparation de l'extrait et même du témoin « Acide gallique » sont donnés dans le tableau ci-dessus sachant que le front du solvant est de l'ordre de 5.9cm. Nous avons constaté que la tâche correspondante au témoin a un niveau de migration identique avec celle de l'extrait. Cela confirme la présence des composés phénolique dans notre extrait pour passer par la suite à l'analyse quantitative de ces composés afin de déterminer leurs teneurs par le dosage de Follin Ciocalteu.

**Tableau N°07 :** Les rapports frontaux  $R_f$  des différents spots d'extrait et du témoin.

	Extrait	Étalon « Acide gallique »
<b>Rapport frontaux des différents spots</b>	0.07	0.34
	0.20	
	0.34	
	0.63	

### 3.2.2 Caractérisation quantitative par le dosage calorimétrique de Follin-Ciocalteu

La quantité des composés phénoliques été déterminée par la méthode de Follin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard, l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 760nm. Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux présentes dans l'échantillon.

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les composés phénoliques pour les raisons suivantes ; c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, la disponibilité du réactif de Follin et la méthode est bien standardisée, la grande longueur d'onde (760nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde [80].

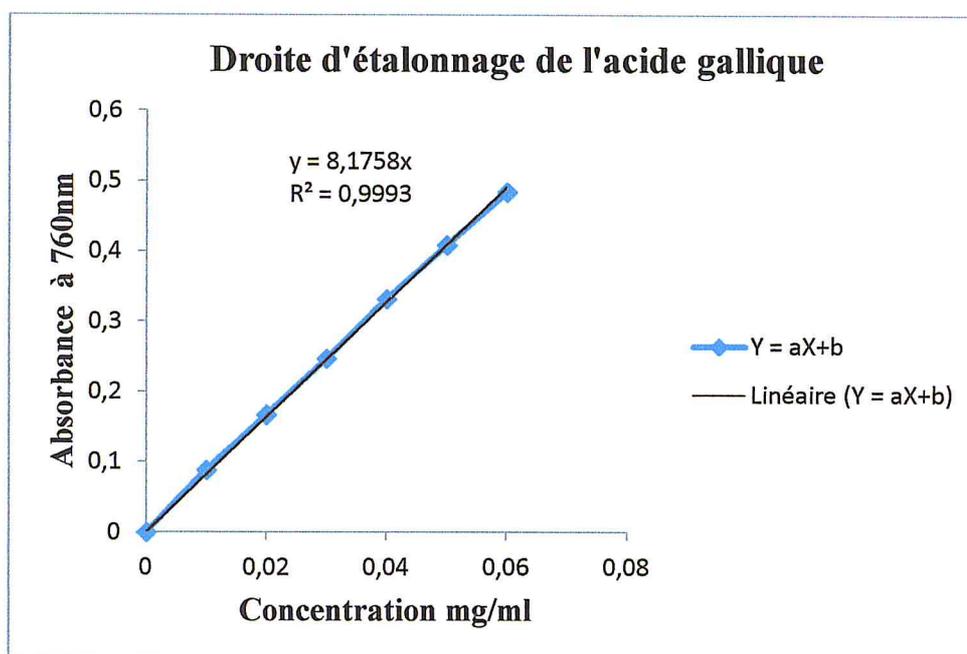
La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par une solution étalon (l'acide gallique) à différents

concentration. Le tableau suivant enregistre les absorbances de l'acide gallique à chaque concentration:

**Tableau N°08 :** Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.

C (mg/ml)	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
Abs	0	0.088	0.167	0.247	0.332	0.409	0.484

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée en prenant l'absorbance en fonction de chaque concentration (mg/ml) :



**Figure N°18 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des composés phénoliques.

La concentration des phénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ( $Y=8.1758X$ ) sachant que :  $R=0,9993$ . En remplaçant le Y par l'absorbance de notre extrait qui a subi le même traitement que les solutions filles ( $Abs_{\text{extrait}} = 0.252$ ) pour donner une valeur  $7.5\mu\text{g EAG/ mg d'extrait}$ .

Selon Nefzaoui, 1984 [23] la teneur en composés phénoliques existante dans le grignon d'olives représente une fraction mineure inférieure ou égale à 2%. Le pourcentage des phénols totaux dans notre extrait est de l'ordre de 0.75%. Ce résultat est en conformité avec celle de la littérature.

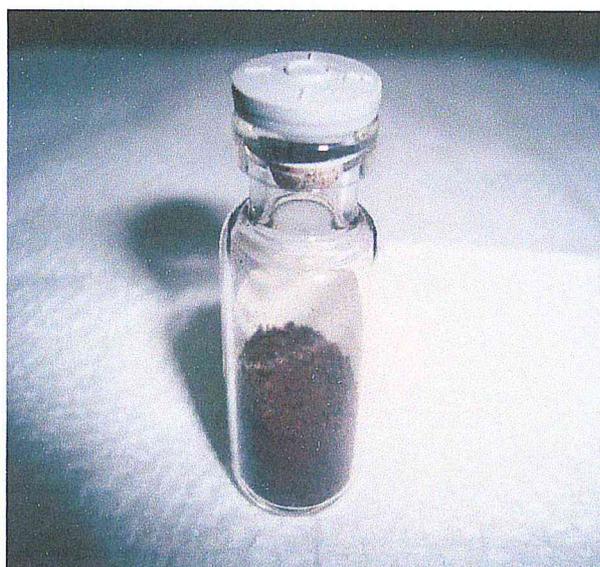
**NB :**

Si le dosage de Follin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique aux phénols car cette méthode ne donne pas d'indication sur la nature des composés phénoliques présente dans l'extrait. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certaines substances, telle que la vitamine C, les caroténoïdes, les sucres réducteurs et les acides aminés aromatiques, peuvent en réduisant le complexe phosphotungstique-phosphomolybdénique interféré et conduit à une surestimation de la nature en composés phénoliques. En fait cette méthode donne un aperçu sur la qualité réductrice d'un ensemble de composés en plus des composés phénoliques [81]. .

### 3.3 Rendement d'extraction en lignines

Le procédé CIMV utilise un procédé d'extraction au solvant organique (organosolv). Le solvant employé par CIMV est un mélange d'acide acétique, d'acide formique et d'eau.

Pour optimiser le rendement des lignines extraites par ce procédé, plusieurs manipulations ont été effectuées afin de donner la fiabilité et plus d'exactitudes à nos résultats. La lignine extraite de grignon d'olives est une poudre de couleur marron très intense avec un rendement moyen d'environ  $7.18 \pm 0.22\%$ . Beaucoup de détails sur l'aspect des lignines extraites avant et après séchage sont données dans l'annexe 2.



**Figure N°19 :** Les lignines extraites à partir de grignon d'olives.

Plusieurs études dans la littérature ont prouvé que le grignon d'olives est composé par une fraction riche en lignine provenant des fragments de noyaux. Selon Demirbas, 2004 ; Jauhiainen et al, 2005 et Garcia-Ibanaz et al, 2006 [9] ont montré que la composition de ce dernier en lignine est respectivement de l'ordre de 48.4%, 45% et 38% c'est-à-dire la lignine représente entre le tiers et le moitié de la masse de grignons d'olives.

Le rendement d'extraction est extrêmement faible par rapport aux valeurs théoriques cité ci-dessous. En justifiant ce décalage par plusieurs facteurs qui contribués dans la variation de cette teneur parmi lesquels : l'existence de plusieurs variétés d'olives, le stade de maturation, les conditions climatiques (température, précipitations) et surtout la région de récolte (concernent particulièrement les données relevant des pays du Maghreb notamment la Tunisie et le Maroc).

La détermination de quelques paramètres physico-chimiques et l'analyse structurale de la lignine obtenue permet de caractériser ce dernier et juger sa qualité suivant les normes internationales.

### 3.4 Caractérisation des lignines extraites

#### 3.4.1 Caractérisation physico-chimiques des lignines

Le tableau suivant résume les résultats de l'analyse physico-chimiques des lignines extraites précédemment par le procédé organosolv.

**Tableau N°09 : Paramètres physico-chimiques des lignines extraites.**

	Résultats	Norme
<b>Densité</b>	1.35	1.33-1.45
<b>Indice de réfraction</b>	1.59	1.61
<b>Pouvoir rotatoire</b>	Inactif	Inactif
<b>Solubilités</b>	Soluble dans: le dioxane, l'acide acétique, acide formique et les solutions de NaOH, KOH et Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .	La lignine est soluble dans les éthers cycliques, et aussi dans les milieux organiques acides ou alcalins.

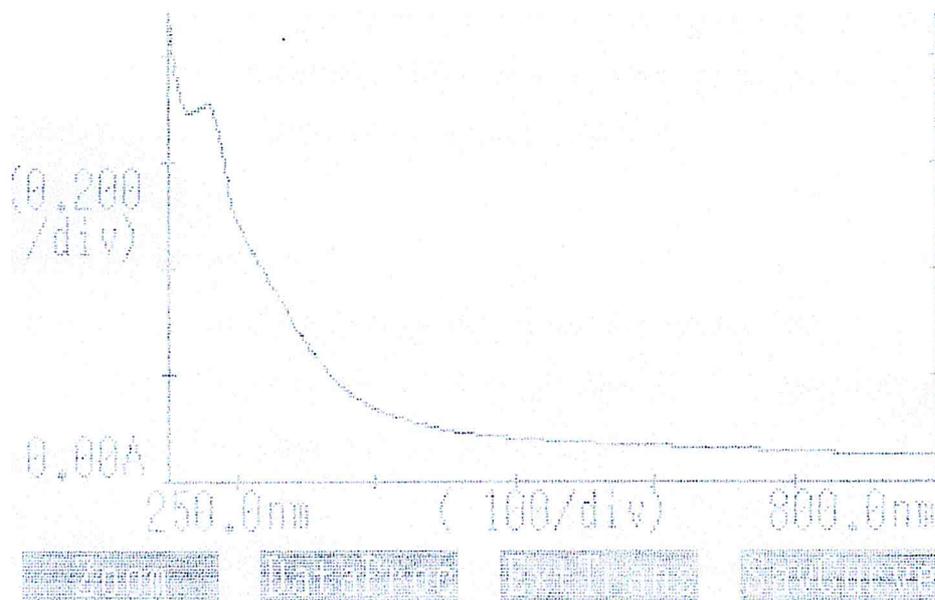
La lignine est soluble dans les éthers cycliques comme le dioxane ou le tétrahydrofurane ainsi les acides et les milieux alcalins comme nous l'avons démontré. Pour ce qui concerne la valeur de l'indice de réfraction, il est légèrement inférieur à la valeur de référence, sinon les autres résultats sont conformes aux normes prescrites, cela indique la bonne qualité des lignines extraites.

L'état physico-chimique de la lignine détermine comment elle peut être utilisée dans la fabrication de divers produits. Selon Lora et Glasser, la source à partir de laquelle la lignine est obtenue et la méthode d'extraction ont une forte incidence sur ses propriétés physico-chimiques. Certaines caractéristiques dépendent du mode d'obtention, en particulier, la couleur et la solubilité. Par contre, d'autres caractères ne conduisent qu'à des faibles variations [82].

### 3.4.2 Analyse structurale des lignines extraites

#### 2.4.2.1 Analyse structurale par spectroscopie Ultraviolet-Visible

Le spectre théorique de la lignine absorbe à des longueurs d'ondes variant de 230 à 330 nm, pour afficher un maximum d'absorption à 280 nm. Cette région d'absorption varie selon l'importance des groupements méthoxyles que possède chaque unité phénylpropanoïdes. Ces particularités occasionnent une légère variation du maximum d'absorption de la longueur d'onde autour de 280 nm.

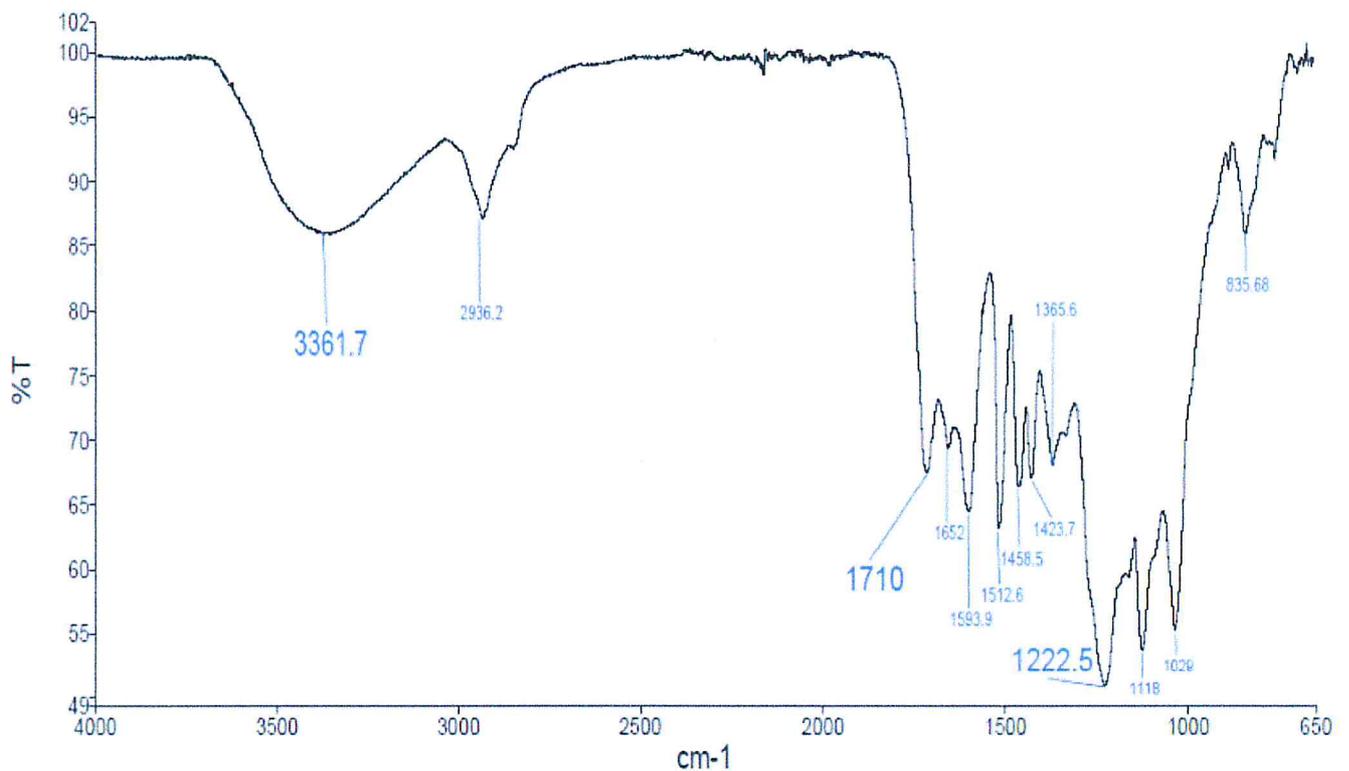


**Figure N°20 :** Le spectre UV-Vis des lignines extraites de grignon d'olives.

Le spectre UV-Vis de notre lignine montre une absorbance maximale à 279 nm. Ce maximum varie suivant le type de lignine, il est attribuable au singulet de l'état des phénols. L'absorption de ce maximum dépend du taux d'unités phénoliques de type guaiacyle et de syringylpropane. La lignine extraite de grignon d'olives a une absorbance maximale de 0.708 pour  $\lambda_{\text{max}} = 279\text{nm}$ , Le déplacement de l'absorbance maximale vers une faible longueur d'onde indique une augmentation des unités phénoliques à haute symétrie moléculaire type syringylpropane. Mais notre valeur reste très proche de la valeur référence « autour de 280nm ».

### 3.4.2.2 Analyse structurale par FTIR

Le spectre FTIR de la lignine extraite est représenté dans la figure suivante :



**Figure N°21** : Le spectre FTIR des lignines extraites de grignon d'olives.

Les attributions des fonctions observées en infrarouge sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau N°10 : Principales bandes d'absorption de la lignine extraite de grignon d'olives.

Nombre d'onde	Attribution des fonctions observées ( $\nu$ = vibration d'élongation et $\delta$ = vibration de déformation)
3361 $\text{cm}^{-1}$	$\nu\text{OH}$ (liaison hydrogène) et $\nu\text{OH}$ acide carboxylique.
2936 $\text{cm}^{-1}$	$\nu\text{CH}$ alcane ( $\text{CH}_3$ , $\text{CH}_2$ et $\text{CH}$ ) et aromatique.
1652 $\text{cm}^{-1}$	$\nu\text{C}=\text{O}$ d'un carbonyle de type cétone.
1593, 1512 et 1423 $\text{cm}^{-1}$	$\nu\text{C}=\text{C}$ de cycles aromatiques.
1458 $\text{cm}^{-1}$	$\delta\text{CH}$ alcane ( $\text{CH}_3$ , $\text{CH}_2$ et $\text{CH}$ ).
1365 $\text{cm}^{-1}$	$\delta\text{OH}$ aliphatique et carboxylique.
1222 $\text{cm}^{-1}$	$\delta\text{O-H}$ alcool aromatique et $\nu\text{C-O-C}$ éther lié à un cycle aromatique
1118 et 1029 $\text{cm}^{-1}$	$\nu\text{C-O}$ méthoxy, éther et alcool aliphatique.
835 $\text{cm}^{-1}$	$\delta\text{CH}$ aromatique trisubstitué.

La large bande observée entre 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée aux groupements hydroxyles dans les structures phénoliques et aliphatiques.

Les bandes centrées autour de 2936  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations d'élongation des bandes  $\nu\text{CH}$  des chaînes alcanes et aromatiques.

Les 3 bandes centrées à 1593, 1512 et 1423  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées aux vibrations des liaisons  $\text{C}=\text{C}$  des unités aromatiques.

La bande située autour de 1365 $\text{cm}^{-1}$  est caractéristique de la déformation des liaisons  $\text{OH}$  aliphatique, phénolique et carboxylique.

La bande à 835 $\text{cm}^{-1}$  est attribuée à la vibration  $\nu\text{C-H}$  hors du plan qui appartient à un cycle aromatique trisubstitué.

### 3.5 Etude de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits (polyphénols totaux et lignine) a été exécutée par trois méthodes à savoir, le test de piégeage du radical libre DPPH, méthode de FRAP, et test de blanchissement par  $\beta$ -carotène.

### 3.5.1 Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante de nos extraits vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune pâle mesurable à 517 nm (photographie représentatif de ce changement de couleur est dans l'annexe 3). Le virage vers cette coloration et l'intensité de cette coloration de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire.

La valeur d'IC<sub>50</sub> représente la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres. L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits a été faite en comparant avec celle des antioxydants standards: l'acide ascorbique « Vitamine C », BHA et BHT. Les résultats obtenus sont regroupé dans les tableaux N°13,14 et 15 présentent dans l'annexe 4 suite d'une représentation graphique dressée dans les figures N°22, 23, 24.

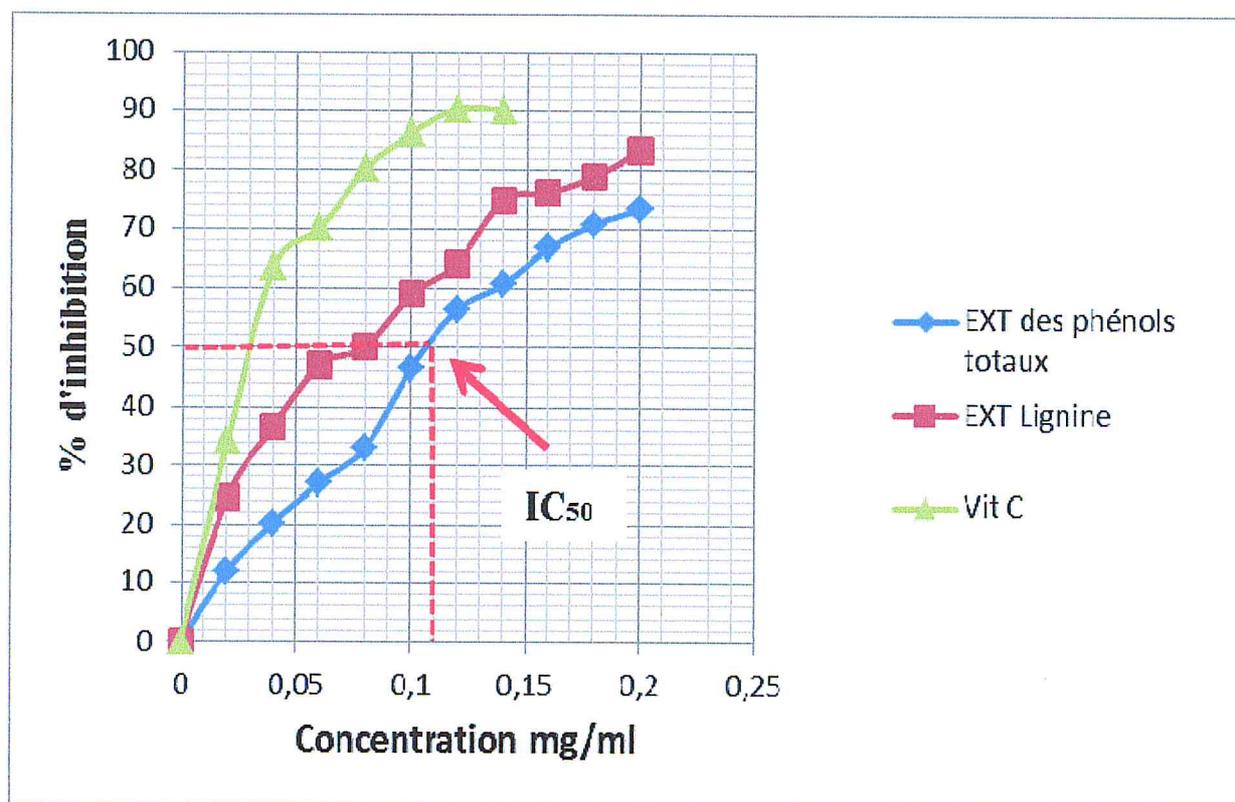
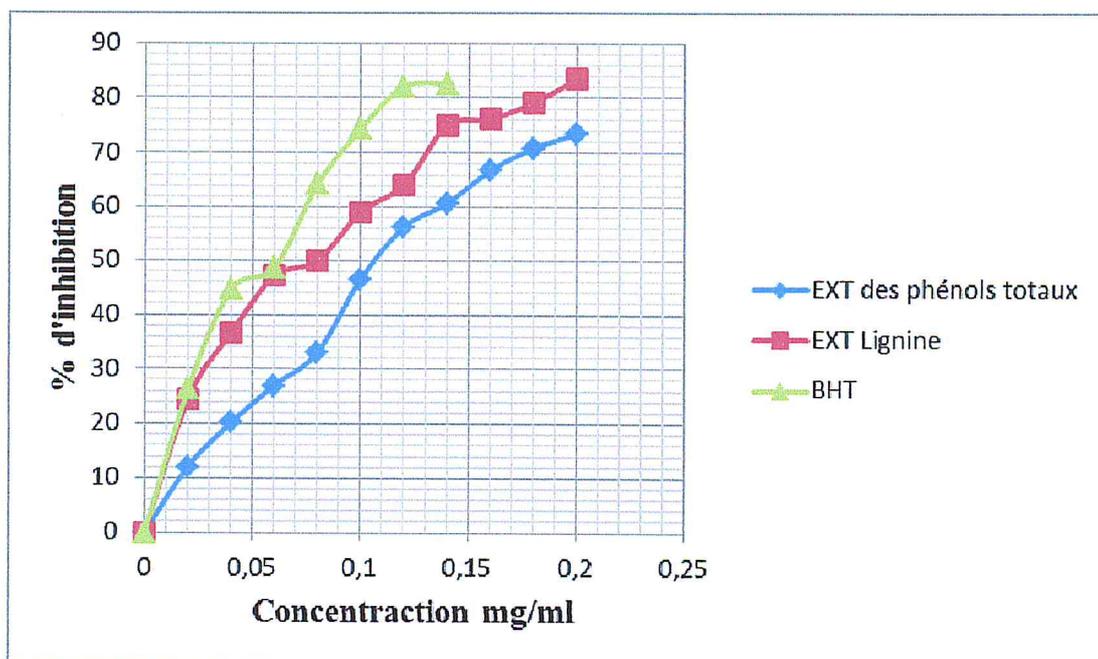
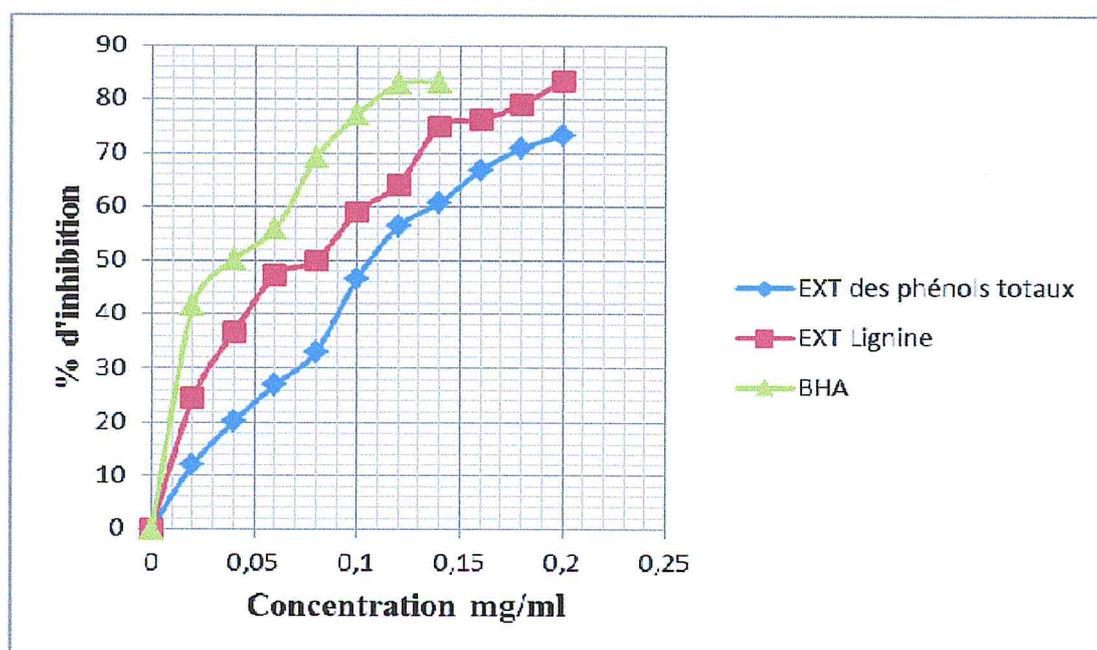


Figure N°22 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des extraits de grignon d'olives et de l'antioxydant standard Vit C.



**Figure N°23 :** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des extraits de grignon d'olives et de l'antioxydant standard BHT.



**Figure N°24 :** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des extraits de grignon d'olives et de l'antioxydant standard BHA.

La différence de l'activité est mise en évidence en utilisant ce paramètre  $IC_{50}$  qui est inversement proportionnel au potentiel d'anti radicalaire d'un antioxydant. Une valeur  $IC_{50}$  faible correspond à une activité élevée. Ces  $IC_{50}$  sont déterminées à partir des graphes (Fig 22,

23 et 24) dont l'abscisse représente la concentration et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage.

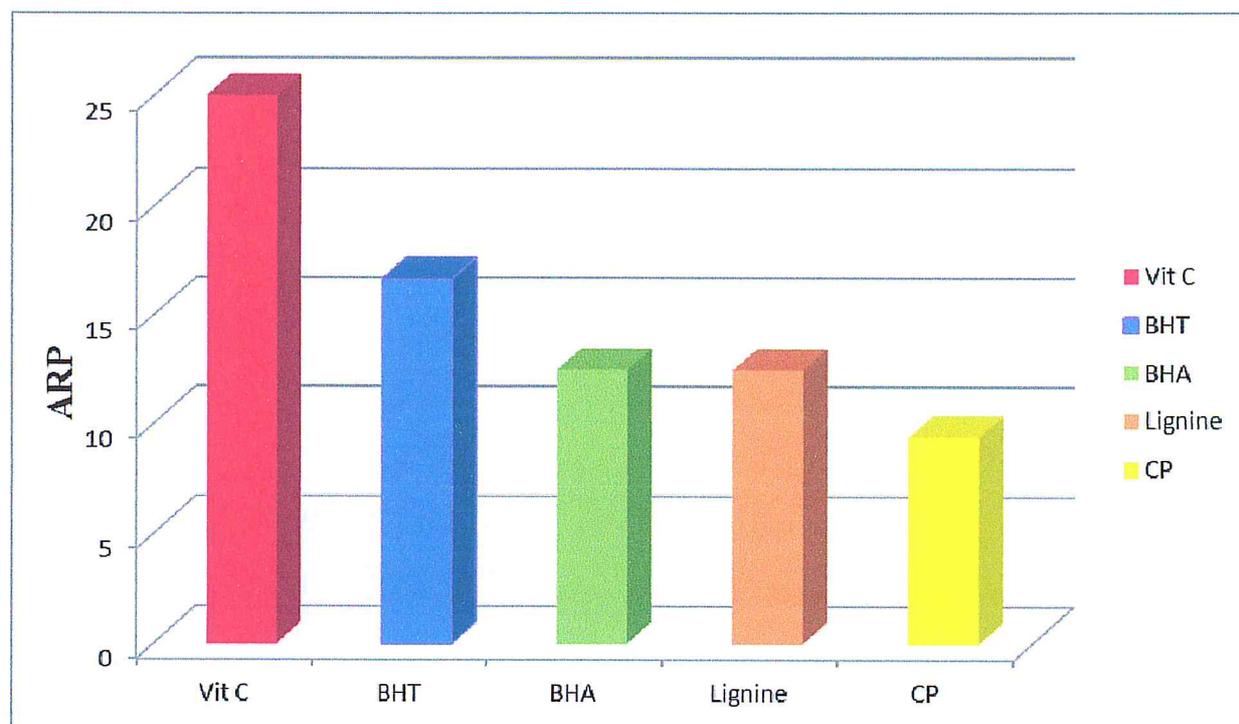
La lignine montre une meilleure activité ( $IC_{50} = 0.08 \pm 0.04$  mg/ml) par rapport l'extrait des phénols totaux ( $IC_{50} = 0.10 \pm 0.06$  mg/ml). Cette variation peut être due à la composition des extraits en molécules antioxydante, ces molécules pouvant être différents au niveau structural qu'au niveau propriétés chimiques.

La Vitamine C représente l'antioxydant standard le plus actif avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de 0.04 mg/ml, par contre les deux autres ont une valeur d' $IC_{50}$  de 0.06 et 0.08 mg/ml pour le BHT et BHA respectivement.

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire qui est inversement proportionnelle à  $IC_{50}$  ( $ARP = 1 / IC_{50}$ ) nous avons calculé ce paramètre et illustré graphiquement afin de comparer et justifier nos résultats.

**Tableau N°11 :** La variation les valeurs d' $IC_{50}$  et ARP pour chaque extrait et pour les antioxydants standards.

	Vit C	BHT	BHA	LIGNINE	PT
IC <sub>50</sub> (mg/ml)	0.04	0.06	0.08	0.08	0.10
ARP	25	16.66	12.5	12.5	10



**Figure N° 25 :** Représentation graphique des extraits et des antioxydants standards selon leurs ARP « test DPPH ».

Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH (Fig 25), plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Ces résultats montrent que l'extrait des phénols totaux et même de la lignine a un pouvoir antioxydant mais qui est nettement inférieur à celle de vitamine C et BHT. Par contre la lignine possède un ARP égal à celui de l'antioxydant standard BHA qui est légèrement supérieur à celle de l'extrait des composés phénoliques.

### 3.5.2 Test de potentiel réducteur « méthode de FRAP »

Par ce test, en évaluant la capacité d'un composé à transformer les ions de Fe<sup>3+</sup> à Fe<sup>2+</sup> (capacité de composé à donner des électrons). Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action antioxydante. Plus l'absorbance mesurée à 700nm augmente plus le pouvoir réducteur du composé est élevé.

Les figures montrent les densités optiques lues lors du test de la réduction de ferrocyanure de potassium par l'extrait des phénols, de la lignine, d'acide gallique et BHT pris comme étalons. Les résultats représentés les figures ci-après sont données dans les tableaux N°16,17 et 18 dans l'annexe 5.

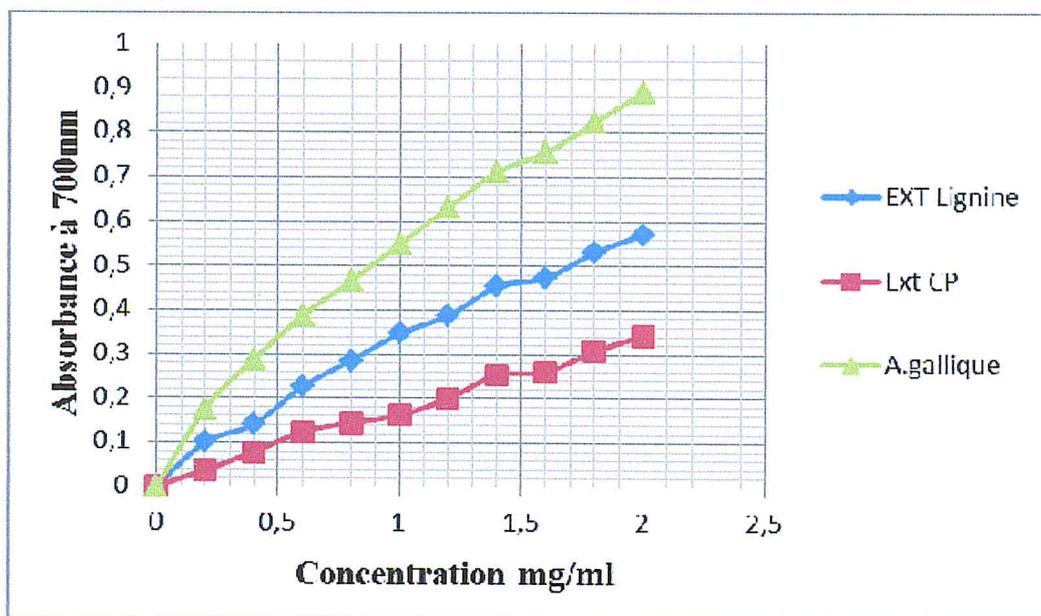


Figure N°26 : Pouvoir réducteur des extraits de grignon d’olives et de l’antioxydant standard l’acide gallique en fonction de différentes concentrations.

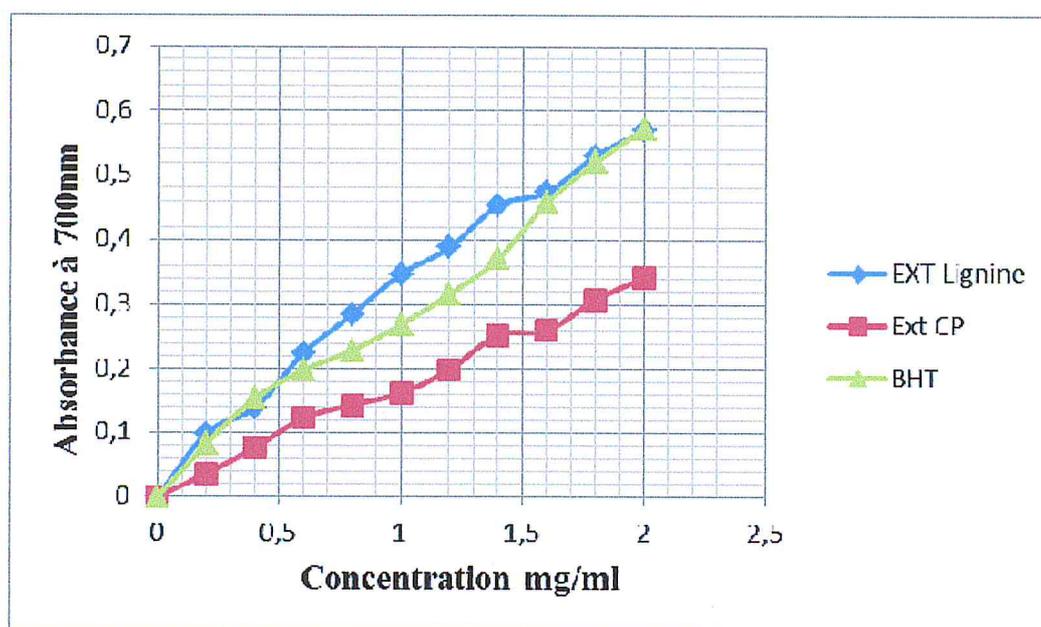


Figure N°27 : Pouvoir réducteur des extraits de grignon d’olives et de l’antioxydant standard BHT en fonction de différentes concentrations.

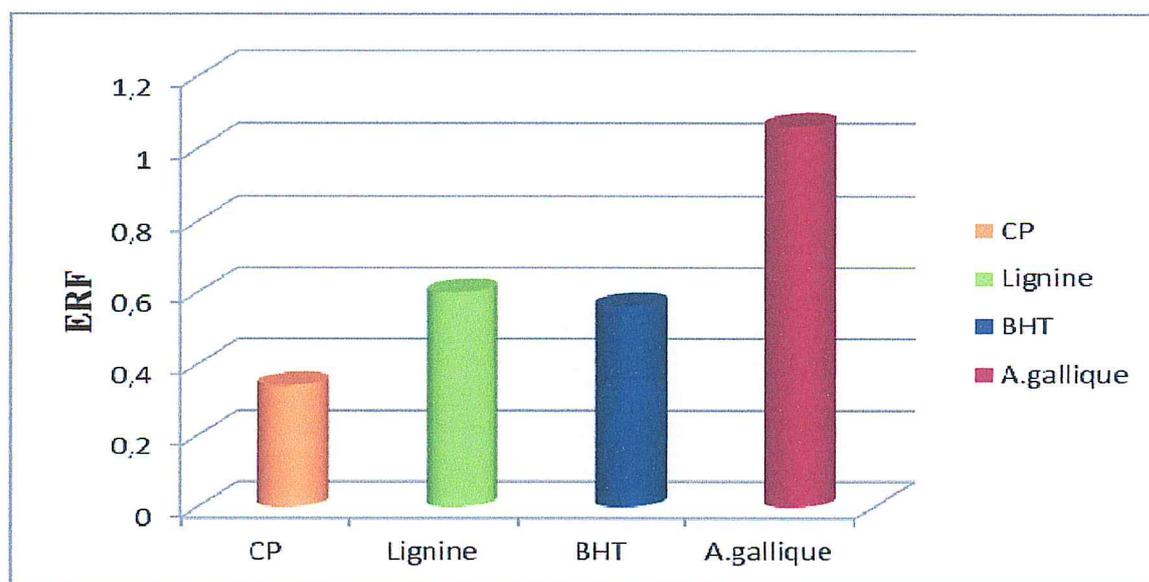
Le pouvoir réducteur de nos extraits et même les étalons évolue avec l’augmentation des concentrations. Visiblement l’acide gallique réduit plus rapidement et plus efficacement le ferrocyanure de potassium donc il représente une activité plus intéressante par rapport aux autres.

La comparaison de pouvoir réducteur des différentes substances, est exprimée par les valeurs des concentrations effectives à 50% ( $CE_{50}$ ) qui correspondent à la concentration des extraits nécessaire pour donner une absorbance égale 0,5 à 700 nm. Les valeurs  $CE_{50}$  des lignines et de l'extrait des phénols est respectivement de l'ordre de  $1.65 \pm 0.08$  mg/ml et  $2.90 \pm 0.06$  mg/ml.

L'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à la valeur  $CE_{50}$  ( $ERF=1/EC_{50}$ ). Les valeurs de  $CE_{50}$  et ERF des extraits, d'acide gallique et de BHT est rapportées dans le tableau suivant :

**Tableau N°12 :** Les valeurs de concentrations effectives à 50% et leurs efficacités de réduction de fer pour chaque extrait et étalon.

Extrait/Etalon	$EC_{50}$ (mg/ml)	ERF
<b>Composés phénoliques</b>	2.9	0.34
<b>Lignine</b>	1.65	0.60
<b>Acide gallique</b>	0.94	1.06
<b>BHT</b>	1.78	0.56



**Figure N°28 :** Représentation graphique de l'efficacité de réduction de fer « ERF » pour chaque extrait et étalon standard.

Une présentation graphique statistique (Fig 31) a été réalisée dans le but de concrétiser et interpréter les différences existant entre les résultats obtenus. ERF paramètre étant introduit

pour comparer la rapidité et l'efficacité des composés a cédé des électrons se montre indispensable pour une comparaison des capacités réductrices.

Il apparait clairement que l'extrait de la lignine présente un pouvoir réducteur plus important (le potentiel antioxydant le plus fort) que l'extrait des phénols taux et même de l'antioxydant standard BHT. Ces résultats pourront expliqués que l'extrait de la lignine renferme des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort, tandis que l'extrait des polyphénols totaux qui est montré un pouvoir réducteur faible peut renfermer des substances à potentiel réducteur donneur d'électron aussi moins fort.

### 3.5.3 Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits, nous avons utilisé la méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène, Un suivie de la réaction de l'oxydation du  $\beta$ -carotène en présence des extraits et ou des témoins (négatif et positif), a été effectué en mesurant l'intensité de la couleur de  $\beta$ -carotène à une longueur d'onde de 470nm. La figure N°33 présente le tracé de la variation d'absorbance en fonction du temps (les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau N°19 dans l'annexe 6). À partir de cette dernière on a remarqué que l'absorbance du mélange diminue vers une valeur plus basse, mais cette diminution reste moins rapide par rapport à celle du témoin positif BHT et devient sable dans un temps prolongé pour l'extraits de la lignine, et dans un temps assez prolongé pour l'extrait des composés phénoliques, ainsi la couleur de la solution change de l'orange au blanc.

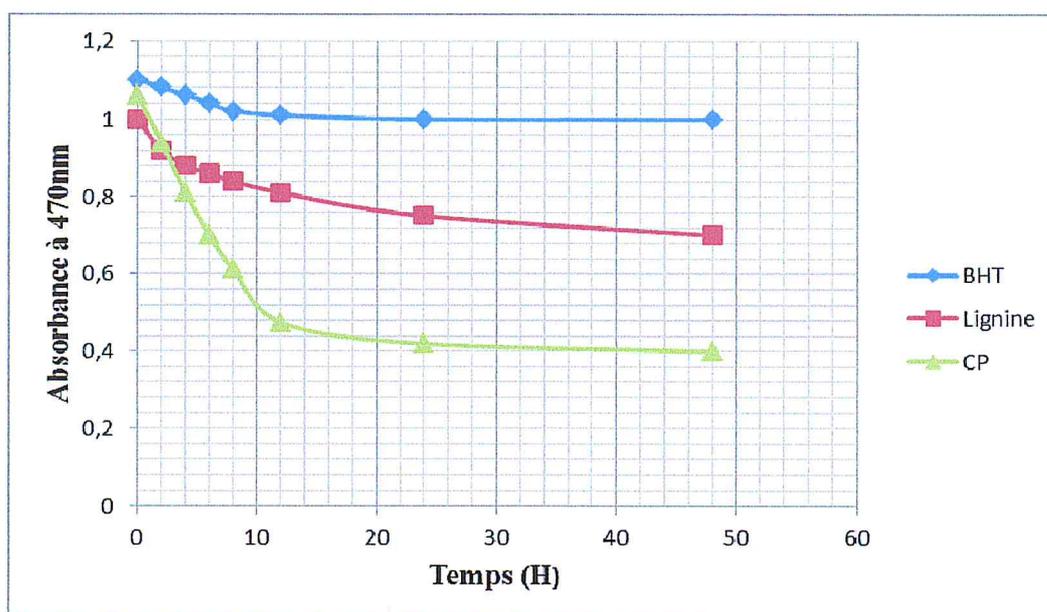
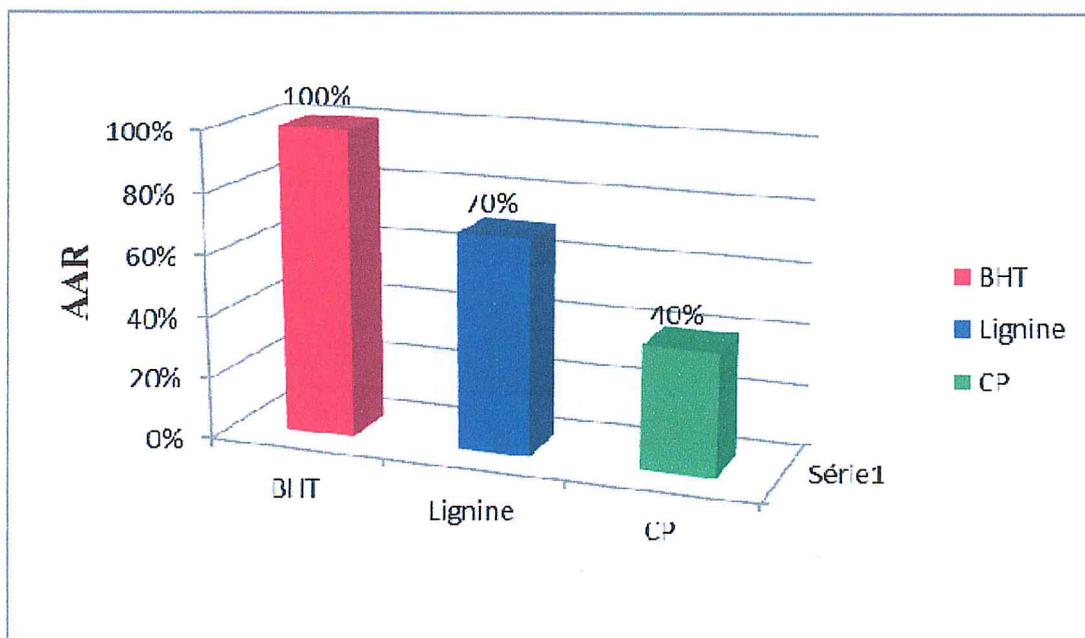


Figure N°29 : Cinétique de blanchissement du  $\beta$ - carotène à 470 nm des extraits de grignon d'olives et du témoin positif BHT.

Les activités antioxydantes relatives « AAR » des extraits et du témoin sont calculées suivant la relation citée avant et représenté graphiquement dans la figure 34. Ces valeurs facilitent les comparaisons de l'activité relatives des différents extraits et du témoin positif BHT.



**Figure N°30 :** Représentation graphique des activités anti-oxydantes relatives des extraits et du l'antioxydant standard BHT.

### Conclusion

L'industrie oléicole en Algérie produit annuellement des quantités énormes de grignons d'olives, ces quantités sont appelées à s'accroître compte-tenu des investissements engagés et le potentiel oléicole que le pays possède ce qui pourrait engendrer des impacts négatifs sur l'environnement. Ce travail a pour objectif la valorisation biotechnologique sur l'un des sous-produits oléicoles à partir de sa composition chimique qui s'avère très intéressante au plan biologique.

Notre travail est porté en premier lieu sur l'extraction par solvant des composés phénoliques et des lignines à partir de grignon d'olives et leurs identifications par des méthodes physico-chimiques ainsi que des techniques spectrales.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des composés phénoliques en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence de ces composés avec une teneur de 7.5 $\mu$ g EAG/ mg d'extrait. De même, la teneur des lignines extraites par le procédé CIMV était de l'ordre de 7,18  $\pm$  0.22%. Cette valeur est extrêmement faible par rapport à ceux trouvées dans la littérature. Cette différence peut être attribuée à plusieurs facteurs, en citant la variété, le stade de maturité des olives traitées, les conditions climatiques ainsi que les procédés d'extraction de l'huile d'olives.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus précédemment a été réalisée par le biais de divers tests : méthode au DPPH, méthode de FRAP et méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène.

- Le test de piégeage du radical libre DPPH a été réalisé en comparant les IC<sub>50</sub> des différents extraits testés par rapport aux antioxydants standards: l'acide ascorbique, BHA et BHT. La lignine présente une meilleure activité (IC<sub>50</sub>= 0.08 $\pm$ 0.04 mg/ml) par rapport à l'extrait des phénols totaux (IC<sub>50</sub>= 0.10 $\pm$ 0.06 mg/ml) donc, tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH mais qui est nettement inférieur à celle de vitamine C et égale à celui de l'antioxydant standard BHA.
- Le test de potentiel réducteur « méthode de FRAP » a montré que les extraits de grignon d'olives étudiés avaient une capacité de réduire le fer. A la lumière des résultats obtenus, il apparaît clairement que l'extrait de la lignine présentait un pouvoir

réducteur plus important que l'extrait phénolique et celui de l'antioxydant standard BHT avec  $CE_{50}=1.65\pm 0.08$  mg/ml.

- Le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène a révélé que l'oxydation du  $\beta$ -carotène est importante par rapport à l'extrait des lignines avec une activité antioxydante relative de 70%.

L'ensemble de ces résultats nous permettent de conclure :

- ✓ L'extrait des lignines possède une meilleure capacité réductrice par rapport à l'extrait des phénols totaux.
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante montre que le grignon d'olives présente des propriétés antioxydantes moyennement considérables.

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active.

A la suite de cette étude, il serait donc intéressant d'étendre profondément l'éventail des tests antioxydants ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les molécules responsables des différentes activités biologiques de ce résidu.

### Références bibliographiques

- [1] P. VILLA, « La culture de l'olivier », Ed. Vecchi, 143 p, Paris, 2003.
- [2] E. CHEIKH, « Effet de différents modes de stockage sur la stabilité des qualités nutritionnelles et microbiologiques du grignon d'olive durant 3 mois de stockage », Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-Senia, 2010.
- [3] C. BELAID, M. KALLEL, et B. ELLEUCH, « Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huilerie d'olive (margine) », Déchets sciences et techniques, 27, 30-34, 2002.
- [4] A. NEFZAOU, « Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits », L'économie de l'olivier, 18, 153-173, 1988.
- [5] G. BROUSSE, B. LOUSSERT, « L'olivier », Ed. Maisonneuve et la rose, 447 p, Paris, 1978.
- [6] M. AMORTTI, G. COMET, « L'olivier », Ed. Edisud, 173 p, France, 1985.
- [7] J-M. POLESE, « La culture des oliviers », Ed. Artémis, 95 p, Paris, 2005.
- [8] H. CHIMI, « Sous-produits de la transformation des olives : possibilités de valorisations et de traitement des margines », Olivea, 13, 11-30, 1997.
- [9] M. KERBOUA, « Huile d'olive en Algérie : production et consommation à l'horizon de 2010 », Olivea, 99, 56-58, 2003.
- [10] N. BENRACHOU, « Etude des caractéristiques et de la composition biochimique d'huile d'olive issue de trois cultivars de l'Est algérien », Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, 2013.
- [11] M. KERBOUA, « Huile d'olive en Algérie : production et consommation à l'horizon de 2010 », revue olivae, 99, 56-58, 2003.
- [12] L. DI-GIOVACCHINO, « L'influence des systèmes d'extraction sur la qualité de l'huile d'olive », Olivea, 63, 52-63, 1996.
- [13] A. NEFZAOU, « Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin méditerranéen », FAO, 18, 43-50, 1984.

- [14] A. NEFZAOUI, «Valorisation des sous-produits de l'olivier», Options Méditerranéennes, 16, 101-108, 1991.
- [15] S. DJADOUN, « Influence de l'hexane acidifié sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive assisté par micro-ondes », Mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 2010.
- [16] A. NEFZAOUI, « Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits », Options Méditerranéennes, 12, 153-173, 1988.
- [17] H. LAKHTAR, « Culture du lentinula edodes(Berk) pegler sur résidu oléicoles en fermentation en milieu solide: transformation des polyphénols des margines », Thèse de doctorat, École doctorale des sciences de l'environnement, 2009.
- [18] A. CHOUCHENE, « Etude expérimentale et théorique des procédés de valorisation de sous-produit oléicoles par voie thermique et physico-chimique », Thèse de doctorat, École nationale d'ingénieurs de Monastir et de l'Université de haute-Alsace, 2010.
- [19] F. BOUDISSA, « Influence des radiations micro-ondes sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive imprègne de margine », mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 2011.
- [20] Z. MENNANE, S. TADA, I. AKI, M. FAID, S. HASSANI, S. SALMAOUI « Caractérisation physico-chimique et microbiologique des grignons d'olive de 26 huileries traditionnelles de la région de Beni Mellal (Maroc) », Les technologies de laboratoire, 5, 19 p, 2010.
- [21] H. KADI and H. FELLAG, « Modelling of extraction from olive foot cake using hexane from olive cake», American oil chemist's society", 4, 391-396, 2001.
- [22] A. YOURB, « Valorisation des sous-produits », L'investisseur agricole, 19, 17-18, 1997.
- [23] A. NEFZAOUI, « Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie ». FAO, 44, 139-143, 1984.
- [24] M. HAMADI, «Anaerobic Digestion of Olive Mill Wastewaters», Process Biochemistry, 31, 105-111, 1996.

- [25] G. MARTINEZ, T. ROBERT, C. BACHMANN, J. WILLIAMS, B. ANDREA, and J. EDYVEAN, «Olive oil waste as a biosorbent for heavy metals», *International Biodeterioration and Biodegradation*, 58, 231-238, 2006.
- [26] S. HEMSAS, « Contribution à l'étude de la décoloration des eaux sur grignons d'olives valorise Etude dynamique », Mémoire de magister, Université M'hamed Bougara Boumerdés, 2008.
- [27] S. DJADOUF, A. TAHAKOURT, N. CHELOUAH et D. MERABET, « Etudes d'influence des ajouts (grignon d'olive et foin) sur les caractéristiques physico-mécaniques de la brique de terre cuite », *Communication science & technologies*, 10, 1-5, 2011.
- [28] S. RUSSAS, I. PERRAUDE-GAIME, H. LAKHTAR, F. AOUIDI, Y. LABROUSSE, N. BELKASEM, M. MACARIE, J. ARTAUD, « Valorisation biotechnologique des sous-produits de l'olivier par Fermentation en Milieu Solide », *Olivebioteq*, 12, 293-298, 2009.
- [29] S. MAHMOUDI, M. KHALI et N. MAHMOUDI, « Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) », *Nature & Technologie*, 9, 35-40, 2013.
- [30] F. ZAIDI, N. HASSISSENE, N. BOUBEKEUR, A. BOUAICHE, A. BOUABDELLAH, J-F. GRONGNET et BELLEL, « Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants », *Revue Méd. Vét.*, 2, 67-73, 2009.
- [31] HARBONE, J.B, «Introduction to Ecological Biochemistry», Ed. Academic Press, 318 p, London, 1993.
- [32] J. BRUNETON, « Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales », Ed. Lavoisier Techniques & Documentation, 1268 p, Paris, 1993.
- [33] E. MIDDLETON, C. KANDASWAMI, T-C. THEOHARIDES, "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer", *Pharmacol Rev*, 152, 673-839, 2000.
- [34] N. BELYAGOUBI, « Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien », Mémoire de magister, Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen, 2012.

- [35] A. BESSAS, « Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien », Mémoire de magister, Université Djillali Liabes -Sidi Bel Abbes, 2008.
- [36] J. Macheix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand, « Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique », Ed. Lavoisier, 192 p, Italie, 2005.
- [37] V. WILEY and C. WEINHEIM, “Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids”, *Separation science*, 33, 26 -295, 2011.
- [38] Harborne. J.B, “General procedur and measurement of total phenolics. In: plant phenolics. Methods in lant biochemistry”, Ed. Academic press, 281 p, London, 1989.
- [39] Harborne, J.B, “Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis”, Ed. Hardcover, 302 p, London, 1998.
- [40] N. Ojeil, Y. El Haj, P. Bou Mouncef, J. Rizk et G. Richard, « Identification et caractérisation de composés phénoliques extrait de raisin château ksara », *Lebanese Science*, 11, 15-18, 2010.
- [41] N. BENHAMMOU, « Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien », Thèse de doctorat, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, 2001.
- [42] A. Buranov, G. Mazza, “Lignin in straw and herbaceous crops”, *Industrial Crops*, 28, 237-259, 2008.
- [43] S. KHENNOUF, “Gastropropectives of polyphenolic compounds from *Quercus Suber* in rats and mice”, *Food.Chem*, 16, 64-7, 2004.
- [44] J. WERTZ, O. BEDUE and J-P. MERCIER, “Cellulose Science and Technology”, Ed. Epfl Press, 364 p, 2010.
- [45] K. FREUDENBERG, “Constitution and biosynthesis of lignin”, *Biochemistry and Biophysics*, 2, 47-122, 1968.

- [46] R. SAFOU-TCHIAMA, “Caractérisation physico-chimiques Stabilité supramoléculaire et Réactivité chimique de quelques essence tropicale” Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, 2005.
- [47] R. LAROUCHE, “Extraction, Caractérisation et biotransformation de la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche”, Mémoire de magister, Université du Québec, 1993.
- [48] K. Freudenberg, “Constitution and biosynthesis of lignin”, *Biochemistry and Biophysics*, 2, 47-122, 1968.
- [49] O-W. GORDON, E. PLATTNER, F. Doppenberg, “Production of pulp by the soda-anthraquinone process (SAP) with recovery of the cooking chemicals”, *Cleaner Production*, 5, 179-179, 1997.
- [50] R. GOSSELINK, “Valorization of Lignin Resulting from Biorefineries, Agrotechnology”, *Food Sciences*, 32, 15-17, 2008.
- [51] E. EMUURINEN, “Organosolv pulping, a review and distillation study related to peroxyacid pulping”, These de doctorat, University of Oulu -Finland, 2000.
- [52] T. MCDONOUGH, “The chemistry of organosolv delignification”, Ed. Ipst Technical, 455 p, 1992.
- [53] G. DELMAS, “La bio lignine: Structure et applications à l'élaboration de résine époxy”, Thèse de doctorat, Université de Toulouse, 2011.
- [54] H. Nadji, H. Diouf, A. Benaboura, Y. Bedard, B. Riedl, H. Stevanovic, “Comparative study of lignins isolated from alfa grass”, *Bioresource Technology*, 100, 3585-3592, 2009.
- [55] R-H. Hwang, “A lignification mechanism”, *Theoretical Biology*, 116, 21-44, 1985.
- [56] R. HARDIS, J-B. JESSOP, F-E. PETERS, M. KESSLER, “Cure Kinetics Characterization and Monitoring of an Epoxy Resin for Thick Composite Structures, Composites Part A: Applied Science and Manufacturing”, *Doi*, 49, 100-108, 2013.
- [57] I. BRODIN, *Chemical Properties and Thermal Behaviour of Kraft Lignins*, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, 2009

- [58] M. VASSILIKI, T. PAPOTI, Z. TSIMIDOU, "Looking through the qualities of a fluorimetric assay for the total phenol content estimation in virgin olive oil, olive fruit or leaf polar extract", *Food Chemistry*, 112, 246-252, 2009.
- [59] R. HEBBAB, « Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margine d'olive de la variété Chamlal : evaluation de l'activité avant et après déglycosylation », Mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 2014.
- [60] J. BLOUIN, L. LORCA, F-R. MONTREAU, J-H. DUFOUR, « Etude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de FolinCiocalteu », *Connaissance de la vigne et du vin*, 6, 405-413, 1972.
- [61] J. BLOUIN, L. LORCA, F. MONTREAU, H. DUFOUR, « Etude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu », *Connaissance de la vigne et du vin*, 6, 405-413, 1972.
- [62] Y. Mauricio, B. Matsuhira, C. Nunez, P. Shaobo, A. Hubbell, B. Sannigrahi, J. Arthur., B. Ragauskas, "Physicochemical characterization of ethanol organosolv lignin (EOL) from *Eucalyptus globulus*: Effect of extraction conditions on the molecular structure", *Polymer Degradation and Stability*, 110, 184-194, 2014.
- [63] J-L. WERTZ, « Bioraffineries de deuxième génération utilisant la voie biochimique », *ValBiom-Gembloux Agro-Bio Tech*, 8, 4-22, 2013.
- [64] M. AMMAR, R. KHIARI, B. BERRIMA, M. BELGASEM and E. ELALOUI, "Isolation and characterization of lignin from *stipa tenacissima* l. and *phoenix dactylifera*", *Cellulose Chemistry and Technology*, 48, 255-263, 2014.
- [65] B. BENJELLOUN MLAYAH, D. DELMAS, D. AVIGNON, « Installation for implementing a method for producing paper pulp, lignins and sugars and production method using such an installation », *French Patent*, 20, 75-82, 2006.
- [66] M. DELMA, « Vegetal Refining and Agrochemistry », *Chemical Engineering and Technology*, 31, 792-797, 2008.
- [67] H. BENSON, « Physique: 3 Ondes optique et physique moderne de Boeck coll », Ed. Boeck Supérieur, 544 p, 2009.

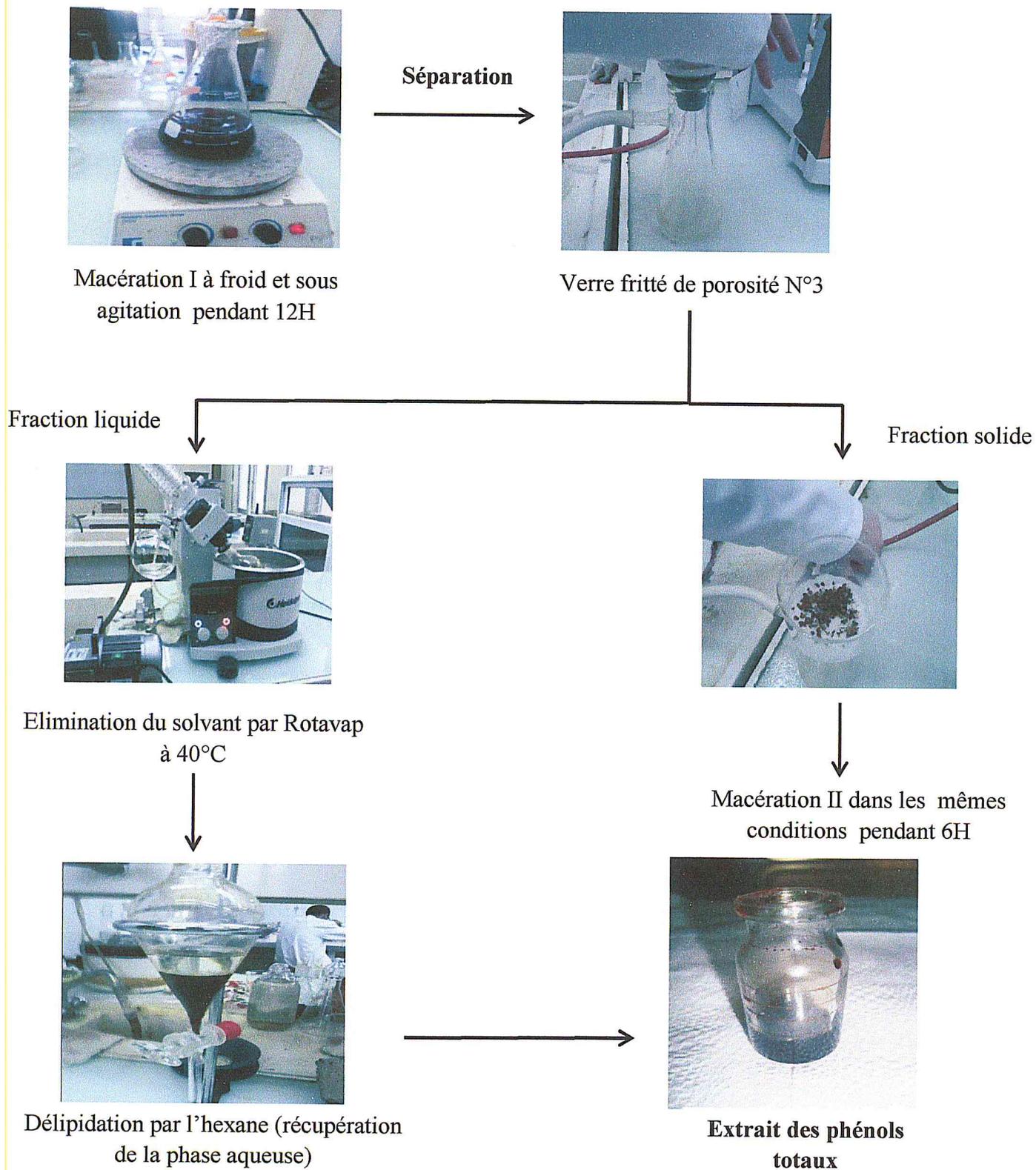
- [68] P. FLEURY et P. MATHIEU, « Physique générale et expérimentale, Electrostatique, Courants continus, Magnétisme », Ed. Eyrolles, 265 p, Paris, 1967.
- [69] B. GRAMBOW, N. MICHEL, « Solubilité des solides dans l'eau : propriété de surface ou du solide », Journées Scientifiques de Marcoule, 2006.
- [70] P. VAN, K. MORREEL, J. RALPH, W. BOERJAN, R. MERKS, "Modeling lignin polymerization simulation model of dehydrogenatin», Polymers, 153, 1332-134, 2010.
- [71] C. PASTO, J. JOHNSON and M. MILLER, "Experiments and Techniques in Organic Chemistry", Prentice Hall, 1992.
- [72] D. FENGEL, G. WEGENER, W. GRUYTER, "Ultrastructure, reactions", 613 p, Berlin, 1984.
- [73] C. POPOVICI, I. SAYKOVA, I. TYLKOWSKI, « Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH », Génie industriel, 4, 25-39, 2009.
- [74] S. KHOUDALI, D. BENMESSAOUD, A. ESSAQUI, M. ZERTOUBI, M. MAZZI, M. BENAÏSSA, « Etude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc", 5, 887-898, 2014.
- [75] S. SKHOUDALI, D. BENMESSAOUD, A. ESSAQUI, M. ZERTOUBI, AZZI. M, M. BENAÏSSA, « Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L) du Maroc », Mater, Environ, 5, 887-898, 2014.
- [76] H. HARZ ALLAH, "Antioxydant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts", Medicinal plants research, 4, 2048-2053, 2010.
- [77] A. BOUGATEF, M. HADJI, R. BALTI, I. LASSOUED, Y. TRIKI-ELLOUZ, M. NASRI, "Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases", Food Chemistry, 114, 1198-1205, 2010.
- [78] B. TEPE, M. SOKMEN, H. AKPULAT and A. SOKMEN., "Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey", Food Chem, 685-689, 2006.
- [79] M. BOUDJOUREF, « Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne », Mémoire de magister, Université Ferhat Abbes Sétif, 2011.
- [80] D. HUANG, L. PRIOR, "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", Agricultural & Food Chemistry, 53, 1841-1856, 2005.

[81] N. BOIZOT, P. CHARPENTIER, « Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier », Techniques de l'Inra, 6, 79-82, 2006.

[82] J. LORA, G. GLASSER, « Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials », Polym, 10, 39-48, 2002.

## Annexe 1

- Les étapes d'extraction des phénols :



**Figure N°31 : Photographies représentatives de différentes étapes d'extraction des phénols.**

## Annexe 2

- **Préparation des solutions étudiées dans le dosage des composés phénoliques par Calorimétrie « Follin Ciocalteu »**

➤ Préparation de la solution mère:

Puisque notre droite d'étalonnage a été effectuée par l'acide gallique, une masse de 20mg de ce acide a été dissout dans 10ml de solvant (Méthanol/Eau 50/50%) afin d'obtenir une concentration de 2mg/ml. Pour avoir une solution mère de concentration 0.1mg/ml ; un volume de 5ml de la solution préparer précédemment a été prélevé et diluer dans 100ml de même solvant.

➤ Préparation des solutions filles:

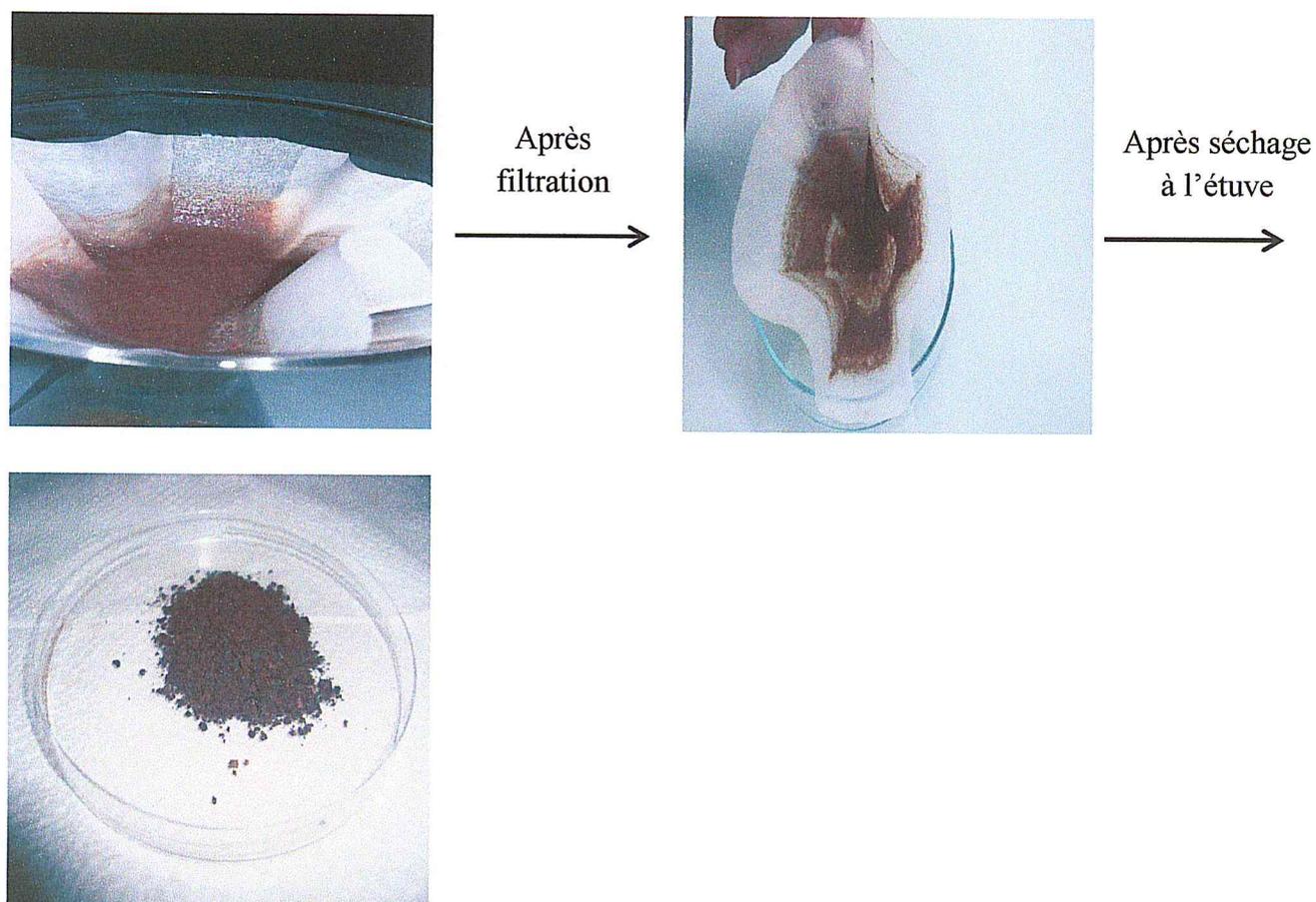
Afin de préparer les différentes concentrations de la gamme d'étalonnage nous avons utilisé la relation:

$$C_{\text{sol mère}} \cdot V_{\text{prélevé}} = C_{\text{sol fille}} \cdot V_{\text{sol fille}}$$

- Prélever 1 ml de solution mère et leur ajouter 9ml de solvant → 0.01mg/ml ;
- Prélever 2 ml de solution mère et leur ajouter 8ml de solvant → 0.02mg/ml ;
- Prélever 3 ml de solution mère et leur ajouter 7ml de solvant → 0.03mg/ml ;
- Prélever 4 ml de solution mère et leur ajouter 6ml de solvant → 0.04mg/ml ;
- Prélever 5 ml de solution mère et leur ajouter 5ml de solvant → 0.05mg/ml ;
- Prélever 6 ml de solution mère et leur ajouter 4ml de solvant → 0.06mg/ml.

## Annexe 3

- **Extrait des lignines par le procédé CIMV**

**Les lignines**

**Figure N°32 :** Photographies représentatives des lignines extraites par le procédé CIMV avant et après séchage.

## Annexe 4

### • Test de piégeage du radical libre DPPH

#### ➤ Préparation de la solution de DPPH:

Une solution de DPPH de concentration de 0.04mg/ml a été préparée à partir de dissolution de 4mg de poudre de DPPH dans 100ml de méthanol. Nous avons couvrir la fiole par l'aluminium afin d'éviter la dégradation de cette solution.

#### ➤ Préparation de la solution mère :

Nous avons préparé une solution mère de 0.5mg/ml. Une masse de 5mg a été dissout dans 10 ml de solvant, dans le cas d'extrait des phénols nous avons utilisé un mélange de solvant Méthanol /Eau avec une proportion de 50/50 v/v et pour la lignine Dioxane/Eau de 75/25 v/v.

#### ➤ Préparation des solutions filles:

- Prélever 40 µl de solution mère et leur ajouter 0.96ml de solvant → 0.02mg/ml ;
- Prélever 80 µl de solution mère et leur ajouter 0.92ml de solvant → 0.04 mg/ml ;
- Prélever 120 µl de solution mère et leur ajouter 0.88ml de solvant → 0.06mg/ml ;
- Prélever 160 µl de solution mère et leur ajouter 0.84ml de solvant → 0.08mg/ml ;
- Prélever 200 µl de solution mère et leur ajouter 0.80ml de solvant → 0.10mg/ml ;
- Prélever 240 µl de solution mère et leur ajouter 0.76ml de solvant → 0.12mg/ml ;
- Prélever 280 µl de solution mère et leur ajouter 0.72ml de solvant → 0.14mg/ml ;
- Prélever 320 µl de solution mère et leur ajouter 0.68ml de solvant → 0.16mg/ml ;
- Prélever 360 µl de solution mère et leur ajouter 0.64ml de solvant → 0.18mg/ml ;
- Prélever 400 µl de solution mère et leur ajouter 0.60ml de solvant → 0.20mg/ml.

Les tableaux suivants résumant les résultats de test de piégeage du radical libre DPPH des extraits étudiés (extrait des composés phénoliques et les lignines) et des antioxydants standards (vitamine C, BHA et BHT).

**Tableau N°13 :** La variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des composés phénoliques.

C (mg/ml)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20
Abs à 517nm	0.479	0.435	0.398	0.365	0.291	0.238	0.214	0.181	0.159	0.145
I (%)	12.11	20.18	26.97	33.03	46.60	56.33	60.73	66.78	70.82	73.39

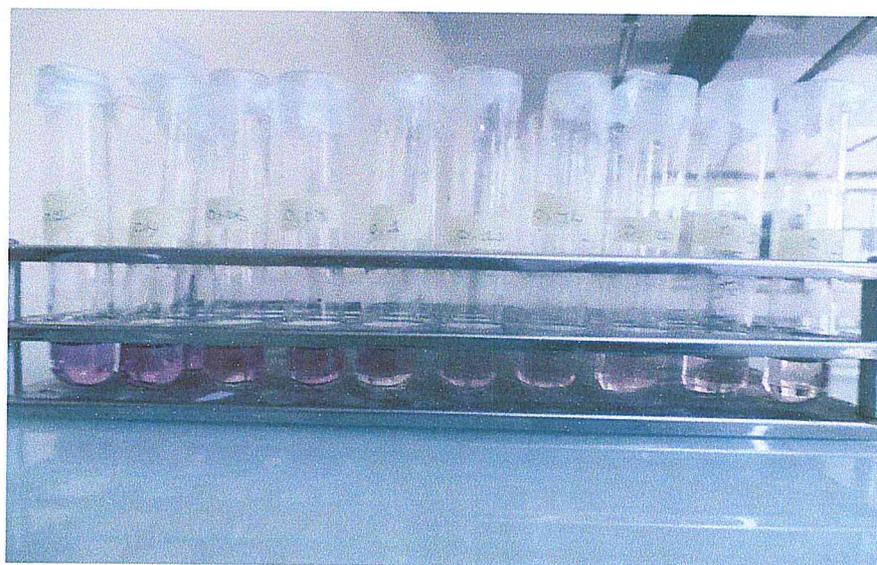
**Tableau N° 14 :** La variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des lignines extraites.

C (mg/ml)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20
Abs à 517nm	0.447	0.375	0.313	0.296	0.242	0.212	0.148	0.141	0.124	0.098
I (%)	24.5	36.65	47.13	50.00	59.12	64.19	75.00	76.18	79.05	83.45

Avec : Abs<sub>blan</sub> (ext phénols) = 0545 / Abs<sub>blan</sub> (ext lignines) = 0592.

**Tableau N°15** : La variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des antioxydants standards.

Concentration mg/ml	Absorbance			% d'inhibition		
	Vit C	BHA	BHT	Vit C	BHA	BHT
0.02	0.375	0.332	0.420	34.2	41.7	26.3
0.06	0.207	0.284	0.315	63.7	50.1	44.7
0.08	0.107	0.251	0.293	70.1	55.9	48.6
0.2	0.112	0.176	0.203	80.3	69.1	64.3
0.3	0.078	0.130	0.145	86.3	77.1	74.4
0.5	0.055	0.098	0.102	90.3	82.8	82.1
0.6	0.056	0.096	0.099	90.1	83.1	82.6



**Figure N°33** : Photographie représentative du changement de couleur de violette à jaune pâle de la gamme étudiée au test de DPPH.

## Annexe 5

- **Test du pouvoir réducteur (Méthode de FRAP)**

- Préparation de solution mère:

Afin de préparer la solution mère nous avons dissout 25mg de chaque extrait dans 10ml de solvant (les mêmes mélanges de solvant utilisé dans le test précédent) pour avoir une concentration de 5mg/ml.

- Préparation des solutions à différentes concentration « solutions filles » :

- Prélever 20  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.48ml de solvant  $\rightarrow$  0.2mg/ml ;
    - prélever 40  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.46ml de solvant  $\rightarrow$  0.4mg/ml ;
    - Prélever 60  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.44ml de solvant  $\rightarrow$  0.6mg/ml ;
    - Prélever 80  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.42ml de solvant  $\rightarrow$  0.8mg/ml ;
    - Prélever 100  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.40ml de solvant  $\rightarrow$  1mg/ml ;
    - Prélever 120  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.38ml de solvant  $\rightarrow$  1.2mg/ml ;
    - Prélever 140  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.36ml de solvant  $\rightarrow$  1.4mg/ml ;
    - Prélever 160  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.34ml de solvant  $\rightarrow$  1.6mg/ml ;
    - Prélever 180  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.32ml de solvant  $\rightarrow$  1.8mg/ml ;
    - Prélever 200  $\mu$ l de solution mère et leur ajouter 0.30ml de solvant  $\rightarrow$  2mg/ml.

Les résultats de ce test sont donnés dans les tableaux ci-après :

**Tableau N°16 :** Les résultats de test du pouvoir réducteur des lignines extraites.

C (mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2
Abs	0	0.099	0.139	0.225	0.285	0.347	0.388	0.454	0.474	0.531	0.571

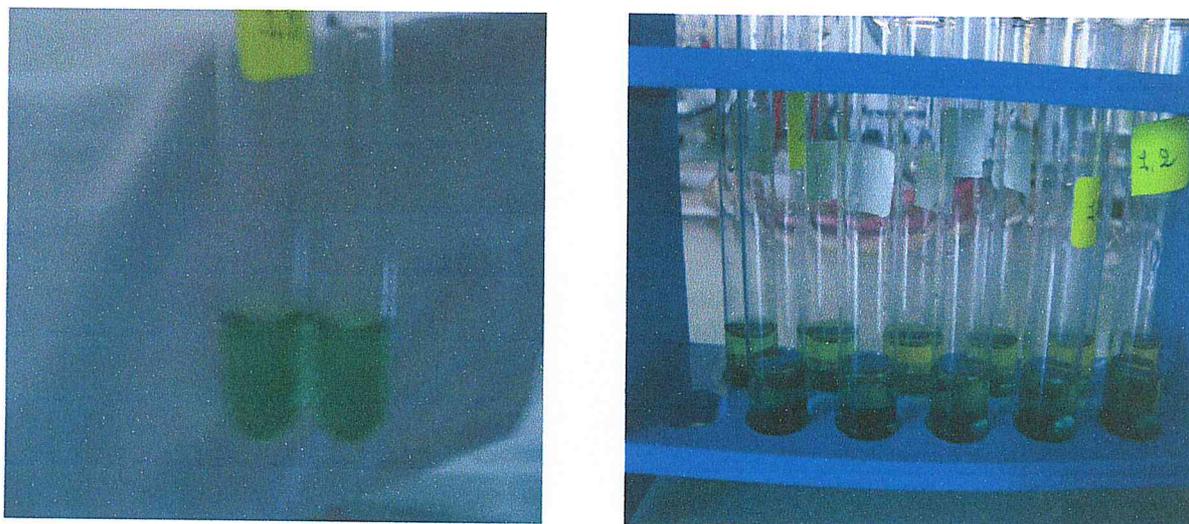
**Tableau N°17 :** Les résultats de test du pouvoir réducteur d'extrait des phénols totaux.

C (mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2
Abs	0	0.036	0.077	0.123	0.144	0.162	0.199	0.253	0.260	0.308	0.342

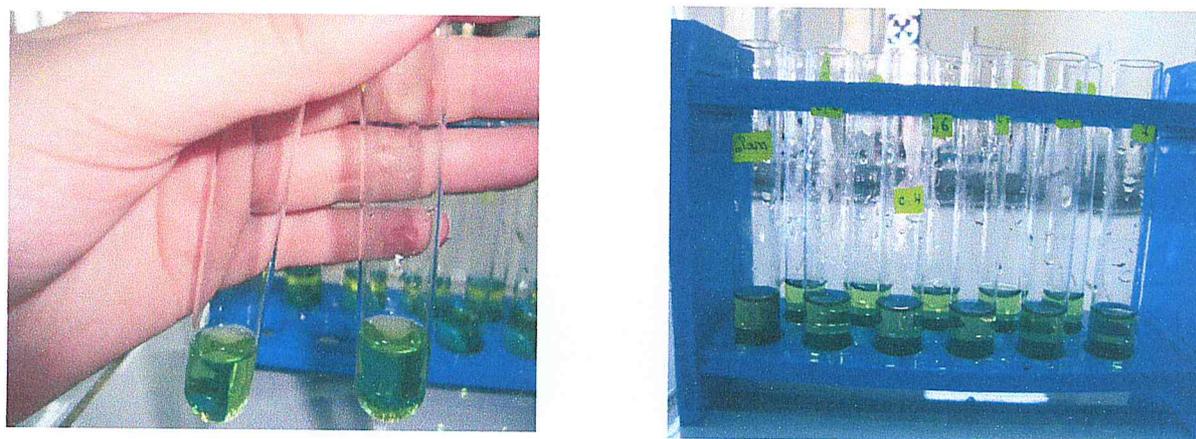
**Tableau N°18 :** Les résultats de test du pouvoir réducteur des antioxydants standards « Acide gallique et BHT ».

Concentration (mg/ml)	Absorbance	
	BHT	Acide gallique
0	0	0
0.2	0.083	0.175
0.4	0.154	0.288
0.6	0.198	0.387
0.8	0.229	0.467
1	0.269	0.549
1.2	0.316	0.632
1.4	0.371	0.716
1.6	0.458	0.756
1.8	0.521	0.824
2	0.574	0.893

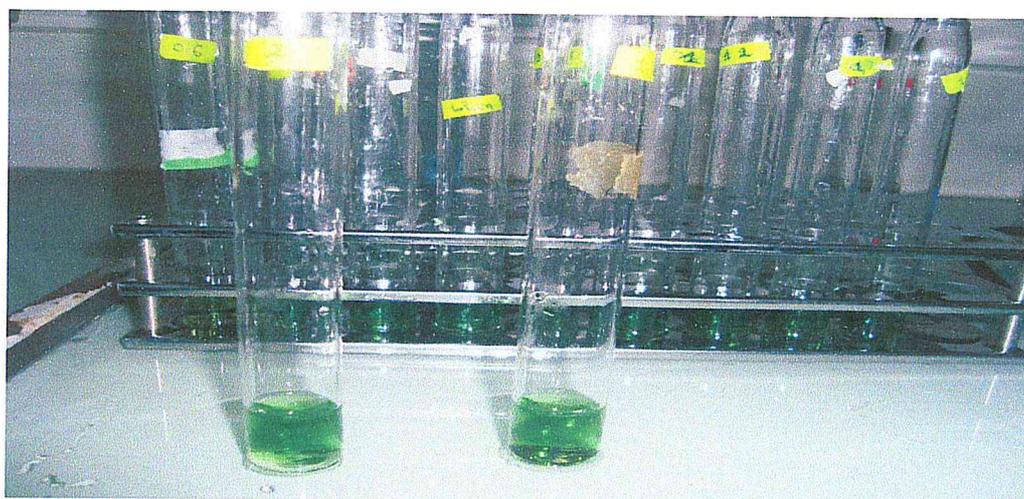
Le changement de couleur vers le vert lors de l'ajout de  $\text{FeCl}_3$  « réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  » des extraits et de l'antioxydant standard est illustré aux figures suivantes :



**Figure N°34 :** Photographies représentatives du changement de couleur de l'extrait des phénols totaux au test du pouvoir réducteur.



**Figure N°35 :** Photographies représentatives du changement de couleur de l'extrait des lignines au test du pouvoir réducteur



**Figure N°36 :** Photographie représentative du changement de couleur de l'acide gallique au test du pouvoir réducteur

## Annexe 6

- Test de blanchissement de  $\beta$ -carotène

La préparation de la solution mère et les autres solutions à différentes concentrations sont identiques avec celle du test de réduction de fer.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant:

**Tableau N°19** : Les résultats de test de blanchissement de  $\beta$ -carotène des extraits étudiés et l'étalon standard BHT.

Temps (H)	0	2	4	6	8	12	24	48
Abs (EXT Lig)	1	0.92	0.88	0.86	0.84	0.81	0.75	0.70
Abs (EXT CP)	1.06	0.94	0.81	0.70	0.61	0.47	0.42	0.40
Abs (BHT)	1.1	1.08	1.06	1.04	1.02	1.01	1	1