



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahim B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

Contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation des propriétés antioxydante d'*Olea europaea* L.

Présenté par : M^r MEDDOUR Elmoundir
M^r SOUALEM Moussa

Devant le jury :

Président : M^{me} FELLAH Fahima MCA (Université de Bordj Bou Arréridj)

Encadrant : M^{me} FATMI Widad MCB (Université de Bordj Bou Arréridj)

Examineur : M^{me} BENOUADAH Zohra MCB (Université de Bordj Bou Arréridj)

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Le grand merci s'adresse au bon DIEU, le Tout Puissant, qui nous a donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nos vifs remerciements vont à tous ceux qui ont accepté d'associer leurs compétences et leur savoir afin de juger ce travail :

A Mme FELLAH Fahima qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance. Nous lui adressons nos respectueux remerciements.

A Mme BENOUADAH Zohra qui a bien voulu accepter d'examiner ce travail et de participer au jury de ce travail. Nous lui exprimons nos profondes reconnaissances et nos sincères remerciements.

A Notre encadrant Mme FATMI Widad pour les orientations et les conseils qu'il n'a pas manqué de nous prodiguer durant la réalisation de ce travail, et pour sa patience et sa compréhension.

A tous les techniciens de laboratoire pour leur attitude professionnelle, modestie et leur bonne humeur, ils nous ont beaucoup facilité le travail, en particulier Mr Nacer Eddine MAKHOUKH

Enfin, Nous remercions toutes les personnes qui nous ont beaucoup aidé de près ou de loin durant l'élaboration de ce travail.

Table des matières

Remerciement	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Chapitre I: Matériel et méthodes	
1. Matériel végétal	5
2. Analyses physicochimiques	6
2.1. Détermination du taux d'humidité.....	6
2.2. Détermination du taux de cendre (Tc)	6
2.3. Détermination de la teneur en matière lipidique.....	7
3. Préparation des extraits	8
4. Analyses phytochimique quantitatives	10
4.1. Dosage des polyphénols totaux	10
4.2. Dosage des flavonoïdes	10
4.3. Dosage des pigments chlorophylliens	11
4.4. Dosage des caroténoïdes	12
4.5. Dosage des tanins condensée pro-anthocyanidine.....	12
5. Activité antioxydante <i>in-vitro</i>	13
5.1. Capacité antioxydante totale (TAC)	13
5.2. Piégeage du radical libre DPPH	14
5.3. Pouvoir réduction du fer : FRAP	15
6. Analyse statistique des résultats	16
Chapitre II: Résultats et discussion	
1. Analyses physicochimiques	17
1.1. Taux d'humidité.....	17

1.2. Taux de cendre (Tc).....	17
1.3. Teneur en matière lipidique	18
2. Rendement d'extraction.....	18
3. Analyse phytochimique quantitatives.....	18
3.1. Polyphénols totaux.....	19
3.2. Flavonoïdes.....	20
3.3. Pigments chlorophylliens.....	22
3.4. Caroténoïdes	23
3.5. Tanins condensés « Pro-anthocyanidines »	23
4. Activité antioxydante <i>in-vitro</i>	24
4.1. Capacité antioxydante totale.....	24
4.2. Piégeage du radical libre DPPH	24
4.3. Pouvoir réducteur du fer ferrique.....	26
Conclusion et perspectives	28

Références bibliographiques

Annexe

Résumés

Liste des abréviations

BHA : Hydroxyanisolebutylé.

BHT : Butylhydroxytoluène .

DPPH : 2,2- diphényle-1-picrylhydrazyl.

EAA : Equivalent acide ascorbique

EAG : Equivalent acide gallique.

E β -C : Equivalent Beta carotène.

EC : Equivalent catéchine.

EQ : Equivalent quercétine.

ERO : Espèces réactives oxygénées

ERN : Espèces réactives azotées

ES : Extrait sec

FRAP : Pouvoir réducteur fer ferrique.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

M : Masse.

MG : Matière gras.

MS : Matière sèche.

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

O.europeae : *Olea europeae*.

ROS : Reactive oxygen species.

Tc : Taux de cendre.

TAC : Total antioxidant capacity.

Vit c : Vitamine C

Liste des figures :

Figure 1 <i>Olea europaea</i> L. var. <i>sylvestris</i>	5
Figure 2 Protocole de préparation des extraits	9
Figure 3 Structure chimique de base des flavonoïdes	11
Figure 4 Mécanisme de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés	13
Figure 5 Réaction de réduction de radical DPPH.....	14
Figure 6 Taux d'humidité <i>Olea europaea</i> L. var. <i>sylvestris</i>	17
Figure 7 Taux de cendres de <i>Olea europaea</i> L. var. <i>sylvestris</i>	17
Figure 8 Teneur en matière lipidique de <i>Olea europaea</i> L. var. <i>sylvestris</i>	18
Figure 9 Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de <i>Olea europaea</i> L.var . <i>sylvestris</i>	20
Figure 10 Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de <i>Olea europaea</i> L. var. <i>sylvestris</i>	21
Figure 11 Teneur en pigments chlorophylliens des différents extraits de <i>Olea europaea</i> L. var. <i>sylvestris</i>	22
Figure 12 Teneurs en tannins condensés des différents extraits de <i>Olea europaea</i> L. var. <i>sylvestris</i>	23
Figure 13 Capacité antioxydant totale de <i>Olea europaea</i> L. var. <i>sylvestris</i>	24
Figure 14 Activité scavenger des différents extraits de <i>Olea europaea</i> L. à l'égard du radical DPPH.	25
Figure 15 Pouvoir réducteur de fer ferrique des différents extraits de <i>Olea europaea</i> L. var. <i>sylvestris</i>	26

Liste des tableaux :

Tableau I : Rendement et caractéristiques des différents extraits obtenus.....	17
---	----

Introduction

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes. Les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique (**Iserin, 2001**).

L'Algérie possède une flore riche et diversifiée, parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve l'espèce *Olea europea* L, ce dernier est largement distribué surtout dans le centre de l'Algérie. Cette plante adaptogène qualifiée « d'alicament » a fait l'objet de plusieurs recherches (**Mezouar et al., 2021**).

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen (**Breton et al., 2012**), de 6 à 8m de hauteur à tronc tortueux à écorce grisâtre, crevassée peut atteindre 15 m de haut (**Hans et Kothe, 2007**), sa longévité multiséculaire est légendaire, la température demeure à plusieurs jours à 16 C° (**Ghedira, 2008**), est un arbre facilement identifiable à son port à feuilles blanches à 4 pétales soudé en tube à la base (**Claude et Françoise, 2007**). Les feuilles, blanches argentées à la face inférieure, vertes grisâtres à la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces, lancéolées. Pour les fruits, olives, sont des drupes ovoïdes, vert puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme (**Ghedira, 2008**). L'olivier exige un climat ensoleillé doux et sec, craint, l'excès de l'humidité, Il s'adapte aux conditions extrêmes de l'environnement, mais exige une intensité lumineuse importante (**Claude et Françoise, 2007**).

Les feuilles d'olivier, cette biomasse produite en grande quantité dans les pays méditerranéens, ne doivent pas être considérées comme un déchet encombrant, mais comme une richesse qu'on doit utiliser, car ils sont connus par leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine, due à leur richesse en composés phénoliques, pouvoirs antioxydant, anticancéreux et antimicrobien qui les rendent très importants pour la santé et l'industrie agroalimentaire (**Aouidi, 2012**).

Elles ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels dans les pays européens et méditerranéens comme des extraits, des tisanes, et des poudres. Ils contiennent plusieurs composés potentiellement bioactifs (**Wainstein et al., 2013**).

Aussi, elles sont des diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle modérée. L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète (au cours

de la grossesse ou en cas d'obésité) (**Ghedira, 2008**). Elles sont aussi largement utilisées en tant que remède pour le traitement de la fièvre et d'autres maladies comme le paludisme, consommé sous forme d'un extrait, poudre ou tisane. Les feuilles possèdent également des propriétés antimicrobiennes contre certains micro-organismes tels que des bactéries, des champignons et mycoplasmes (**Ghanbari et al., 2012**).

La perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée, provoque des effets délétères dus, soit à une défense antioxydante défaillante, soit à un état pro-oxydant accru, nommé le stress oxydant (**Camille et Mireille, 2011**).

La source principale des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules des mammifères est d'origine enzymatique parmi ces enzymes la NADPH oxydase, les peroxydases la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et les lipoxygénases, les mitochondries, éléments essentiels au fonctionnement cellulaire puisqu'elles métabolisent le dioxygène et produisent également en permanence des ERO (**Camille et Mireille, 2011**).

Un antioxydant est par définition une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme. Un antioxydant peut donc : prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou désactiver directement les ROS. Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions : systèmes enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux et piègeurs de radicaux libres (**Higdon et al., 2004**).

Les antioxydants enzymatiques (le superoxyde dismutase, la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les différentes espèces oxydantes. Leur rôle principal est de diminuer la quantité des ROS dans la cellule (**Lardon, 1988**). Parfois, ces enzymes nécessitent des cofacteurs comme les oligoéléments (Zn, Cu, Mn, Se, Fe) pour exercer leur activité enzymatique (**Pelzer et al., 1998**).

Ils existent de nombreux réducteurs endogènes participant à la protection de l'organisme contre les EROs, les plus importants étant le glutathion, la bilirubine, l'acide urique, le coenzyme Q, les œstrogènes, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque (**Yamamura et al., 1998**).

La principale source d'approvisionnement de l'organisme en antioxydants exogènes sont les aliments soit d'origine animale, soit d'origine végétale. Les plus connus sont la vitamine E, la vitamine C et les polyphénols (**Yamamura et al., 1998**).

Les polyphénols, particulièrement abondants dans une alimentation riche en produits végétaux, pourraient jouer un rôle protecteur important, certains auteurs invoquent l'activité pro-oxydante de ces composés *in vitro* (**Fukumoto et Mazza, 2000**). Seuls les polyphénols les plus réducteurs peuvent manifester cet effet en entrant dans des cycles redox qui génèrent des ERO.

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (**Ghedira, 2005**). Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (**Tapas et al., 2008**).

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Naumann et al., 2017**). Les tanins condensés sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (**Porter et al., 1986**). Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides minéraux dilués mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanins (**Smeriglio et al., 2017**).

Les caroténoïdes sont des pigments rouges ou jaunes, possédant un chromophore caractéristique (au moins 10 doubles liaisons conjuguées) expliquant leur couleur jaune-orangée et leur sensibilité à l'oxydation. Pour cela, les caroténoïdes sont employés en industrie agro-alimentaire principalement pour leur pouvoir colorant. Ils sont également préconisés en cas de photo dermatose puisqu'ils interfèrent avec les processus de photo-oxydation (**Takashi, 2020**).

La présente étude, vise à étudier les propriétés physicochimiques et phytochimique des feuilles de la plante *Olea europaea* L. var. *sylvestris* (zebbouj) récoltée de la région Tefreg de la wilaya de Bordj Bou Arreridj et l'évaluation de l'activité antioxydante des trois extraits de la plante.

Cette étude est subdivisée en deux parties essentielles, la première présente une introduction qui est consacré à une étude bibliographique de la plante étudié et de stress oxydant ainsi que les antioxydants.

La deuxième partie, expérimentale, répartie en deux chapitres dans ce mémoire, le premier chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées lors du travail expérimental.

- Etude physico-chimique de la poudre de la plante *Olea europaea* L. (taux d'humidité, de cendre et de matière grasse).
- Préparation des extraits : Acétonique, éthanolique et méthanolique des feuilles de la plante.
- Analyse phyto-chimique des différents extraits (teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins, pigments chlorophylliens et caroténoïdes).
- Evaluation de l'activité antioxydante de la plante par l'appréciation de la capacité antioxydant total, le test de DPPH et le pouvoir réducteur du fer ferrique.

Le deuxième chapitre expose l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion. Et enfin, nous finirons par une conclusion et perspectives.

Chapitre I

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les feuilles de l'olivier sauvage (*Olea europaea* L.) (figure 01) qui appartient à la famille des Oleaceae.

Classification systématique de la plante (Ghedira, 2008)

Règne :	Plantae
Sous règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Asteridae
Ordre :	Scrophulariales
Famille :	Oleaceae
Genre :	<i>Olea</i>
Espèce :	<i>Olea europaea</i>
Variété :	<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i> (L.)



Figure 1 *Olea europaea* L. var. *sylvestris*

La collecte de la plante a été effectuée dans la région de Tefreg dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj, durant le mois de février 2021.

Les feuilles de l'olivier sauvage ont été nettoyées, séchées à l'obscurité puis ont été réduites en poudre et stockées dans des flacons en verre hermétiquement fermés pour les préserver de la lumière, et de l'humidité jusqu'à son utilisation.

2. Analyses physicochimiques

2.1. Détermination du taux d'humidité

L'humidité de la poudre a été déterminée par la méthode de séchage à l'étuve. Une quantité de 2g de poudre de feuilles de l'olivier sauvage est mise dans un creuset en porcelaine préalablement taré. Le creuset et son contenu sont ensuite placés dans une étuve universelle (Mettler type-ONE 7, Schutzart DIN EN 60529-IP 20. Germany) à 105 °C pendant 24h. Après refroidissement dans un dessiccateur renfermant un desséchant (gel de silice), les creusets ont été pesés (**Hernandez et al., 1999**). Le pourcentage d'humidité relative au poids est calculé par la formule suivante :

$$H\% = (m - m') / m' \times 100$$

Où ;

m : masse de l'échantillon avant le séchage ;

m': masse de l'échantillon après le séchage = masse (creuset + échantillon) – masse du creuset vide.

2.2. Détermination du taux de cendre (Tc)

Les cendres totales sont le résidu de composés minéraux qui reste après l'incinération d'un échantillon contenant des substances organiques d'origine animale, végétale ou synthétique. Les cendres représentent environ 1 à 5% de la masse d'un aliment sur une base humide.

Le taux de cendre est déterminé après minéralisation par voie sèche, dans un creuset en porcelaine, préalablement taré. On introduit 2g de poudre végétale dans un four à moufle de type mettler à une température de 800°C pendant 10 heures jusqu'à l'obtention des cendres blanches (toute la matière organique brûle et on ne récupère que la partie inorganique de l'échantillon), on laisse refroidir dans un dessiccateur et on pèse (**Keller, 1994**).

Le taux de cendre est calculé suivant la formule :

$$T = (M - M') / E \times 100$$

Où ;

M : masse finale (creuset + cendres totales)

M' : masse du creuset vide

E : prises d'essais de la matière

2.3. Détermination de la teneur en matière lipidique

Les lipides sont des molécules insolubles dans l'eau et très solubles dans les solvants organiques, tel l'éther de pétrole. La plupart des méthodes de dosage des lipides exploitent ces propriétés physiques pour extraire les lipides des aliments ou végétaux dans le but de mesurer leur concentration.

La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la concentration de la matière grasse dans les aliments ou végétaux solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et on pèse la matière grasse à la fin de l'extraction.

L'échantillon solide (poudre de la plante) est pesé (9.93 g) et placé dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu par 300ml de l'éther de pétrole à ébullition (P.E. 35°C) qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée (AOCS, 1990).

Les capsules de cellulose sont perméables au solvant et à la matière grasse qui y est dissoute. Ces capsules sont jetables. La teneur en matière grasse dans notre échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$ML (\%) = (P1 - P2) / ME \times 100.$$

Où ;

P2 : poids du ballon vide.

P1 : poids du ballon après évaporation.

ME : masse de la prise d'essai.

ML : taux de la matière lipidique.

3. Préparation des extraits

5 g de la poudre des feuilles de *Olea europaea* L. var. *sylvestris* est macéré dans un volume de 75 ml de trois solvants de différente polarité (acétone 70%, éthanol 70% et méthanol 70%). Après 1.5 h, le mélange a été filtré sur papier filtre. Le filtrat est récupéré et le même volume de solvant est ajouté au filtré pour faire une deuxième macération dans les mêmes conditions. Après la deuxième filtration, les deux filtras sont mélangés et évaporés à 40°C à l'aide d'un rotavapeur de type BÜCHI. Les extraits obtenus ont été séchés dans une étuve à une température de 40° pendant trois jours. Les extraits bruts obtenus ont été conservés dans des boîtes pétries en verre étiquetés au réfrigérateur jusqu'à son utilisation (figure 02) (Yaye et al., 2011).

Préparation des extraits par 3 solvants

Acétone 70%

Ethanol 70%

Méthanol 70%



- ✓ 5g de poudre sèche des feuilles de plante est macéré dans 75 ml de solvant
- ✓ Agitation pendant 1h et 30 min
- ✓ Filtration
- ✓ 2^{ème} macération de filtré dans les mêmes conditions
- ✓ 2^{ème} Filtration



- ✓ Les deux filtrats sont mélangés
- ✓ Rotavapeurés à 40°C
- ✓ Séchés dans l'étuve à 40 °C pendant 3 jours
- ✓ Conservés à (-5°C)

Etude phytochimique

- ✓ Polyphénols totaux.
- ✓ Flavonoïdes totaux.
- ✓ Tanins condense.
- ✓ Caroténoïdes
- ✓ Pigments chlorophylliens.

Etude de l'activité antioxydante

- ✓ DPPH
- ✓ TAC
- ✓ FRAP

Figure 2 Protocole de préparation des extraits

4. Analyses phytochimique quantitatives

4.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols représentent une classe de métabolites secondaires. Ils sont très largement représentés dans le règne végétal et donc dans notre alimentation. Nous les consommons sous forme de fruits ou de légumes par exemple. Leur structure comporte un ou plusieurs groupes phénoliques (e.g., un groupement OH greffé sur un noyau aromatique).

Leur étude a été croissante ces dernières décennies en raison de leurs bienfaits sur la santé, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant mais aussi dans la prévention ou le traitement de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives (**Orgogozo et al., 1997 ; Chen et al., 2004**). Ils sont également utilisés en agroalimentaire, en cosmétique ou dans l'industrie pharmaceutique comme additifs (**Velu et al., 2008 ; Košinová et al., 2011**).

La teneur totale en phénol des extraits a été estimée en utilisant une méthode de Folin-Ciocalteu, légèrement modifiée décrite par (**Singleton et Rossi, 1965**).

La méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique-phosphomolybdique de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénolique, conduisant à la formation de produit de réduction de couleur bleue qui absorbe la lumière à 765nm dont l'intensité de la couleur est proportionnellement à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé et al., 2005**).

Brièvement, 1ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 µl de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm (**Li et al., 2007**).

Les teneurs des polyphénols totaux ont été exprimées en microgramme d'équivalent d'acide gallique / mg d'extrait sec (µg EAG / mg ES).

4.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de plantes possédant une structure similaire avec deux cycles aromatiques liés par trois atomes de carbone (figure 03). Ils se présentent la plupart du temps sous forme d'hétérosides (**Thomas, 2016**).

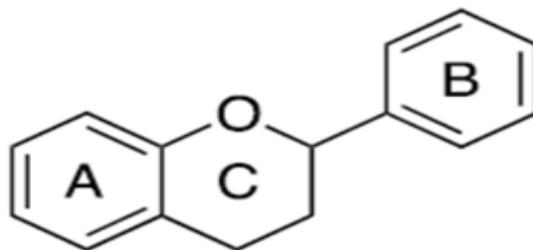


Figure 3 Structure chimique de base des flavonoïdes (Thomas, 2016).

Les flavonoïdes sont très largement étudiés en raison de leurs multiples propriétés biologiques (Nijveldt et al., 2001) exploitées dans l'industrie. Le premier effet attribué à ces molécules a été le caractère veinotonique en renforçant la résistance des capillaires (Jean et al., 2009).

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier la teneur des flavonoïdes dans les extraits des feuilles *Olea europaea* L. var. *sylvestris*. À 1 ml d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 ml d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm (Bahorun et al., 1996).

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQr/mg}$ de ES).

4.3. Dosage des pigments chlorophylliens

Les teneurs en β -carotène, lycopène et chlorophylle des différents extraits ont été déterminées selon (Nagata et Yamashita., 1992). Brièvement, 100 mg de chaque extrait sont ajoutés à 10 ml d'un mélange acétone-hexane (4 :6 V/V) puis agités vigoureusement pendant 1 min, ensuite le tout est filtré à travers un papier Whatman N°4. L'absorbance des filtrats est mesurée à différentes longueurs d'ondes : 453 nm, 505 nm, 645 nm et 663 nm. La teneur en Pigments est calculée suivants les équations indiquées ci-dessous et les résultats sont exprimés en μg de chlorophylle, caroténoïdes ou β -carotène /mg d'extrait sec.

- ✓ β -carotène (mg/100 ml) = $0.216 \times A_{663} - 1.22 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$
- ✓ Lycopène (mg/100 ml) = $- 0.0458 \times A_{663} + 0.204 \times A_{645} - 0.372 \times A_{505} + 0.0806 \times A_{453}$
- ✓ Chlorophylle a (mg/100 ml) = $0.999 \times A_{663} - 0.0989 \times A_{645}$
- ✓ Chlorophylle b (mg/100 ml) = $- 0.328 \times A_{663} + 1.77 \times A_{645}$

4.4. Dosage des caroténoïdes

Les caroténoïdes contiennent plusieurs doubles liaisons conjuguées dans leur structure, ces doubles liaisons sont responsables de l'absorption dans la lumière par excitation des électrons des liaisons π (**Rodriguez-Amaya, 2001**).

Pour extraire et doser les caroténoïdes dans les feuilles *d'Olea europaea* L. var. *sylvestris* la technique de **Sass-Kiss et al., (2005)** est suivie avec quelques modifications. Pour cela, 50 mg de la poudre est additionné à 10 ml d'un mélange de solvant (hexane, acétone, éthanol) (2:1:1, V/V/V). Après agitation pendant 15 min, le mélange est centrifugé à 4500 tours/min pendant 15 min. La phase supérieure (hexadique) contenant les pigments, est récupérée et le culot a subi une deuxième extraction dans les mêmes conditions. Les deux phases hexadiques sont mélangées puis l'absorbance du mélange est mesurée par spectrophotomètre UV-VIS à 450 nm. Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de β -carotène par milligramme de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la β -carotène ($\mu\text{g E } \beta\text{-C /mg MS}$).

4.5. Dosage des tanins condensée pro-anthocyanidine

Les tanins se définissent comme des composés polyphénoliques ayant la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ceci s'explique par la création de liaisons entre les molécules de tanin et les fibres de collagène de la peau. Ces molécules présentent de nombreuses fonctions hydroxyles et phénoliques qui vont leur permettre de se complexer avec de nombreuses macromolécules telles que les protéines (**Bravo, 1998**). Ils ont également le pouvoir de chélater les ions ferriques et cuivriques (**Hagerman, 1988**).

La teneur en pro-anthocyanidines est mesurée en suivant le protocole de **Sun et al. (1998)** modifié par **Oyedmi et Afolayan, (2011)**.

Il est basé sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré (figure 04). La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère (**Ba et al., 2010**).

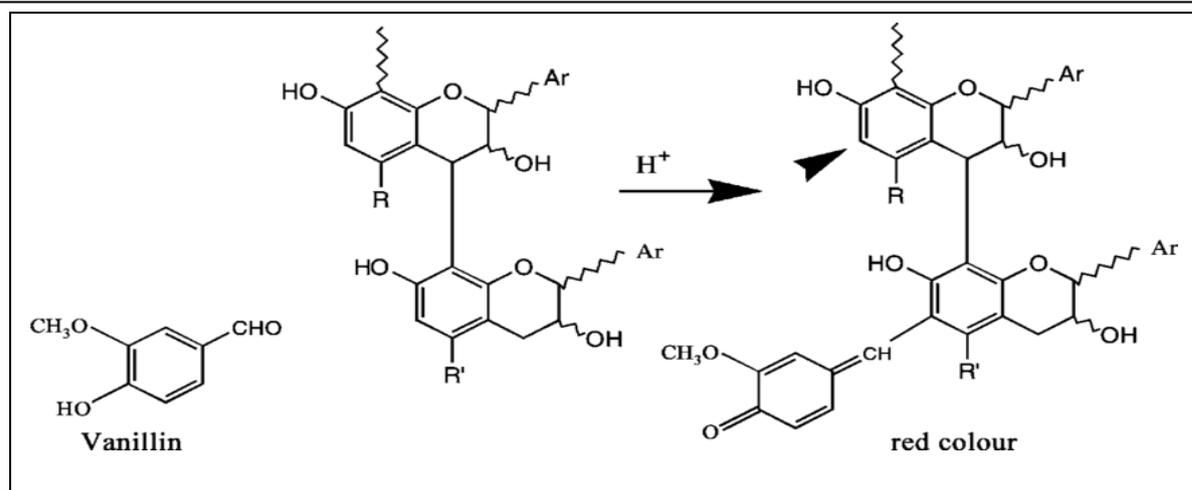


Figure 4 Mécanisme de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés (Schofield et al., 2001).

Un volume de 0.5 ml de la solution d'extrait (1 mg/ml) est mélangé avec 3 ml de la solution de vanilline (4%, P/V), préalablement préparée dans le méthanol et 1.5 ml d'HCl (37%). Le mélange est bien agité, puis incubé pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance est lue à 500 nm. Un témoin est préparé en mélangeant 0.5 ml d'extrait avec 3 ml de méthanol et 1.5 ml d'HCl.

Une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant la catéchine comme standard et la concentration est exprimée en microgramme équivalent catéchine par milligramme de matière sèche ($\mu\text{g EC/mg ES}$).

5. Activité antioxydante *in-vitro*

Dans la présente étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été réalisée par des techniques chimiques à savoir : la capacité antioxydante totale (TAC), le piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur du fer.

5.1. Capacité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits de feuilles de l'olivier sauvage est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de Prieto et al., (1999). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo (V) à pH acide (Benhammou, 2012).

Un volume de 0.3 ml de l'extrait est introduite dans les tubes à essais, puis 3 ml de solution à préparer sont additionnés (la solution contient de l'acide sulfurique 0.6 M, du phosphate de sodium 28 mM et du molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes sont agités et

incubés au bain-marie à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement l'absorbance est mesurée à 695 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide ascorbique comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en microgrammes (μg) équivalent d'acide ascorbique par milligramme d'extrait sèche ($\mu\text{g EAA/mg ES}$).

5.2. Piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH est l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques des extraits (**Popovici et al., 2010**).

Dans ce test les antioxydants réduisent le diphénylpicryl-hydrazyle ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicryl-hydrazine (figure 05), dont l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration des antioxydants présents dans le milieu (**Adida et al., 2016**).

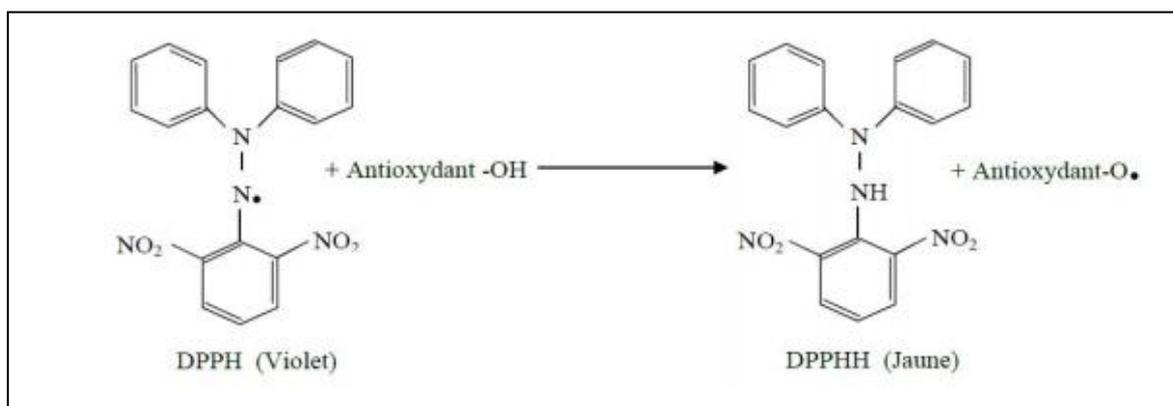


Figure 5 Réaction de réduction de radical DPPH (**Talbi et al., 2015**).

La solution DPPH est préparée par solubilisation de 0.025 mg de DPPH dans 1 ml du méthanol. Un volume de 100 μl des solutions des extraits ou de standard (acide ascorbique, la quercétine et le BHA) de différentes concentrations sont mélangés avec 2.5 ml de la solution méthanolique de DPPH. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 517 nm. Le contrôle négatif est préparé en remplaçant l'échantillon par le méthanol, le blanc contient le méthanol et l'échantillon (**Sanchez et al., 1998**).

L'IC₅₀ est la concentration de l'acide ascorbique ou de l'extrait qui peut réduire 50% du DPPH, selon **Mansouri et al., (2005)** l'IC₅₀ est calculé à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition (I %) en fonction de la concentration de chaque extrait. Cette valeur est comparée à celle trouvée pour le composé de référence.

L'activité antioxydants est déterminée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antioxydant} = [\text{Abs Contrôle} - \text{Abs Echantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

Où :

Abs Contrôle : est l'absorbance de la solution de DPPH en l'absence de l'extrait.

Abs Echantillon : est l'absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait.

5.3. Pouvoir réduction du fer : FRAP

Cette méthode est basée sur l'aptitude d'un antioxydant donné à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en fer ferreux (Fe^{2+}). La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique à la couleur bleu-vert du fer ferreux. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (**Karagözler et al., 2008**).

200 μl de l'échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 500 μl de tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 ml de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Ensuite, 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés pour arrêter la réaction. Après, centrifugation des tubes à 3000 rpm pendant 10 minutes, 2.5 ml du surnageant sont ajoutés à 2.5 ml d'eau distillée et 500 μl d'une solution de ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0.1%.

La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôles positifs dans les mêmes conditions expérimentales (**Pan et al., 2008**).

Pour explorer les résultats obtenus, on a tracé le graphe des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

Les données sont exprimées sous forme de valeurs EC 50, Une EC 50 est une estimation statistique de la concentration d'une substance dans le milieu ambiant nécessaire pour produire un effet particulier dans 50 % d'une très grande population dans des conditions spécifiées (**Karl et al., 2010**).

6. Analyse statistique des résultats

Les résultats ont été présentés sous forme des moyennes avec leur écart-type (moyenne \pm écart-type), les moyennes sont comparées par un test T de student grâce au logiciel Excel (version 2019). Les différences sont considérées comme :

- Significatives lorsque (*p < 0,05) ;
- Hautement significatives lorsque (**p < 0,01) ;
- Très hautement significatives lorsque (**p < 0,001).

Avec p : degré de signification.

Chapitre II

Résultats et discussion

1. Analyses physicochimiques

1.1. Taux d'humidité

La figure 06 représente le taux d'humidité de la poudre des feuilles d'*Olea europaea* L. var. *sylvestris*, dont le taux est faible (H% = 8,23%).

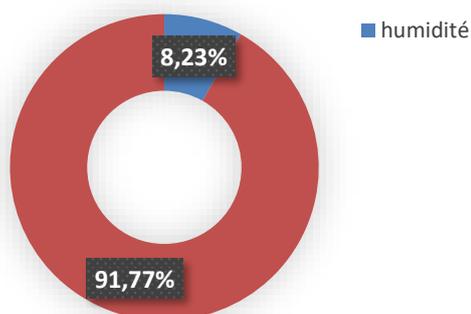


Figure 6 Taux d'humidité d'*Olea europaea* L. var. *sylvestris*

1.2. Taux de cendre (Tc)

Le taux de cendre est déterminé après minéralisation par voie sèche de 2g d'échantillon en poudre dans un four à moufle à une température de 800C° pendant 10 heures jusqu'à l'obtention des cendres blanche qui pèse 1,93g soit Tc= 3,5 % (figure 07).

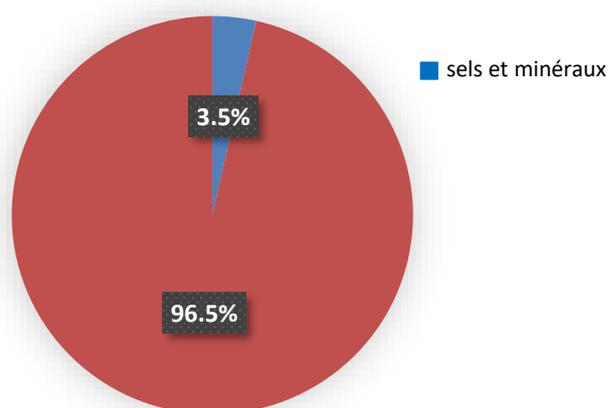


Figure 7 Taux de cendres de *Olea europaea* L. var. *sylvestris*

Dans la présente étude, l'analyse des paramètres physicochimiques de *O.europaeae* a montré un taux d'humidité de 8.23% et un taux de cendres de 3.55%. Ce dernier est inférieur

à celui de **Bahloul et al. (2014)** qui a rapporté des valeurs de 6,60 à 9,82% pour le taux de cendres.

Il est important de noter que les valeurs obtenues ne dépassent pas les normes décrites dans la pharmacopée européenne i.e. le taux d'humidité ne dépasse pas 10 % et la teneur en cendres totales est inférieure à 14%, ceci confère à la poudre étudiée une meilleure conservation à long terme (**Fettah., 2019**).

1.3. Teneur en matière lipidique

L'analyse physico-chimique de la poudre de notre échantillon montre que le taux en matière lipidique des feuilles de l'olivier sauvage étudié ne représente que (MG= 2,81%) du poids total (figure 08).

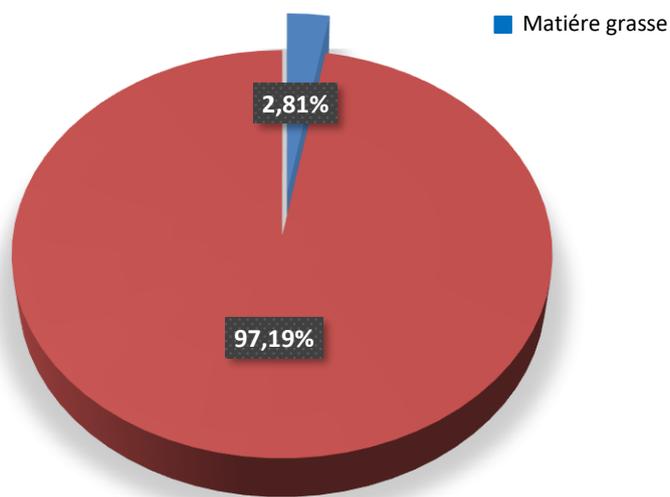


Figure 8 Teneur en matière lipidique de *Olea europaea* L. var. *sylvestris*

2. Rendement d'extraction

L'extraction par macération de 5g de feuilles broyées de l'*Olea europaea* L. var. *sylvestris* par trois solvants (Acétone 70%, Ethanol 70% et Méthanol 70%) a permis de récupérer des résidus bruts sous forme poudre de couleur marron, avec des rendements variables de 35 à environ 38%.

Les résultats obtenus montrent que le rendement d'extraction varie en fonction du solvant utilisé ; le rendement le plus élevé a été détecté pour l'extrait éthanolique (37,65

mg/g), suivi par l'extrait acétonique (36,98 mg/g), puis l'extrait méthanolique (35 mg/g) (tableau I).

Tableau I : Rendement et caractéristiques des différents extraits obtenus

	Masse (g)	Rendement (%)	Aspect	Couleur
Acétone 70%	1,86	36,98	Poudre	Marron
Ethanol 70%	1,89	37,65	Poudre	Marron
Méthanol 70%	1,75	35	Poudre	Marron

Nos résultats de rendement sont nettement supérieurs à ceux obtenus par **Mezouar et al., (2021)** qui a reculé un rendement d'extraction de 12,33 à 21,41 % du poids des feuilles de l'*Olea europaea* L.

Le calcul de rendement d'extraction repose sur plusieurs paramètres ; la nature et la concentration de solvant, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon (**Santos et al., 2012**). La période et le lieu de récolte influent sur le rendement d'extraction (**Touaibia et al., 2014**).

3. Analyse phytochimique quantitatives

3.1. Polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des différents extraits a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec différentes concentrations d'acide gallique (annexe). Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait séché ($\mu\text{g EAG/mg ES}$).

Les résultats montrent que les teneurs en polyphénols varient entre $129,09 \pm 1,75 \mu\text{g EAG/mg ES}$ et $150,20 \pm 0,72 \mu\text{g EAG/mg ES}$. Ainsi que, la teneur la plus élevée a été enregistrée avec l'extrait méthanolique ($150,20 \pm 0,72 \mu\text{g EAG/mg ES}$) suivi de l'extrait acétonique ($139,36 \pm 0,75 \mu\text{g EAG/mg ES}$) et l'extrait éthanolique ($129,09 \pm 1,75 \mu\text{g EAG/mg ES}$) (figure 09).

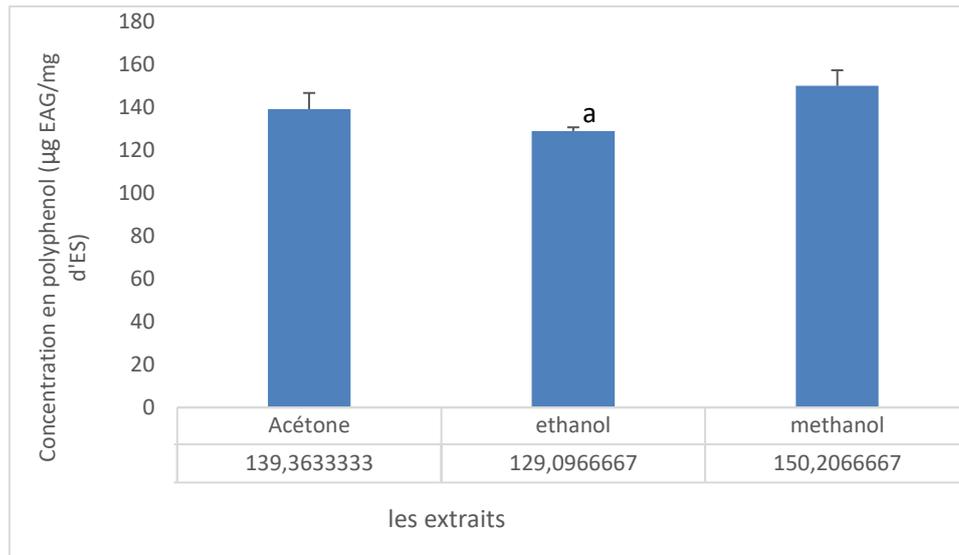


Figure 9 Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de *Olea europaea* L.var .
sylvestris .

(a) Différence hautement significative par rapport à l'extrait méthanolique ($p < 0,01$).

Comparativement à d'autres travaux effectués sur la même plante, la teneur en composés phénoliques qu'on a dosés est moins importante par rapport à celle trouvée par **Addab et al., (2020)**. Les teneurs en composés phénoliques et surtout le Polyphénol, changent de façon considérable d'une espèce à une autre et à l'intérieur de la même espèce, à cause des facteurs extrinsèques (température, climat...), génétiques (la variété et l'origine d'espèces), physiologiques (le degré de maturation des plantes, les organes utilisés) et de la durée de stockage (**Ksouri et al., 2009**).

3.2. Flavonoïdes

Les concentrations des flavonoïdes dans les extraits des feuilles *Olea europaea* L. var. *sylvestris* ont été calculées à partir de l'équation de régression de courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (annexe). Les teneurs en flavonoïdes correspondantes sont rapportées en microgramme d'équivalents de quercétine par microgramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/ mg d'extrait}$).

D'après nos résultats, il apparaît là aussi que les teneurs en flavonoïdes des extraits varient en fonction du solvant d'extraction. L'extrait méthanolique présente la plus élevée concentration en flavonoïdes avec une valeur moyenne de ($16,74 \pm 0,64 \mu\text{g EAG/mg ES}$), suivi de l'acétone avec une concentration de ($12,36 \pm 0,39 \mu\text{g EQ/mg ES}$), puis l'extrait éthanolique ($10,21 \pm 0,80 \mu\text{g EQ/mg ES}$) (figure 10).

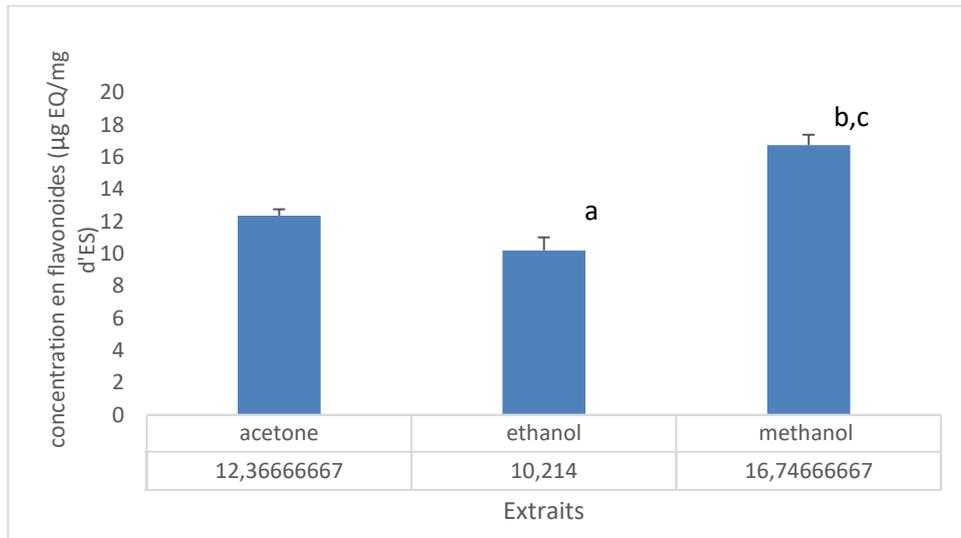


Figure 10 Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de *Olea europaea* L. var. *sylvestris*.

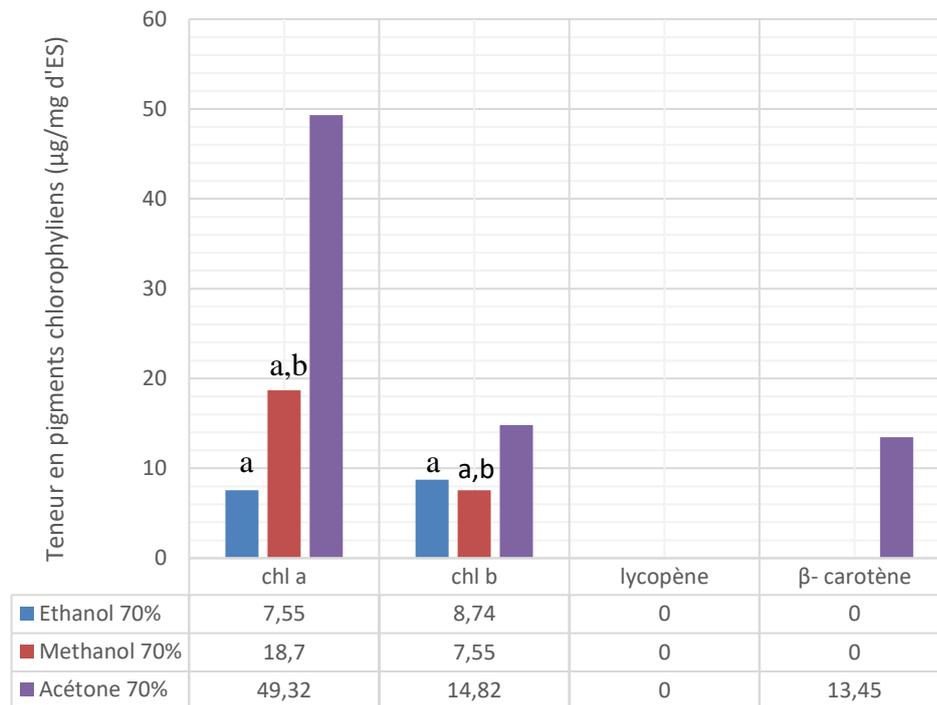
- (a) Différence significative par rapport à l'extrait acétonique ($p < 0,05$).
- (b) Différence très hautement significative par rapport à l'extrait acétonique ($p < 0,001$).
- (c) Différence très hautement significative par rapport à l'extrait éthanolique ($p < 0,001$).

Selon **Abdille et al., (2005)**, le méthanol est le meilleur solvant utilisé pour extraire les composés phénoliques.

Certains auteurs ont montré que la feuille d'olivier est caractérisée par sa richesse en composés bioactifs : les polyphénols totaux (**Gracia et al., 2000**), flavonoïdes (**Lee et al., 2009**). La composition des feuilles d'oliviers en molécules bioactives change selon son origine, les conditions climatiques, le mode de séchage, le temps, les types de solvants d'extraction et les conditions de stockage (**Altiok, 2010**).

3.3. Pigments chlorophylliens

D'après la figure 11, l'extrait acétonique de notre plante est riche en pigments chlorophylliens, en particulier la chlorophylle a et b et le β -carotène, mais ne contient pas de Lycopène. Cependant les extraits éthanolique et méthanolique possèdent des teneurs moins importantes de chlorophylle a (7,55 et 18,70 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'ES), respectivement et de chlorophylle b (8,74 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'ES) pour l'extrait éthanolique et (7,55 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'ES) pour l'extrait méthanolique et ne possède pas de β -carotène et de Lycopène.



Pigments chlorophylliens

Figure 11 Teneur en pigments chlorophylliens des différents extraits de *Olea europaea* L. var. *sylvestris*

Chlorophylle a

- (a) : Différence très hautement significative par rapport à l'extrait acétonique ($p < 0.001$).
- (b) : Différence très hautement significative par rapport à l'extrait éthanolique ($p < 0.001$).

Chlorophylle b

- (a) : Différence très hautement significative par rapport à l'extrait acétonique ($p < 0.001$).
- (b) : Différence très hautement significative par rapport à l'extrait éthanolique ($p < 0.001$).

3.4. Caroténoïdes

L'analyse quantitative des caroténoïdes dans nos extraits est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage établie avec le β -carotène (annexe). Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de β -carotène par milligramme de la matière sèche ($\mu\text{g E } \beta\text{-C /mg MS}$).

La concentration de caroténoïdes de la poudre des feuilles de *Olea europaea* L. var. *sylvestris* est de $(11,12 \pm 0,17 \mu\text{g E } \beta\text{-C /mg MS})$.

3.5. Tanins condensés « Pro-anthocyanidines »

Les concentrations de Pro-anthocyanidines dans les extraits bruts de notre plante sont calculées depuis l'équation de courbe d'étalonnage de catéchine (annexe).

D'après les résultats obtenus, l'acétone présente le meilleur solvant d'extraction des Pro-anthocyanidines avec un taux de $(27,03 \pm 0,33 \mu\text{g EC/mg})$, suivi de méthanol puis l'éthanol avec des taux de $(6,94 \pm 0,22 \mu\text{g EC/mg ES})$ et $(6,34 \pm 0,69 \mu\text{g EC/mg ES})$, respectivement (figure 12).

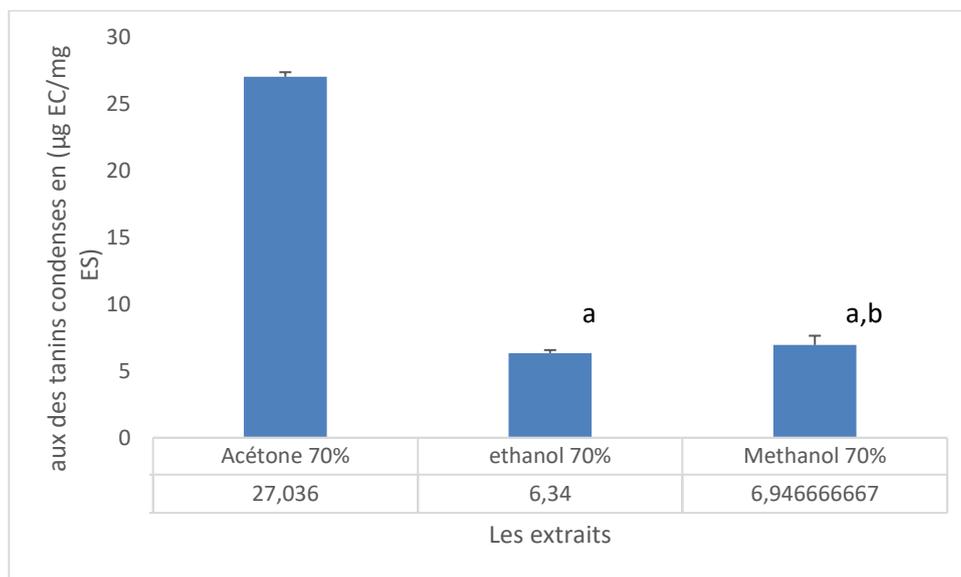


Figure 12 Teneurs en tannins condensés des différents extraits de *Olea europaea* L. var. *sylvestris*.

- (a) : Différence très hautement significative par rapport à l'extrait acétone ($p < 0,001$).
- (b) : Différence significative par rapport à l'extrait éthanol ($p < 0,05$).

Brahmi et al., (2013) ont montré que la feuille d'olivier est riche en Tannin et Caroténoïde.

4. Activité antioxydante *in-vitro*

4.1. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale des extraits étudiés est estimée à partir de l'équation de courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique ($y = 0,0049x - 0,0306$) (annexe).

À partir de cette équation, on a pu déterminer que les extraits des feuilles de l'olivier sauvage révèlent une activité antioxydante totale égale à $(150,49 \pm 2,46 \mu\text{g EAA/mg ES})$ pour l'extrait méthanolique, $(141,03 \pm 2,35 \mu\text{g EAA/mg ES})$ pour l'extrait acétonique et $(131,03 \pm 1,54 \mu\text{g EAA/mg})$ pour l'extrait éthanolique (figure 13).

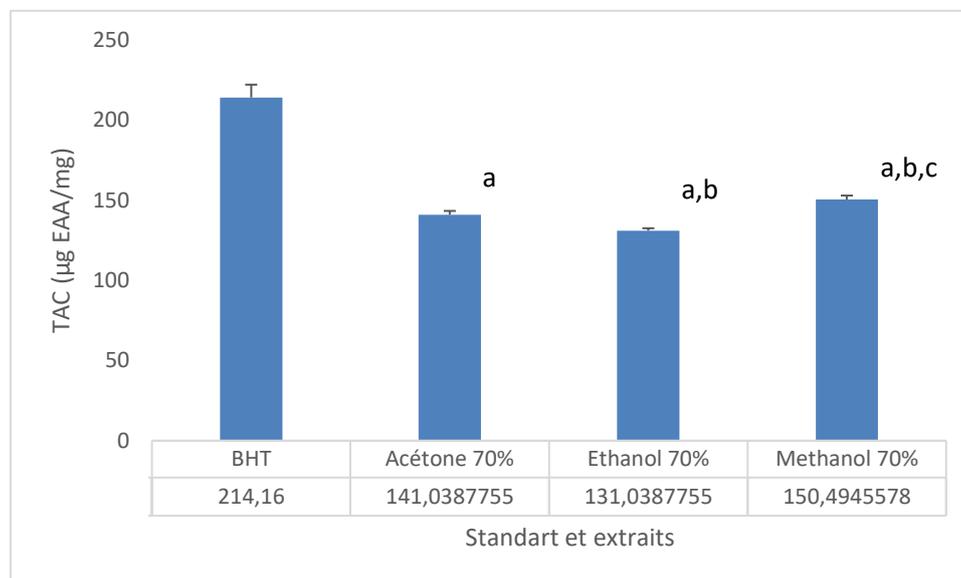


Figure 13 Capacité antioxydant totale des extraits de *Olea europaea* L. var. *sylvestris*

- (a) Différence très hautement significative par rapport au BHT ($p < 0,001$).
- (b) Différence hautement significative par rapport à l'extrait acétone ($p < 0,01$).
- (c) Différence très hautement significative par rapport l'extrait éthanol ($p < 0,001$).

4.2. Piégeage du radical libre DPPH

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa solubilité, et la simplicité de l'analyse (Bozin et al., 2008).

La capacité antioxydante des extraits de la plante est mesurée en termes de capacité de piégeage des radicaux en suivant la réduction de l'absorbance d'une solution de DPPH qui s'accompagne par un passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm. L'intensité de cette couleur est inversement proportionnelle à la capacité des

antioxydants présents dans le milieu réactionnel.

Les résultats obtenus révèlent que la capacité antioxydante des extraits étudiés est classée dans l'ordre décroissant suivant : méthanol > éthanol > acétone. L'extrait méthanolique semble être le plus actif avec une IC₅₀ égale à 0,56 mg/ml suivi de l'extrait éthanolique avec une valeur de 0,60 mg/ml puis l'extrait acétonique avec une valeur de 0,61 mg/ml (figure 14). Dans ce test, plusieurs antioxydants standards ont été utilisés à des fins comparatifs ; la quercétine, la vit c et le BHA qui ont montré une activité antiradicalaire très puissante avec des IC₅₀ de 0,142 mg/ml, 0,103 mg/ml et 0,65 mg/ml, respectivement.

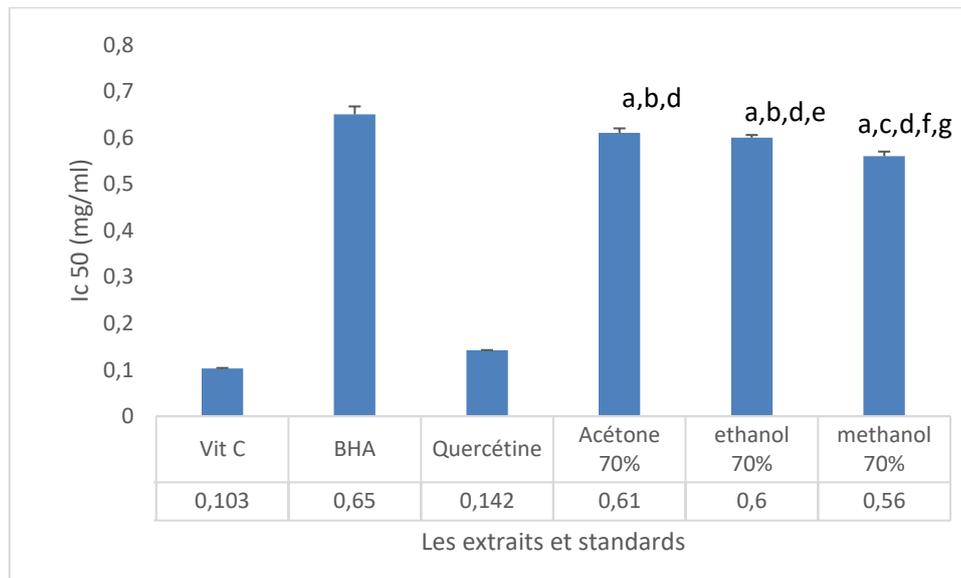


Figure 14 Activité scavenger des différents extraits de *Olea europaea* L. à l'égard du radical DPPH.

- (a) : Différence très hautement significative par rapport à l'acide ascorbique ($p < 0,001$).
- (b) : Différence significative par rapport au BHA ($p < 0,05$).
- (c) : Différence hautement significative par rapport au BHA ($p < 0,01$).
- (d) : Différence très hautement significatif par rapport à la quercitrine ($p < 0,001$)
- (e) : Différence significative par rapport à l'extrait acétone ($p < 0,05$).
- (f) : Différence hautement significative par rapport à l'extrait acétone ($p < 0,01$).
- (g) : Différence hautement significative par rapport à l'extrait éthanol ($p < 0,01$).

Dans ce travail, les extraits de notre plante montrent une activité antiradicalaire importante vis-à-vis du radical DPPH. Cette estimation est basée sur la comparaison de nos résultats avec les résultats obtenus par **Addab et al. (2020)**.

L'activité antioxydante dépend généralement du nombre et de la position des groupements hydroxyles par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels, La structure

des composés phénoliques est un facteur déterminant de piégeage des radicaux libres qui sont des pathogènes dans de nombreuses maladies (Sas et al., 2007).

4.3. Pouvoir réducteur du fer ferrique

D'après les valeurs d'absorbance des diverses solutions d'extrait des feuilles de *Olea europaea* L. var. *sylvestris* et d'après les avoir convertis en matière de masse en se servant de la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions de dosage des extraits (annexe), on a fait ressortir une activité réductrice de fer (figure 15).

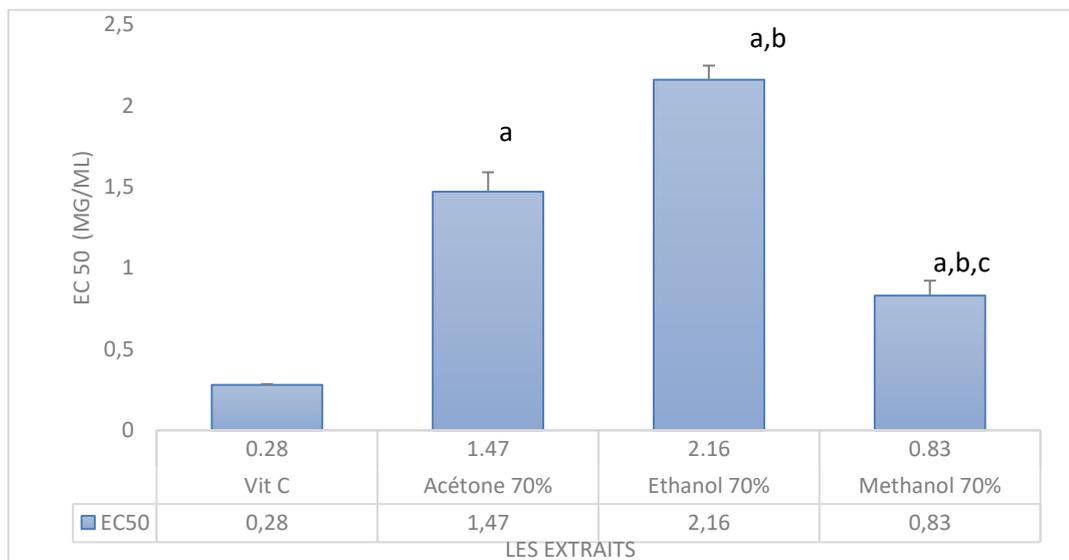


Figure 15 Pouvoir réducteur de fer ferrique des différents extraits de *Olea europaea* L. var. *sylvestris*.

- (a) Différence très hautement significative par rapport à la vitamine C ($p < 0,001$).
- (b) Différence très hautement significative par rapport à l'extrait acétone ($p < 0,001$).
- (c) Différence très hautement significative par rapport à l'extrait éthanol ($p < 0,001$).

D'après les résultats qui expriment la capacité réductrice des extraits des feuilles d'*O.europaea*, nous avons constaté une corrélation entre les teneurs en polyphénols et les propriétés anti-oxydantes. La présence de réducteurs (comme antioxydants) provoque la conversion du complexe Fe^{3+} ferricyanure à la forme ferreuse Fe^{2+} . Bien que le fer soit essentiel pour le transport d'oxygène pour la respiration et l'activité des enzymes, il s'agit d'un métal réactif qui catalyse des dommages oxydatifs dans les tissus vivants et les cellules (Bougandoura et al., 2012).

Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants. Quelques études antérieures ont aussi démontré que le pouvoir

réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Bourgou et al., 2008**).

Cependant, l'activité antioxydante des extraits végétaux dépend de plusieurs facteurs tels que la teneur en divers antioxydants, les conditions climatiques de croissance et le stade de maturité, la température et durée de stockage, la teneur en eau et le pH, le type et la polarité du solvant d'extraction, les méthodes de séparation et la pureté des composés bioactifs, ainsi que les techniques d'analyse et le substrat utilisé (**Prior et al., 1998 ; Amin et al., 2004 ; Zhao et al., 2007**).

*Conclusion et
perspectives*

Les plantes médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore en majorité sous exploitées dans le domaine médical.

Dans l'industrie pharmaceutique, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydant d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour. Le présent travail repose sur l'étude physicochimique, phytochimique et l'activité antioxydante de différents extraits de la plante *Olea europaea* L. var. *sylvestris*, de la région de Tefreg de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, préparés par macération dans trois solvants de différente polarité ; l'acétone, l'éthanol et le méthanol.

L'analyse physicochimique a montré que la poudre des feuilles de la plante étudiée présente des faibles taux d'humidité, des cendres et des lipides.

La procédure d'extraction par les trois solvants a permis d'obtenir des résidus bruts sous forme de poudre de couleur marron, avec des rendements variables.

L'analyse phytochimique des extraits a révélé que les teneurs des substances bioactives, en particulier, les polyphénols et les flavonoïdes sont importantes dans l'extrait méthanolique suivi de l'extrait acétonique et l'extrait éthanolique. Cependant, l'extrait acétonique présent des concentrations élevées en tanins condensés, chlorophylle a et b, lycopène et β carotène par rapport aux autres extraits (éthanolique et méthanolique). Notre plante contient une quantité considérable des caroténoïdes.

D'autre part, l'étude du potentiel anti-oxydant effectué par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, la capacité antioxydante totale (TAC) et le pouvoir réducteur de fer (FRAP) a montré que la plupart des extraits exhibent un pouvoir antioxydant important, toutefois, l'extrait méthanolique a donné les meilleurs résultats avec tous les paramètres étudiés.

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires approfondies à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée de ces extraits par d'autres techniques telles que la CPG/SM ou HPLC/SM afin de bien établir une relation structure-activité. Il s'avère aussi intéressant d'évaluer des autres activités biologiques de la plante (activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-hémolitique et anti-diabétique).

Références
bibliographiques

Abdille M.H., Singh R.P., Jayaprakasha G.K., & Jena B.S., 2005 : Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chemistry*, 90 (4). 891- 896.

Addab Naziha., Samira Fetni., Fatma Hamlaoui., Abir Zerguine. & Kalthoum Mahloul., 2020 : Evaluation comparative de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles d'*Olea europaea* L. de l'Est Algérien. *Journal de la faculté de médecine d'Oran*, 4(2):579- 586. <https://doi.org/10.51782/jfmo.v4i2.106>.

Adida H., Benariba N., Bechiri A., Chekroun E. & Djaziri R., 2016 : Phytochemical study and evaluation of the antiradical activity of extracts of *Pituranthos scoparius*. *Phytothérapie* 45:441-450.

Altok E., 2010: Having antimicrobial and antioxidant characteristics from local plants. *Recovery of phytochemicals*

Amin I., Zamaliah M. M. & Chin W. F., 2004: Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry* 87: 581-586.

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

Attabi B., 2012 : Étude comparative de l'activité antioxydante de cinq plantes médicinales 35.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS), 1990: Official methods and recommended practices, 4 th. Ed.

Bahloul N., Kechaou N. & Mihoubi N. B., 2014 : Comparative Investigation of Minerals, Chlorophylls Contents, Fatty Acid Composition and Thermal Profiles of Olive Leaves (*Olea Europea* L.) as by-Product. *Grasas y Aceites* 65 (3): e035.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M. & Cazin JC., 1996 : Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung* 46(11):1086-1089.

Ba K., Emmanuel T., Jacqueline D., Ndiaga C. & Philippe T., 2010 : Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt . *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(1), 131-139

Benhamou N. & Rey P., 2012 : Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. I. *Principes de la résistance induite. Phytoprotection* 92 : 1-23.

Bougandoura, N. & Bebdimerad N., 2012 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*, 9, 14-15.

Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H. & Marzouk B., 2008 : Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies* . 331 (1):48-55

- Brahmi, Faten., Beligh Mechri., Madiha Dhibi. & Mohamed Hammami., 2013:** « Variations in Phenolic Compounds and Antiradical Scavenging Activity of *Olea Europaea* Leaves and Fruits Extracts Collected in Two Different Seasons ». *Industrial Crops and Products* 49 (août): 256-64. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.042>.
- Bozin, B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A. & Igc R., 2008:** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae) *Food Chemistry* 111: 925–929.
- Bravo L., 1998:** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56(11): 317-33.
- Breton C., & Bervillé A., 2012 :** Histoire de l'olivier : *arbre des temps*. Ed. Quae. RD 10 : 160 p. ; 524-200
- Camille Migdal. & Mireille Serres., 2011 :** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant: *médecine/sciences* ; 27 : 405-12.
- Claude M. M. & Françoise D., 2007 :** *Herbier méditerranéen*. Paris, P : 9
- Fettah, A., 2019 :** Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante *Teucrium polium* L. sous espèce Thymoïdes de la région Beni Souik, Biskra. *Doctoral dissertation*, Université Mohamed Khider, Biskra. 94p.
- Fukumoto L. R. & Mazza G., 2000:** Assessing antioxidant and prooxidant activities of Phenolic compound. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48: 3597-3604.
- Garcia OB., Castillo J., Lorente J. & Ortuno A., 2000 :** Del-Rio, JA Activité antioxydante de composés phénoliques extraits de feuilles d' *Olea europea* L. *FoodChem.* , 68 , 457– 462.
- George S. & Vincent S., 2005:** Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. Juss against mosquitoes. *J. Vect. Borne Dis.*, 42 (4): 159-163.
- Ghedira K., 2008 :** L'olivier. *Phytothérapie*. 6; 83-89.
- Ghedira K., 2005 :** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3(4), 162-169.
- Ghanbari Rahele., Farooq Anwar., Alkharfy Khalid M., Gilani Anwarul-Hassan. & Saari Nazamid., 2012:** Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europea* L.)—A Review. *Int.J. Mol. Sci* ; 13, 3291-3340.
- Hagerman AE., 1988:** Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *Journal of Chemical Ecology* 14(2): 453-61.
- Hans W. & Kothe., 2007:** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Edition Toulouse, P: 221.
- Hernandez B., Cotton F. & Campillo M., 1999 :** Contribution de l'interférométrie radar à une inversion en deux étapes du processus cinématique du séisme de Landers en 1992. *J. Geophys. Res.*, 104 (B6): 13083-13099.
- Higdon J., 2004:** Antioxidant Vitamins and Health: Cardiovascular Disease, Cancer, Cataracts, and Aging. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80(1): 239-239.

Iserin, P., Masson M., Restellini J., P, Ybert E., De laage de meus A., Moulard F., Zha E., De la roque R., De la roque O., Vican P., Deesalle -feat T., Biaujeaud, M., Ringuet J., Bloth J. & Botrel A., 2001 : Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. 2^{ème} édition de Vuef, Hong Kong, 335p.

Jean B., 2009 : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales 4^{ème} édition 1289 p.

Karagozler A., Erdag B. & Calmaz Emek Y., 2008: Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chem*;111:400-407.

Karl K. Rozman,, John Doull., Wayland J. Hayes., 2010: Chapter 1 - Dose and Time Determining, and Other Factors Influencing, Toxicity, Editor(s): Robert Krieger, Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition), *Academic Press*, Pages 3-101,

Keller R., 1994 : La constitution du bois. Chapitre 1 de l'ouvrage «Le bois matériau d'ingénierie». ARBOLOR. Nancy, 433p.

Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Hamdi B. & Chaieb K., 2009: Antioxydant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol*; 47:2083–91.

Lardon R. A., 1988: The antioxydants of higher plants. *Phytochemistry* 27 :969.

Lee O. H., Lee B. Y., Lee J., Lee H. B., Son J. Y., Park C. S & Kim Y. C., 2009: Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxydant activities. *Bioresource technology*, 100 (23) : 6107-6113.

Li Z., Li J., Menzel W. P., Schmit T. J. & Ackerman S. A., 2007: Comparison between current and future environmental satellite imagers on cloud classification using MODIS. *Remote Sensing of Environment* 108: 311–326.

Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. & Kefalas P., 2005 : Phenolic profile and antioxydant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* 89, 411–420.

Mezouar D., Azzi R., Abbou F., Mouderas F., Aissaoui M. & Lahfa F., 2021: « Alpha-amylase inhibitory activity and antioxydant effect of *Olea var. europaea sylvestris* leaves extracts». *Genet. Biodiv. J*, Special issue (*Aromatic and Medicinal Plants*), 146-158.

Nagata M. & Yamashita I., 1992: Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *J. Japan. Soc Food Sci Technol*, 39 (10), 925-928.

Naumann H. D., Tedeschi L. O., Zeller W. E. & Huntley N. F., 2017: The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46, 929-949.

Nijveldt R. J., Nood E., Hoorn D. E., Boelens P. G., Norren K. & Leeuwen P.A., 2001: Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74(4):418-25.

Orgogozo J. M., Dartigues J. F., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., Salamon R., Renaud S. & Breteler M. B., 1997: Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Revue Neurologique* 153(3):185-92.

Oyedemi S. O & Afolayan A. j., 2011: In vitro and in vivo Antioxidant Activity of Aqueous Leaves Extract of *Leonotis* (L.) R.Br. *International Journal of Pharmacology*. 7(2): 248-256.

Pan L., Woodruff E., Liang P. & Broadie K., 2008: Mechanistic relationships between *Drosophila* fragile X mental retardation protein and metabotropic glutamate receptor A signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* 37(4): 747--760.

Pelzer L., Guardia T., Juarez A. O. & Guerreiro E., 1998: Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco* 53 (6): 421-424.

Popovici C., Saykova I., & Tylkowskib., 2010 : Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4), 1– 8.

Porter L. J., Hrstich L. N. & Chan B. G., 1986: The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223-230.

Prieto P., Pineda M. & Aguilar M., 1999: Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269, 337-341.

Prior R. L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G. & Mainland C. M., 1998: Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 2686-2693.

Rodriguez-Amaya, D. B., 2001: A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI Human Nutrition Institute. One Thomas Circle, NW, *Washington DC*, 20005-5802, 64.

Sanchez C., Galve-Roperh I., Rueda D. & Guzman M., 1998: Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol.* 1998;54:834–843.

Santos R. D., Shetty K., Lourenco A. & Miglioranza L., 2012: Phenolic compound and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extract. DOI: 10.5433/1679- 0359.2012v33, N2, p655.

Sas K., Robotka H., Toldi J. & Vecsei L., 2007: Mitochondrial, metabolic disturbances, oxidative stress and kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* 257 : 221–239.

Sass-Kiss A., Kiss j., Milotay P., Kerek M. M. & Toth-Markus M., 2005: Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruit and vegetables. *Food research international*, 20:1023-1029.

Schofield P., Mbugua David. & pell, Alice., 2001: Analysis of condensed tannins: A review. *Animal feed science and technology – ANIM FEED SCI TECH.* 91. 21-40. 10.1016/S0377-841(01)00228-0.

Singleton, V. L. & Rossi J. A., 1965: Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic phosphotungstic acids reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.

Smeriglio A., Barreca D., Bellocco E. & Trombetta D., 2017: Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 174, 1244-1262.

Takashi Maoka., 2020: Carotenoids as natural functional pigments **Journal of Natural Medicines (2020)** 74:1–16.

Talbi H. A., Boumaza K., El-mostafa J., Talbi A., Hilali., 2015: Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.): *Mater. Environ. Sci.* 6 (4) (2015) 1111-1117.

Tapas, A. R., Sakarkar D. M. & Kakde R. B., 2008 : Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.

Thomas D., 2016 : Les antioxydants de nos jours. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, 49p.

Touaibia, Mb. & Chaouch F. Z., 2014 : Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt et Trab. (Myrtaceae) [Evaluation of the antioxidant activity of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of the Sahara-endemic species *Myrtus nivellei* Batt and Trab. (Myrtaceae)]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 6 (3), 407.

Velu S. S., Buniyamin I., Ching L. K., Feroz F., Noorbacha, I. & Gee L. C., 2008: Regio- and stereoselective biomimetic synthesis of oligostilbenoid dimers from resveratrol analogues: influence of the solvent, oxidant, and substitution. *Chemistry Weinheim an der Bergstrasse, Germany* 14(36):11376-84.

Wainstein J., Ganz T., Boaz M., Bar Dayan Y., Dolev E., Kerem Z & Madar Z., 2013: Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Natural medicine* ; 01-477.

Yamamura S., Ozawa K., Ohtani K., Kasai R. & Yamasaki K., 1998: Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry* 48 (1):131-136.

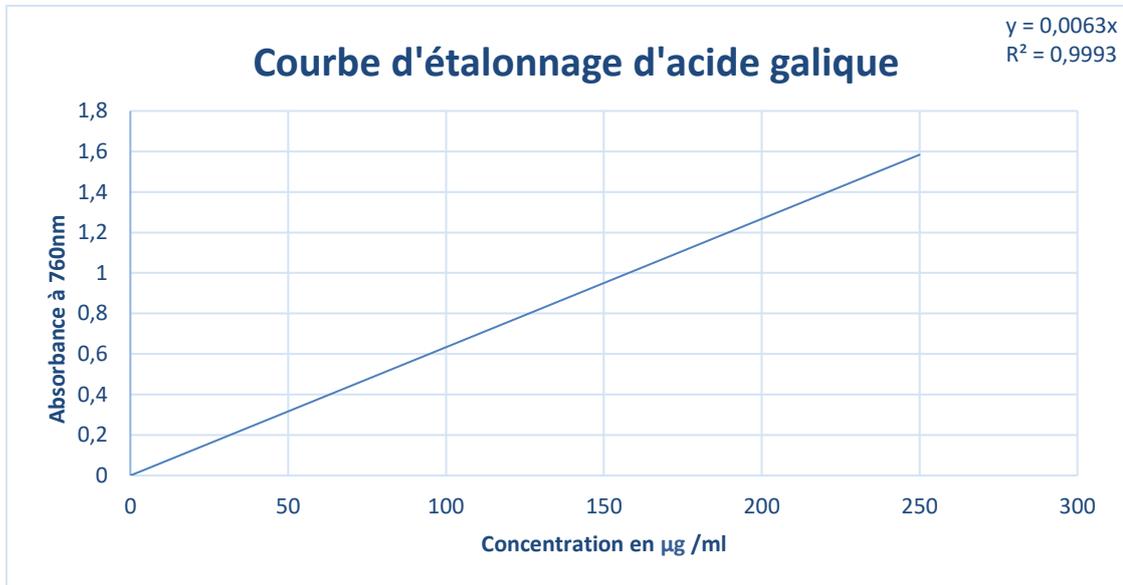
Yaye YG., KRA AKM., Ackah JAAB & Djaman AJ., 2001 : Evaluation de l'activité antifongique et essai de purification des principes actifs des extraits de *Terminalia mantaly* (h.perrier), une combretacée, sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* (2011) 80, 953-964

Zhao X., Iwamoto T. & Carey E. E., 2007: Antioxidant capacity of leafy vegetables as affected by high tunnel environment, fertilisation and growth stage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 2692-2699

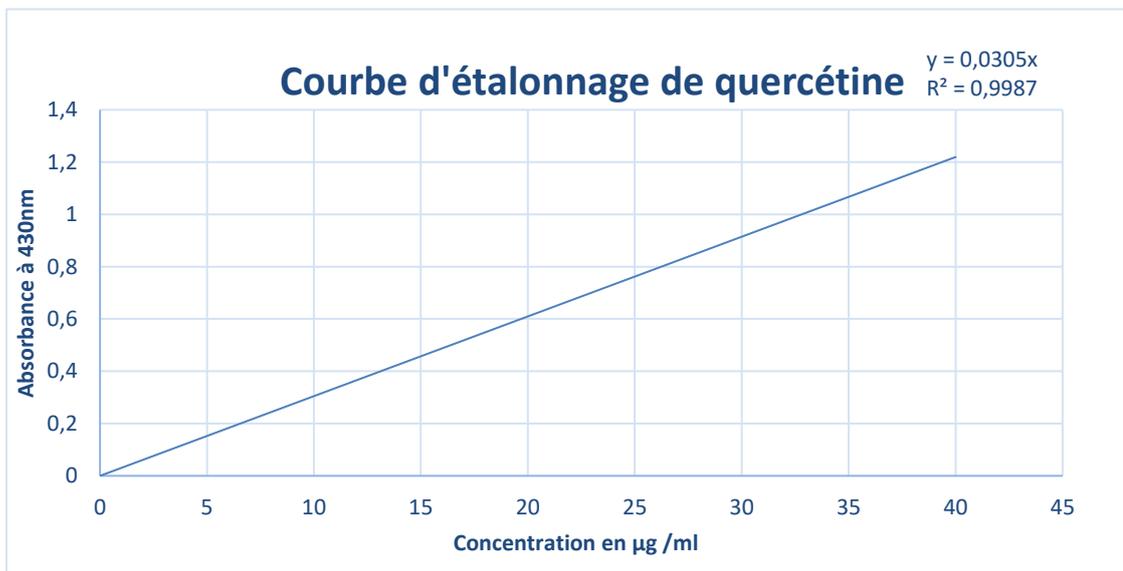
Annexe

Courbes d'étalonnage

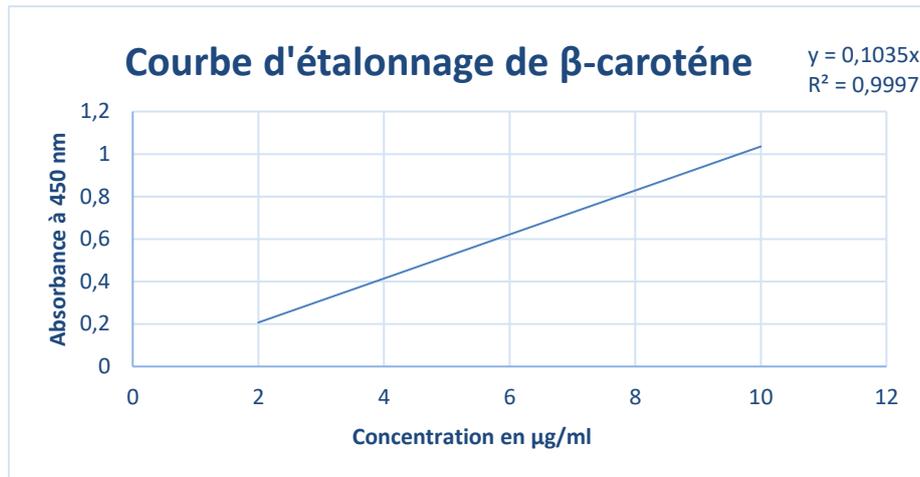
Courbe d'étalonnage pour dosage des polyphénols



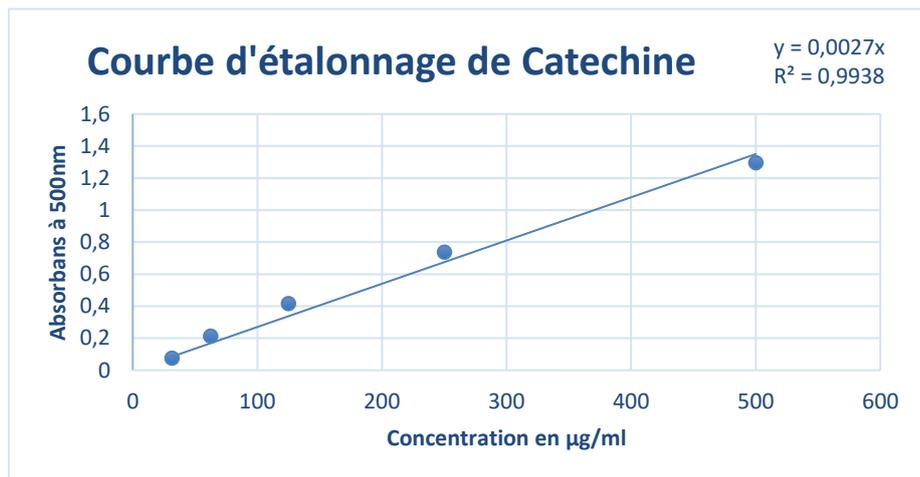
Courbe d'étalonnage pour dosage des flavonoïdes



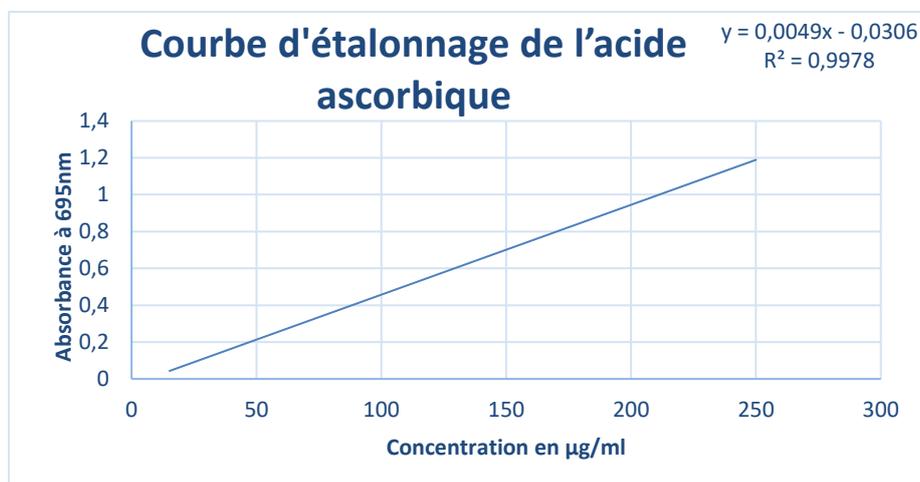
Courbe d'étalonnage pour dosage des caroténoïdes



Courbe d'étalonnage pour dosage des tanins condensés « Pro-anthocyanidines »



Courbe d'étalonnage pour dosage de l'activité antioxydante totale



Résumés

Olea europaea, c'est une plante vivace connue depuis l'antiquité et présente plusieurs vertus médicinales.

L'objectif de notre travail est de quantifier la teneur en substances bioactives ; polyphénols, flavonoïdes, tanins condensés, pigments chlorophylliens, caroténoïdes et d'évaluer l'activité antioxydante *in-vitro* des extraits des feuilles de *Olea europaea* L. var. *sylvestris*. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests suivant : la capacité antioxydante totale (TAC), le Piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur de fer (FRAP).

L'étude physicochimique a révélé que notre échantillon contient environ 8,23% d'eau, 3,51% des sels minéraux et 2,81 % de matière grasse.

L'échantillon a été soumis à une macération dans trois extraits de polarité différente ; le méthanol, l'acétone et l'éthanol. Les rendements obtenus sont respectivement de 35%, 36,98% et 37,65%.

L'analyse phytochimique des trois extraits a montré la richesse de cette espèce en métabolites secondaires et particulièrement en polyphénols ($139,36 \pm 0,75$ μg EAG/mg ES) pour l'extrait acétonique, ($129,09 \pm 1,75$ μg EAG/mg ES) pour l'extrait éthanolique et ($150,20 \pm 0,72$ μg EAG/mg ES) pour l'extrait méthanolique) et flavonoïdes ($16,74 \pm 0,64$, $12,36 \pm 0,39$ et $10,21 \pm 0,80$ μg EAG/mg ES) pour l'extrait méthanolique, acétonique et éthanolique, respectivement.

Les feuilles d'*Olea europaea* ont révélé une activité antioxydante importante avec une capacité antioxydante totale (EC50) de l'ordre de ($150,49 \pm 2,46$, $131,03 \pm 1,54$ et $141,03 \pm 2,35$ μg EAA/mg ES), une activité réductrice de fer de l'ordre de (0,83, 2,16 et 1,47 mg/ml) et IC50 de piégeage de DPPH est estimé à (0,56, 0,60 et 0,61 mg/ml), respectivement, pour l'extrait méthanolique, éthanolique et acétonique.

On peut considérer le méthanol comme le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques d'*Olea europaea* et par conséquent l'extrait méthanolique est doué de la meilleure capacité antioxydante.

Mots clés : *Olea europaea* L. var. *sylvestris*, polyphénol, flavonoïdes, activité antioxydante, TAC, DPPH, FRAP.

Abstract

Olea europaea is a perennial plant known since antiquity and has several medicinal virtues.

The objective of our work is to quantify the content of bioactive substances; polyphenols, flavonoids, condensed tannins, chlorophyll pigments, carotenoids and to evaluate the antioxidant activity *in-vitro* of the extracts of *Olea europaea* L. var. *sylvestris* leaves. The antioxidant activity was evaluated using the following tests: total antioxidant capacity (TAC), DPPH radical scavenging and iron reducing power (FRAP).

The physicochemical study of the plant powder revealed that our sample contains about 8.23% of water, 3.51% of mineral salts and 2.81% of fat.

The sample was subjected to maceration in three extracts of different polarity; methanol, acetone and ethanol. The yields obtained are respectively 35%, 36.98% and 37.65%.

The phytochemical analysis of the three extracts showed the richness of this species in secondary metabolites, particularly in polyphenols (150.20 ± 0.72 μg EAG/mg DE for the methanolic extract, 139.36 ± 0.75 μg EAG/mg DE for the acetonic extract and 129.09 ± 1.75 μg EAG/mg DE for the ethanolic extract) and in flavonoids (16.74 ± 0.64 , 12.36 ± 0.39 and 10.21 ± 0.80 μg EAG/mg DE) for the methanolic, acetonic and ethanolic extracts, respectively.

Olea europaea L. leaves revealed significant antioxidant activity with total antioxidant capacity in the range of (150.49 ± 2.46 ; 131.03 ± 1.54 ; 141.03 ± 2.35 μg EAA/mg DE), iron reducing activity (EC₅₀) in the range of (0.83 ; 2.16 ; 1.47 mg/ml) and IC₅₀ of DPPH scavenging test is estimated at (0.56 ; 0.60 ; 0.61 mg/ml), respectively, for methanolic, ethanolic and acetonic extract.

Methanol can be considered as the effective solvent for the extraction of phenolic compounds from *Olea europea* L. and consequently the methanolic extract is endowed with the strongest antioxidant capacity.

Keywords: *Olea europaea* L. var. *sylvestris*, polyphenol, flavonoids, antioxidant activity, TAC, DPPH, FRAP.

الملخص

Olea europaea هو نبات دائم معروف منذ العصور القديمة وله عدة فضائل طبية.

الهدف من هذه الدراسة هو التحليل الكمي لمحتوى المواد الحيوية بوليفينول، فلافونويد، صبغات الكلوروفيل، كاروتينويد و تقييم نشاط مضاد الاكسدة الخارج خلوي لمستخلصات أوراق الزيتون. ولتقييم هذا النشاط اجريت الاختبارات التالية: القدرة الكلية على مكافحة الأكسدة (TAC)، القدرة الارجاعية للحديد (FRAP)، القدرة على محاصرة المؤكسد (DPPH).

كشفت الدراسة الفيزيوكيميائية أن عينتنا من مسحوق النبات تحتوي على حوالي 8.23% ماء، و 3.51% من الأملاح المعدنية و 2.81% من الدهون.

وقد تم اجراء نقع العينة في ثلاثة مذيبات مختلفة القطبية: الميثانول، الأسيتون و الإيثانول. اما مردود المستخلصات فهي على التوالي 35, 36.98 و 37.65 بالمائة.

وأظهر التحليل الكيمونباتي للمستخلصات الثلاث ثراء هذا النوع من النباتات بالمستقلبات الثانوية وخاصة البوليفينول (150.20 ± 0.72 ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك/مليغرام مستخلص جاف) لمستخلص الميثانول ، (139.36 ± 0.75 ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك/مليغرام مستخلص جاف) لمستخلص الاسيتون، (129.09 ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك/مليغرام مستخلص جاف) لمستخلص الايثانول اما الفلافونويد (10.21 ± 0.80 , 12.36 ± 0.39 , 16.74 ± 0.64 ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك/مليغرام مستخلص جاف) لمستخلصات الميثانول، الاسيتون و الايثانول على التوالي.

اظهرت أوراق الزيتون نشاطا مضاد للاكسدة مهما. مع قدرة كلية مضادة للاكسدة قدرت بالترتيب (150.49 ± 1.54 , 131.03 ± 2.46 و 141.03 ± 2.35 ميكروغرام مكافئ لحمض الاسكوريبيك/مليغرام مستخلص جاف). و قدرة الارجاعية للحديد (0.83 , 2.16 و 1.47 /ملييلتر). و قدرة على محاصرة المؤكسد DPPH (0.56 , 0.60 و 0.61 /ملييلتر) على التوالي لمستخلصات الميثانول، الايثانول و الاسيتون.

يمكن اعتبار الميثانول أفضل مذيب لاستخراج المركبات الفينولية من أوراق الزيتون، وبالتالي فإن مستخلص الميثانول لديه أفضل قدرة مضاد الأكسدة.

الكلمات الدالة: *Olea europaea* ، بوليفينول، فلافونويد ،القدرة المضادة للاكسدة، FRAP TAC ،

DPPH,

Résumés

Olea europaea, c'est une plante vivace connue depuis l'antiquité et présente plusieurs vertus médicinales. L'objectif de notre travail est de quantifier la teneur en substances bioactives ; polyphénols, flavonoïdes, tanins condensés, pigments chlorophylliens, caroténoïdes et d'évaluer l'activité antioxydante *in-vitro* des extraits des feuilles de *Olea europaea* L. var. *sylvestris*. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests suivants : la capacité antioxydante totale (TAC), le Piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur de fer (FRAP). L'étude physicochimique a révélé que notre échantillon contient environ 8,23% d'eau, 3,51% des sels minéraux et 2,81 % de matière grasse. L'échantillon a été soumis à une macération dans trois extraits de polarité différente ; le méthanol, l'acétone et l'éthanol. Les rendements obtenus sont respectivement de 35%, 36,98% et 37,65%. L'analyse phytochimique des trois extraits a montré la richesse de cette espèce en métabolites secondaires et particulièrement en polyphénols ($139,36 \pm 0,75 \mu\text{g EAG/mg ES}$) pour l'extrait acétonique, ($129,09 \pm 1,75 \mu\text{g EAG/mg ES}$) pour l'extrait éthanolique et ($150,20 \pm 0,72 \mu\text{g EAG/mg ES}$) pour l'extrait méthanolique) et flavonoïdes ($16,74 \pm 0,64$, $12,36 \pm 0,39$ et $10,21 \pm 0,80 \mu\text{g EAG/mg ES}$) pour l'extrait méthanolique, acétonique et éthanolique, respectivement. Les feuilles d'*Olea europaea* ont révélé une activité antioxydante importante avec une capacité antioxydante totale (EC50) de l'ordre de ($150,49 \pm 2,46$, $131,03 \pm 1,54$ et $141,03 \pm 2,35 \mu\text{g EAA/mg ES}$), une activité réductrice de fer de l'ordre de ($0,83$, $2,16$ et $1,47 \text{ mg/ml}$) et IC50 de piégeage de DPPH est estimé à ($0,56$, $0,60$ et $0,61 \text{ mg/ml}$), respectivement, pour l'extrait méthanolique, éthanolique et acétonique. On peut considérer le méthanol comme le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques d'*Olea europaea* et par conséquent l'extrait méthanolique est doué de la meilleure capacité antioxydante.

Mots clés : *Olea europaea* L. var. *sylvestris*, polyphénol, flavonoïdes, activité antioxydante, TAC, DPPH, FRAP.

Abstract

Olea europaea is a perennial plant known since antiquity and has several medicinal virtues. The objective of our work is to quantify the content of bioactive substances; polyphenols, flavonoids, condensed tannins, chlorophyll pigments, carotenoids and to evaluate the antioxidant activity *in-vitro* of the extracts of *Olea europaea* L. var. *sylvestris* leaves. The antioxidant activity was evaluated using the following tests: total antioxidant capacity (TAC), DPPH radical scavenging and iron reducing power (FRAP). The physicochemical study of the plant powder revealed that our sample contains about 8.23% of water, 3.51% of mineral salts and 2.81% of fat. The sample was subjected to maceration in three extracts of different polarity; methanol, acetone and ethanol. The yields obtained are respectively 35%, 36.98% and 37.65%. The phytochemical analysis of the three extracts showed the richness of this species in secondary metabolites, particularly in polyphenols ($150.20 \pm 0.72 \mu\text{g EAG/mg DE}$ for the methanolic extract, $139.36 \pm 0.75 \mu\text{g EAG/mg DE}$ for the acetonetic extract and $129.09 \pm 1.75 \mu\text{g EAG/mg DE}$ for the ethanolic extract) and in flavonoids (16.74 ± 0.64 , 12.36 ± 0.39 and $10.21 \pm 0.80 \mu\text{g EAG/mg DE}$) for the methanolic, acetonetic and ethanolic extracts, respectively. *Olea europaea* L. leaves revealed significant antioxidant activity with total antioxidant capacity in the range of (150.49 ± 2.46 ; 131.03 ± 1.54 ; $141.03 \pm 2.35 \mu\text{g EAA/mg DE}$), iron reducing activity (EC50) in the range of (0.83 ; 2.16 ; 1.47 mg/ml) and IC50 of DPPH scavenging test is estimated at (0.56 ; 0.60 ; 0.61 mg/ml), respectively, for methanolic, ethanolic and acetonetic extract. Methanol can be considered as the effective solvent for the extraction of phenolic compounds from *Olea europaea* L. and consequently the methanolic extract is endowed with the strongest antioxidant capacity.

Keywords: *Olea europaea* L. var. *sylvestris*, polyphenol, flavonoids, antioxidant activity, TAC, DPPH, FRAP.

المخلص

Olea europaea هو نبات دائم معروف منذ العصور القديمة وله عدة فضائل طبية. الهدف من هذه الدراسة هو التحليل الكمي لمحتوى المواد الحيوية بوليفينول، فلافونويد، صبغات الكلوروفيل، كاروتينويد و تقييم نشاط مضاد الأكسدة الخارج خلوي لمستخلصات أوراق الزيتون. ولتقييم هذا النشاط اجريت الاختبارات التالية: القدرة الكلية على مكافحة الأكسدة (TAC)، القدرة الارجاعية للحديد (FRAP)، القدرة على محاصرة المؤكسد (DPPH). كشفت الدراسة الفيزيوكيميائية أن عينتنا من مسحوق النبات تحتوي على حوالي 8.23% ماء، و 3.51% من الأملاح المعدنية و 2.81% من الدهون. وقد تم اجراء نفع العينة في ثلاثة مذيبات مختلفة القطبية: الميثانول، الأسيتون و الإيثانول. اما مردود المستخلصات فهي على التوالي 36.98، 37.65 و 37.65 بالمائة. وأظهر التحليل الكيمونباتي للمستخلصات الثلاث ثراء هذا النوع من النباتات بالمستقلبات الثانوية وخاصة البوليفينول (150.20 ± 0.72) ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك/مليغرام مستخلص جاف (مستخلص الميثانول)، (139.36 ± 0.75) ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك/مليغرام مستخلص جاف (مستخلص الاسيتون)، (129.09) ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك/مليغرام مستخلص جاف (مستخلص الميثانول)، (16.74 ± 0.64 ، 12.36 ± 0.39 و 10.21 ± 0.80) ميكروغرام مكافئ لحمض الغاليك/مليغرام مستخلص جاف (مستخلص الميثانول، اسيتون و الإيثانول، على التوالي). أظهرت أوراق الزيتون نشاطا مضاد للأكسدة مهما. مع قدرة كلية مضادة للأكسدة قدرت بالترتيب (150.49 ، 131.03 ، 1.54 ± 2.46 و 141.03 ± 2.35) ميكروغرام مكافئ لحمض الاسكوربيك/مليغرام مستخلص جاف، و قدرة الارجاعية للحديد (0.83 ، 2.16 و 1.47 /مليغرام /مليغرام). و قدرة على محاصرة المؤكسد DPPH (0.56 ، 0.60 ، 0.61) /مليغرام /مليغرام على التوالي لمستخلصات الميثانول، الإيثانول و الاسيتون. يمكن اعتبار الميثانول أفضل مذيب لاستخراج المركبات الفينولية من أوراق الزيتون، وبالتالي فإن مستخلص الميثانول لديه أفضل قدرة مضاد الأكسدة.

الكلمات الدالة: *Olea europaea*، بوليفينول، فلافونويد، القدرة المضادة للأكسدة، TAC، DPPH، FRAP