

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Kasdi Merbah-Ouargla
Faculté des Mathématiques et des Sciences de la matière
Département de Chimie**



MEMOIRE

Présenté par

Melle MAHDJOUBI Roumaïssa

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Chimie

Option : Chimie Organique

Thème :

**Etude de la relation Structure –Rétention de l'oleuropéine et de
ses dérivés par HPLC et application de leur analyse qualitative
dans l'extrait non volatil issu des feuilles d'olivier de la région
de Ouargla**

Soutenu le : 01/ 10/ 2020 Devant le jury composé de :

Mme. BOUZIANE Mebarka	M.C.A	Président
Mr HADJ-MAHAMMED Mahfoud	Professeur	Rapporteur
Melle ALLAOUI Messaouda	M.C.A	Examineur
Melle TLILI Ahlem	Doctorante	Co-Rapporteur

Année universitaire : 2019 / 2020

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À Mes Chers Parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À Mes sœurs et mes frères :

*soumia, Aicha, Othmane, Abdelkader, Sofiane, Rabab, Souhaib, Hana,
Ichrak, Salah et Tasnimme*

À ma chère grand-mère

À Mes belles-sœurs

Manel et Houda

A toute ma famille

A mes chères amies

*Surtout Roumaissa, Nesrine et Ferial ,Pour leur soutien et leur assistance dans
toutes les v*

A mes collègues

*Sofiane Bougrine , Abd el Moumene Kaja, Jilali Zawi , Nabil Kniwa,
Mohammed el Amine Belahcene*

À toutes les personnes qui ont participé à l 'élaboration de ce travail

Remerciements

Avant toute chose, Je remercie Allah, le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour terminer ce travail.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à monsieur **HADJ MAHAMMED Mahfoud**, Professeur à la faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université KASDI MERBAH, Ouargla, pour son aide précieuse et ses conseils éclairés dans la direction de mon travail, ainsi que pour sa grande disponibilité et son immense gentillesse. Je le remercie pour son accueil au laboratoire de *Biogéochimie des Milieux Désertiques* de l'université KASDI MERBAH, Ouargla.

Je remercie également sincèrement **Melle Tlili Ahlem**, qui était comme une sœur et une amie, pour avoir dirigé ce travail, et pour son aide et ses conseils afin que je finalise ce mémoire de la meilleure des façons.

Je tiens à remercier **Mme Bouziane Mebarka, Maitre de Conférences A**, qui a bien voulu accepter de présider le jury de ce mémoire.

Je remercie également, **Melle Allaoui Messaouda Maitre de Conférences A**, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Qu'elles trouvent ici l'expression de notre grande considération.

Enfin, je remercie l'ensemble des membres du laboratoire « *Biogéochimie des Milieux Désertiques* » de l'université KASDI MERBAH Ouargla, sans exception pour toute leur aide et leur esprit de famille.

Liste des figures

N° de Figure	Titre de figure	Page
Figure.1.	Exemples des différents composés dans la famille de sécoiridoïdes.	4
Figure.2.	Structure de l'oleuropéine et de l'aspéruloside.	5
Figure.3.	Structure chimique d'oleuropéine.	5
Figure.4.	Voie de biosynthèse proposée pour l'oleuropéine	7
Figure.5.	Mécanisme d'hydrolyse de l'oleuropéine par la β -glucosidase.	8
Figure.6.	Hydrolyse acide de l'oleuropéine.	8
Figure.7.	Formation de l'oleuropéinol par réduction de l'oleuropéine par NaBH_4 .	9
Figure.8.	Hydrolyse acide de l'ester 2,4-dihydroxypénéthylique de l'oleuropéine en milieu acide.	9
Figure.9.	Le nudifloside A (31) et D (32), sécoiridoïdes de <i>Jasminium nudiflorum</i> .	10
Figure.10.	Synthèse des nudiflosides A et D.	10
Figure.11.	Image de l'olivier <i>Olea europaea</i> L.	14
Figure.12.	Les organes d' <i>Olea europaea</i> L.	14
Figure.13.	Les feuilles d'olivier.	15
Figure.14.	La répartition oléicole dans le monde.	16
Figure.15.	Composés phénoliques(B) et les Sécoiridoïdes (A) isolés des feuilles d' <i>Olea europaea</i> L.	17
Figure.16.	Schéma d'une installation HPLC avec double détection.	20
Figure.17.	« Force » des solvants utilisés comme phases mobiles.	21
Figure.18.	Pompes binaires (Haute pression) et pompes quaternaires (basse pression).	21
Figure.19.	Représentation schématique de l'injecteur.	22
Figure.20.	Représentation schématique d'une colonne HPLC.	22
Figure.21.	Structure chimique du gel de silice pour HPLC.	23
Figure.22.	Schéma représentatif de la silice greffée.	23
Figure.23.	Cellule d'un détecteur UV-visible.	24
Figure.24.	Diagramme des publications sur l'oleuropéine.	26
Figure.25.	Feuilles d'olivier de la variété <i>Chemlale</i> [BMD].	32
Figure.26.	Les systèmes de CCM utilisés pour l'analyse de l'extrait butanolique.	37
Figure.27.	Appareil HPLC YL 9100, utilisé dans notre travail.	38
Figure.28.	Logiciel YL- Clarity. utilisé dans l'exploitation des résultats.	38
Figure.29.	Chromatogramme de l'extrait butanolique.	39

Figure.30.	Caractéristiques de la détection par YL – CLARITY.	41
Figure.31.	ChromatogrammeCCM optimisé pour l' analyse de l'extrait butanolique.	55
Figure.32.	Chromatogramme HPLC de l'oleuropéine de référencedans la littérature.	56
Figure.33.	Chromatogramme HPLC de l'extrait brut des feuilles d'olivier	56
Figure.34.	ChromatogrammesHPLC des extraits des trois cultivars dans la littérature.	57
Figure.35.	Chromatogramme HPLC de l'oleuropéine de référence.	58
Figure.36.	Chromatogrammesde l'extrait butanolique en fonction du débit de la phase mobile	61
Figure.37.	Chromatogrammes obtenus en fonction de la détection (a : 0.1 min ; 0.1 mv b : 0.5 min ; 1mv)	62
Figure.38.	ChromatogrammeCCM de l'extrait de <i>Chemlale</i> dans le system A.	63
Figure.39.	ChromatogrammeCCM de l'extrait de <i>Chemlale</i> dans le system B.	65
Figure.40.	Chromatogramme HPLC obtenu après l'optimisation des conditions d'analyse de l'extrait.	67
Figure.41.	Chromatogramme HPLC de A : AS1 ; B : AS2 et C : AS3	68
Figure.42.	Chromatogramme HPLC de B : BS1+BS2 B : BS3 C :BS4 et D : BS5.	69
Figure.43.	Chromatogramme HPLC des systèmes A et B	70

Liste des schémas

N° du schéma	Titre du schéma	Page
Schéma .1.	Activités biologiques de l'oleuropéine	11
Schéma .2.	Comparaison entre les polarités de phases (normale et inversée).	23
Schéma .3.	Méthodologie du travail.	33
Schéma .4.	Protocole d'extraction Solide-Liquide des feuilles d'olivier.	34
Schéma .5.	Protocole d'extraction Liquide-Liquide des feuilles d'olivier.	35
Schéma .6.	Protocole d'analyse chromatographique CCM et HPLC.	44

Liste des tableaux

N° de tableau	Titre de tableau	Page
Tableau .1.	Fiche représentative sur l'oleuropéine	6
Tableau.2.	Différentes sources d'oleuropéine dans la famille « <i>Oleaceae</i> ».	6
Tableau.3.	Activités biologiques d'oleuropéine d'après la littérature.	26
Tableau.4.	Les fluorescences et les valeurs de R _f par CCM.	27
Tableau.5.	Analyse d'oleuropéine dans l'extrait des feuilles d'olivier d'après la littérature	28
Tableau.6.	Analyse de l'extrait butanolique par HPLC en fonction de la polarité de la phase mobile	40
Tableau.7.	Analyse de l'extrait butanolique par HPLC en fonction du débit de la phase mobile	40
Tableau.8.	Résultats des rendements obtenus à partir des feuilles d'olivier.	46
Tableau.9.	Résultats obtenus dans le choix de la phase stationnaire	47
Tableau.10.	Chromatogrammes des systèmes 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5.	49
Tableau.11.	Chromatogrammes du système 6	50
Tableau.12.	Chromatogrammes du système 7	51
Tableau.13.	Chromatogrammes du système 8	52
Tableau.14.	Chromatogrammes du système 9.	53
Tableau.15.	Analyse par HPLC des composés phénoliques de l'extrait des feuilles d'olivier d'après la littérature.	57
Tableau.16.	Résultats obtenus pour les différentes longueurs d'onde utilisées.	59
Tableau.17.	Chromatogrammes des systèmes (a,b,c et d).	69
Tableau.18.	Chromatogramme de l'extrait des feuilles d'olivier du système A	64
Tableau.19.	Chromatogramme de l'extrait des feuilles d'olivier du système B	66
Tableau.20.	Les conditions optimales pour l'analyse de l'extrait butanolique.	67

Tables des matières

<i>Introduction générale</i>	2
<i>Synthèse bibliographique</i>	
<i>I. Généralités sur l'oleuropéine</i>	4
I.1.La famille d'oleuropéine (Les sécoiridoïdes)	4
I.2.Définition	4
I.3.Détermination de la structure de l'oleuropéine	5
I.4. Les sources d'oleuropéine	6
I.5.Biosynthèse de l'oleuropéine	6
I.6. Réactivité de l'oleuropéine	7
I.7.L'oleuropéine comme matière première pour la synthèse organique	9
I.8. Importances de l'oleuropéine	10
<i>II. Généralités sur l'olivier</i>	13
II.1. Définition	13
II.2. Classification botanique	13
II.3. Description botanique	14
II.4. Situation dans le monde	14
II.5.Compositionphytochimiquede l' <i>Olea europaea</i> L.	15
II.6. Activités biologiques et utilisation médicinales	16
<i>III.Méthodes d'analyse et de quantification</i>	18
* Techniques chromatographiques	18
<i>IV. Travaux antérieurs</i>	25
IV.1. Activités biologiques de l'oleuropéine	25
IV.2. Méthodes d'analyse qualitative et quantitative	26

Partie expérimentale

Chapitre I. Matériel végétal & Extraction

I. Introduction	31
II. Matière végétale	31
III. Méthodologie du travail	31
III.1 Extraction, Analyse et Appareillage	32
III.2 Extraction des composés phénoliques	33

Chapitre II. Etude analytique (qualitative) de l'extrait par CCM et HPLC

I. Etude analytique (qualitative) des différents extraits par CCM	36
II. Analyses par HPLC	37
II.1. Description de l'appareil	37
II.2. Préparation des échantillons	38
II.3. Analyse de l'extrait butanolique par HPLC	38

III. Optimisation des conditions opératoires pour l'analyse de l'extrait par HPLC.

III.1. Longueur d'onde λ	38
III.2. Polarité de la phase mobile	38
III.3. Débit (ml/min)	39
III.4. Détection	40

Chapitre III. Séparation d'un mélange complexe par CCM et son Analyse par HPLC

I. Séparation d'un mélange complexe	42
I.1. Séparation par CCM	42
I.2. Analyse par HPLC	42

Chapitre IV. Résultats et Discussions

I. Rendements d'extraction	45
II. Etude analytique (qualitative) des différents extraits par CCM	45
II.1. Choix de la phase stationnaire	45
II.2. Choix de la phase mobile	47
III. Résultats des études analytiques (qualitatives) d'extraits par HPLC	55
III.1. Analyse par HPLC de l'extrait des feuilles d'olivier obtenus d'après la littérature	55

III.2. Analyse par HPLC de l'extrait butanolique dans ce travail.	57
IV. Les résultats d'Optimisation des conditions opératoires de l'HPLC	58
IV.1. longueur d'onde λ	58
IV.2. Polarité de la phase mobile	58
IV.3. Débit (ml/min)	59
IV.4. Détection	60
V. Résultat de la séparation par CCM et leur analyse par HPLC	62
V.1. Séparation par CCM	62
V.2 Analyse des fractions par HPLC	67
Conclusion	70
Bibliographie	71

Résumé :

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la relation Structure - Rétention de l'oleuropéine et de ses dérivés par HPLC et application de leur analyse qualitative à l'extrait non volatil de feuilles d'*Olea europea* L. de la région de Ouargla.

Les résultats du rendement obtenu de l'extraction des composés phénoliques des feuilles d'*Olea europea* L., est similaire à celui obtenu à partir des études précédentes. 13,31, 2,43 et 2,47 % pour l'extrait de butanol, l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane, respectivement. La valeur maximale a été observée dans l'extrait de butanol, nous avons donc choisi cet extrait pour l'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

L'analyse de l'extrait au butanol, par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et par l'HPLC nous a permis d'identifier l'oleuropéine (Confrontation avec les R_f , les spectres UV des étalons purs et le temps de rétention).

Plusieurs paramètres étaient modifiés sur l'analyse par HPLC pour observer le changement sur les pics de l'oleuropéine et de ses dérivés. La composition de la phase mobile : acétonitrile (A)- eau (B) varie de 5 à 50 % et de 50 à 95 %, respectivement. Plusieurs longueurs d'onde (254, 280 et 330 nm) ont été évaluées pour obtenir la meilleure séparation . L'évolution de la rétention en fonction du débit a également été étudiée, et enfin, l'optimisation de la détection pour la meilleure résolution a été également réalisée.

Mots- clés : Oleuropéine, rétention, analyse qualitative, HPLC.

Abstract:

In our work, we were interested in the study of the Structure - Retention relationship of oleuropein and its derivatives by HPLC and application of their qualitative analysis to the non-volatile extract of *Olea europea* L. leaves from Ouargla region.

The yield results obtained from the extraction of phenolic compounds from *Olea europea* L., leaves, is similar to that obtained from previous studies. 13.31, 2.43 % 2.47 % for butanol extract, ethyl acetate and dichloromethane, respectively. The maximum value was observed in the butanol extract, so we chose this extract for high performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

The analysis of the butanol extract, by Thin Layer Chromatography (TLC) and by HPLC allowed us to identify oleuropein (Confrontation with the R_f and UV spectra of the pure standards and retention time and the peak shape on the chromatogram).

Several parameters were modified on HPLC analysis to observe the change in the peaks of oleuropein and its derivatives. The mobile phase composition: acetonitrile (A) - water (B) ranges from 5 to 50% and 50 to 95% respectively. Several wavelengths (254, 280 and 330 nm) were evaluated for best separation. The evolution of the retention as a function of the flow was also studied, and finally, the optimization of the detection for the best resolution was also carried out.

Keywords : Oleuropein, retention, qualitative analysis, HPLC.

Introduction

Introduction

Les sécoiridoïdes sont des monoterpènes dérivant de la famille des iridoïdes. Ces derniers sont fréquemment présents dans les feuilles de plantes utilisées en médecine traditionnelle, hautement fonctionnalisés et sont utilisés comme matières premières chirales renouvelables en hémisynthèse, lorsqu'ils sont abondants au sein des végétaux [1].

L'oleuropéine qui fait l'objet de notre travail, est un composé appartenant à cette famille qui a fait l'objet de divers travaux focalisés sur les propriétés biologiques, les techniques d'extraction et les méthodes d'analyse qualitative et quantitative.

L'olivier (l'une des sources de ce composé) est une plante aromatique et médicinale, et un réservoir de composés naturels à haute valeur ajoutée. En effet, plusieurs composés sont identifiés dans les extraits des feuilles, tels que les composés phénoliques (flavonoïdes, sécoiridoïdes, ...), parmi lesquels nous citons l' α -tocophérol et le β -carotène qui sont doués d'activités biologiques extrêmement importantes [1 ; 2].

L'oleuropéine étant une molécule abondante dans les feuilles d'olivier (~ 6 – 9%), et dans le but de valoriser l'une des ressources naturelles sahariennes, nous nous proposons, dans un premier temps, d'étudier sa rétention et celle de quelques-uns de ses dérivés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en fonction de leurs structures. En seconde partie, comme application, nous nous sommes proposé de les analyser, qualitativement, dans l'extrait non volatil issu des feuilles d'olivier de la région d'Ouargla.

Ce travail comporte trois parties :

- ✓ Le premier chapitre consiste en une étude théorique sur l'oleuropéine, comportant quatre parties

I : Généralités sur l'oleuropéine.

II : Généralités sur l'olivier.

III : Méthodes d'analyse et de quantification.

IV : Travaux antérieurs sur l'oleuropéine.

- ✓ Le deuxième chapitre (expérimental) comporte trois parties :

I : Matériel végétal & Extraction.

II : Etude analytique (qualitative) de l'extrait butanolique par CCM et HPLC.

III : Séparation de l'extrait butanolique par CCM et analyse des fractions par HPLC.

- ✓ La troisième partie contient les résultats de cette étude et leurs discussions.
- ✓ Une conclusion générale, résume l'essentiel des résultats et les perspectives proposées.

Synthèse Bibliographique

Généralités sur l'oleuropéine

I. Généralités sur l'oleuropéine

I.1. La famille d'oleuropéine (Les secoiridoïdes)

Les secoiridoïdes sont des composés qui sont généralement liés glycosidiquement et sont produits à partir du métabolisme secondaire des terpènes en tant que précurseurs de divers alcaloïdes indoles [1]. Les secoiridoïdes dérivent biogénétiquement des iridoïdes par ouverture oxydante de la liaison C7-C8 de la génine. De ce fait, ils appartiennent à la famille des iridoïdes. Les différentes génines se caractérisent par certaines fonctionnalités :

- Présence d'un groupe vinyle en C9 sous forme ouverte sécologanoside (1), lactone (sweroside (2) ou gentiopicoside (3) [2].
- Présence d'un groupement éthylidène : oléoside (4) ou hydroxyéthylidène (10-hydroxyoléoside-11-méthylester) (5) en C9. Présence d'un acide carboxylique estérifié oleuropéine (6) ou non [2].
- Présence d'une structure tricyclique :
Par refermeture en C8 *via* une liaison C-O, comme pour le sécogalioside (7) [1].

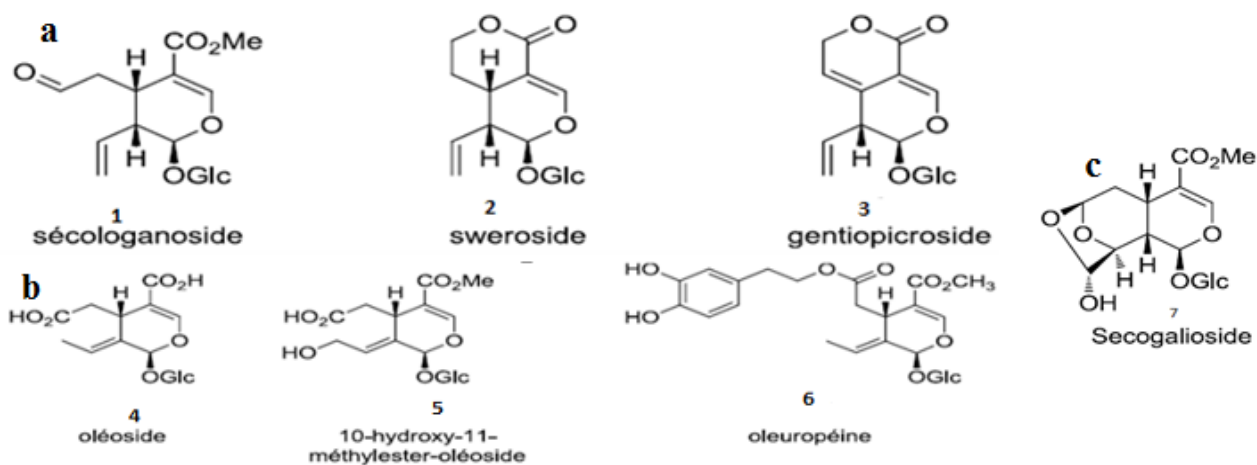


Figure.1. Exemples des différents composés de la famille des secoiridoïdes [1].

I.2. Définition

L'oleuropéine (**Figure 3**), est un composé organique de la famille des secoiridoïdes, qui dérivent de la famille des iridoïdes, qui sont abondants dans les oléacées, les gentianacées, cornaleae, ainsi que de nombreuses autres plantes. Les iridoïdes et les secoiridoïdes sont des composés qui sont généralement liés à la glycosidicité et sont produits par le métabolisme secondaire, des terpènes

comme précurseurs de divers alcaloïdes indoliques. Ces derniers sont fréquemment présents dans les feuilles de plantes utilisées en phytothérapie et en médecine traditionnelle [3-4].

I.3. Détermination de la structure de l'oleuropéine

En 1908, Bourquelot et Viniesco isolent un glucoside en proportion assez élevée et à la « saveur franchement amère » des feuilles et des fruits d'*Olea europaea*L. Ils nomment ce composé qu'ils n'ont pu cristalliser : oleuropéine (6). En 1960 Pannizzi et *al* décrivaient la structure de l'oleuropéine (6), puis 1970 pour qu'Inouye et *al*. décrivent sa configuration absolue.

Ces derniers la confirmeront en 1974 par corrélation chimique avec l'aspéruloside (8)[6-8].

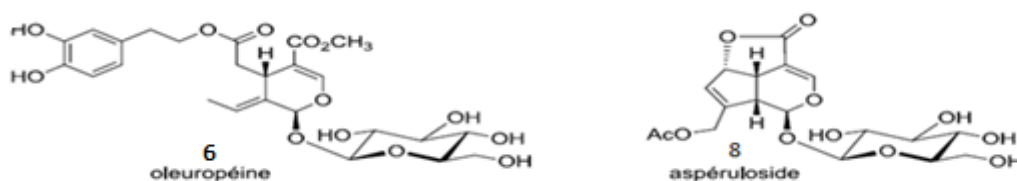


Figure.2. Structure de l'oleuropéine (6) et de l'aspéruloside (8) [2].

- Structure chimique

L'oleuropéine est un ester hétérosidique de détéracide élénolique et de 3,4-dihydroxyphényléthanol, contenant une molécule de glucose(Figure.5) [9].

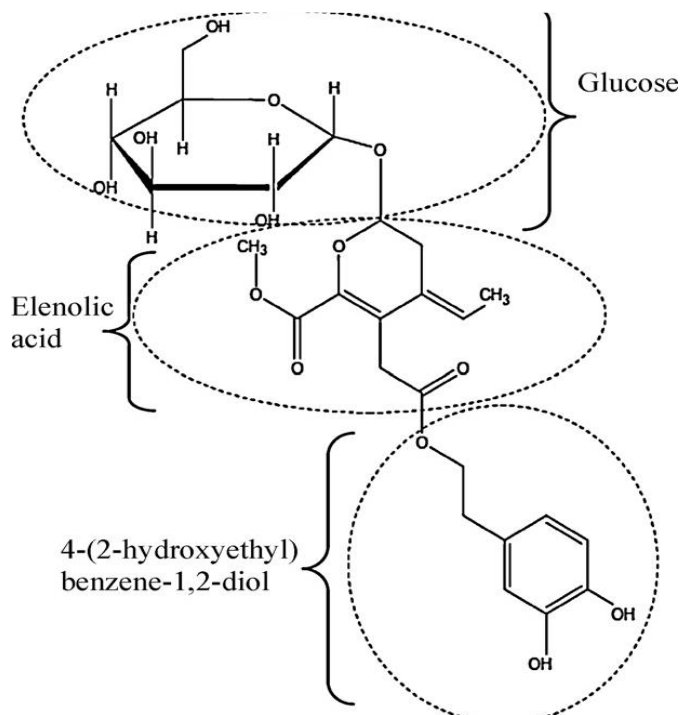


Figure.3. Structure chimique d'oleuropéine(6)[4].

Tableau .1. Fiche représentative sur l'oleuropéine (6) [Chem Draw].

Nom UIPAC :	méthyl(4 <i>S</i> ,5 <i>E</i> ,6 <i>S</i>)-4-[2-[2-(3,4-dihydroxyphényl)éthoxy]-2-oxoéthyl]-5-éthylidène-6-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6(hydroxyméthyl)oxan-2-yl]oxy-4H-pyran-3-carboxylate
Formule brut	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃
Masse molaire	540.5138 g/mol

I.4. Les sources de l'oleuropéine

Jusqu'à présent l'oleuropéine (6) n'a été isolée que dans les plantes de la famille des *Oleaceae*, et plus particulièrement dans les genres *olea*, *Fraxinus*, *Jasminum*, *Ligustrum*, *Osmanthus* et *Syringa*. Les teneurs en oleuropéine (6) isolée peuvent aller de 0,0003 % dans les fruits séchés de *Ligustrum lucidum*. à 0,72 % dans les parties aériennes d'*Osmanthus austrocaledonica*. Toutes ces teneurs sont largement inférieures à celles que l'on peut retrouver dans les feuilles d'*Olea europaea* L (6-9 %). On peut noter qu'une étude HPLC de *Ligustrum obtusifolium*, a montré une teneur de 3 % d'oleuropéine dans les feuilles fraîches [1].

Tableau. 2. Différentes sources d'oleuropéine (1) dans la famille « *Oleaceae* ».

Plantes	Partie	Teneurs	Réf
<i>Fraxinus americana</i> L.	feuilles sèches	0,23 %	[10]
<i>Jasminum polyanthum</i> Franch.	fleurs sèches	0,48 %	[11]
<i>Ligustrum obtusifolium</i> Siebold & Zucc.	feuilles fraîches	3 %	[12]
<i>Ligustrum vulgare</i> L.	feuilles sèches	0,013 à 0,43 %	[13]
<i>Osmanthus austrocaledonica</i>	parties aériennes sèches	0,72 %	[14]
<i>Phillyrea latifolia</i> L.	feuilles fraîches	0,62 %	[15]
<i>Syringa josikaea</i> J.Jacq.	feuilles fraîches	0,43 %	[15]
<i>Olea europaea</i> L	feuilles sèche	6-9 %	[16]

I.5. Biosynthèse de l'oleuropéine

La biosynthèse de l'oleuropéine dans *Oleaceae* déroule via la voie l'acide Mévalonique (9), aboutissant à la formation des oléosides. Le géraniol (10), le 10 -hydroxygeranoil (11) ainsi que le l'iridodial (12) et l'iridotrial(13) sont des précurseurs connus de l'acide désoxyloganique aglycone (14). Plus tard, l'acide désoxyloganique (15), l'acide 7-épiloganique (16), l'acide 7-ketologanic (17), Ester de l'acide 8-epikingisidic (18), oleoside 11-méthyle (19) ,7-β-1-D-glucopyranosyl 11-méthyl

oleoside (20) sont incorporés dans le ligustroside (21), un précurseur direct de l'oleuropéine, pour Oléacées (Figure.4.) [1].

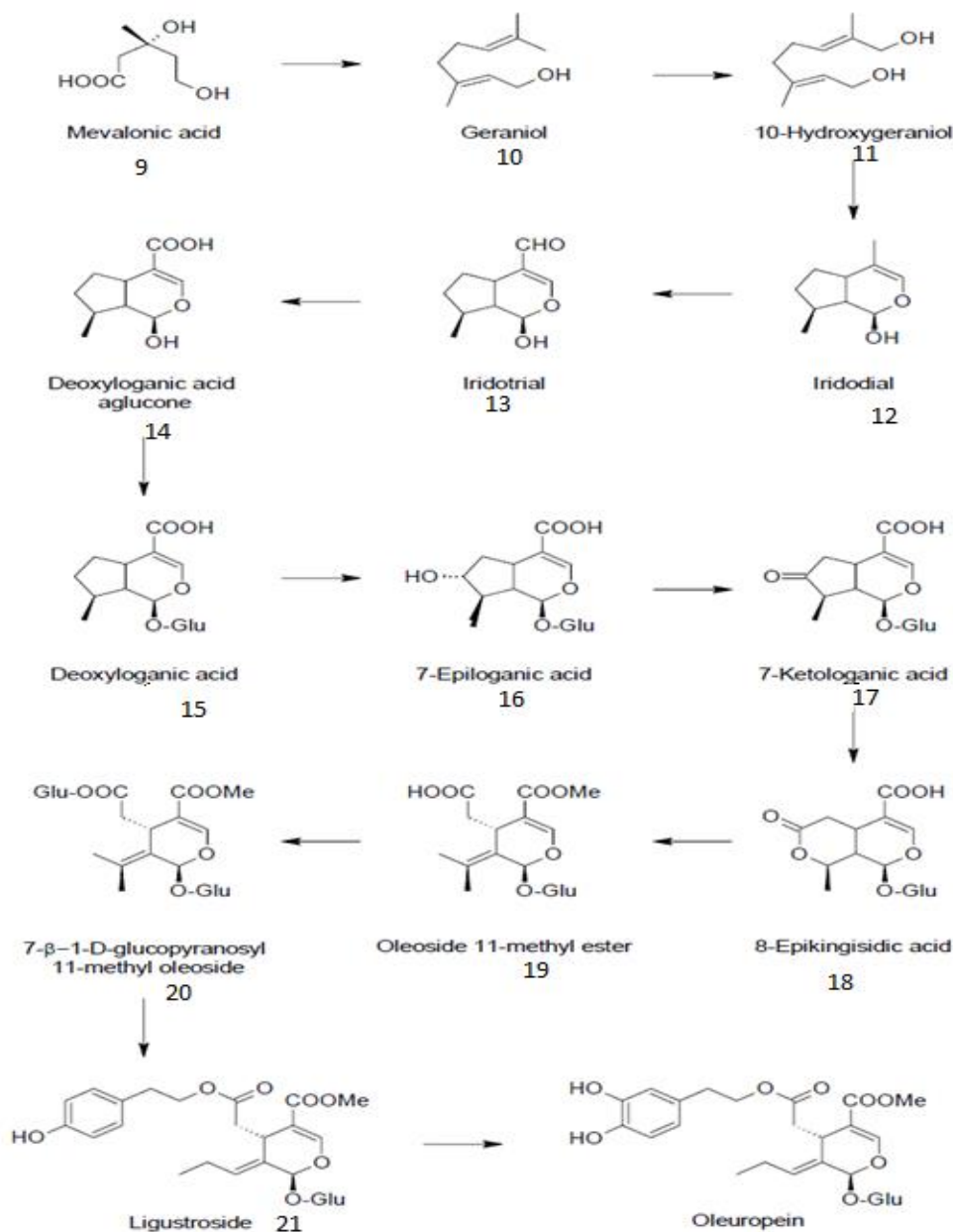


Figure.4. Voie de biosynthèse proposée pour l'oleuropéine (6) [2].

I.6. Réactivité de l'oleuropéine

L'oleuropéine (6) est une molécule abondante (6-9 % dans les feuilles d'*Olea europaea L*) et facilement accessible, cependant elle a été assez peu utilisée en synthèse.

Les principales réactions réalisées sur l'oleuropéine (6) sont l'hydrolyse du sucre, la réduction des esters et l'hydrolyse de l'ester 3,4-dihydroxyphénythylique [16].

a. Hydrolyse du glucose de l'oleuropéine

L'hydrolyse du sucre de l'oleuropéine (6) a été étudiée par voie enzymatique ou chimique. En 2005, Guiso *et al.*, montrent que le mécanisme de l'hydrolyse enzymatique est le même en utilisant une β -glucosidase d'amande commerciale ou des β -glucosidases endogènes. La première étape est la coupure de la liaison osidique qui libère l'aglycone instable (22). Cet aglycone a pu être isolé et caractérisé par Bianco *et al.* avec un rendement de 2,8 % à partir de l'oleuropéine (6). L'étape suivante est l'ouverture de l'hémiacétal qui conduit au mélange *R* et *S* du dialdéhyde 23. Le dialdéhyde (23) est en équilibre avec la forme hydratée (24), qui cyclise pour donner (25) et (26). Ces deux composés sont les formes stables de l'aglycone de l'oleuropéine. Selon les conditions d'hydrolyse les rapports entre (23), (24) et (25) peuvent varier, mais le composé (24) est toujours le majoritaire [5 ; 17-22].

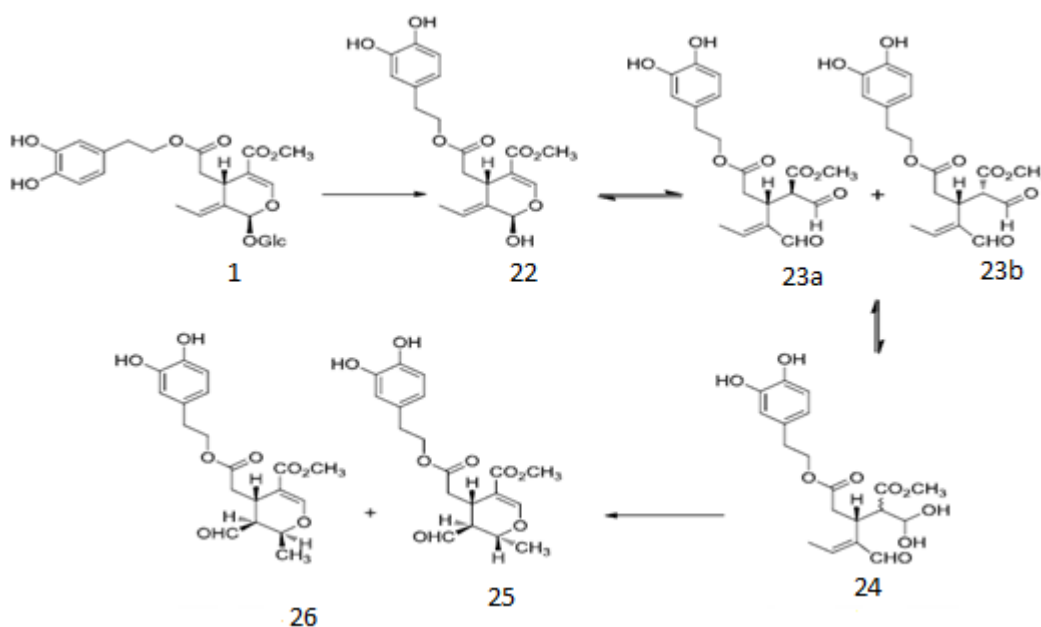


Figure.5. Mécanisme d'hydrolyse de l'oleuropéine (6) par la β -glucosidase[2].

Lorsque l'hydrolyse de l'oleuropéine (6) est effectuée par voie chimique par l'action de 5 équivalents d'acide sulfurique, le composé isolé est l'acide élénolique (27) avec un rendement de 7 % [19].

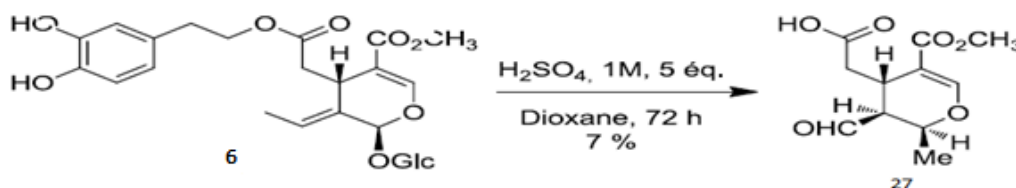


Figure.6. Hydrolyse acide de l'oleuropéine (6) [19].

b. Réduction des esters de l'oleuropéine

La seule réaction de réduction de l'oleuropéine (6) décrite dans la littérature, est la réduction complète de (6) en oleuropéinol (28) par le NaBH_4 . Lorsque l'oleuropéine (6) est mise en réaction avec 22 équivalents de NaBH_4 dans l'eau, les auteurs isolent l'oleuropéinol (28) avec un rendement de 85 % [23].

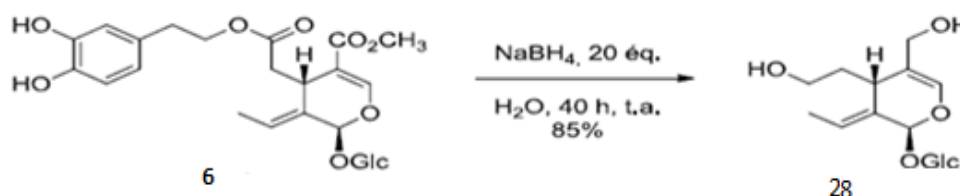


Figure.7. Formation de l'oleuropéinol (28) par réduction de l'oleuropéine (6) par NaBH_4 [23].

c. Hydrolyse des esters de l'oleuropéine

La plupart des publications concernant la réactivité de l'oleuropéine (6) sont des études qui utilisent (6) comme source d'hydroxytyrosol (29). En effet l'hydroxytyrosol est un composé antioxydant très puissant, ainsi qu'un anti-agrégant plaquettaire, c'est pourquoi de nombreuses recherches sont menées pour son extraction, son utilisation en pharmaceutique et en cosmétique. Ainsi la principale réaction étudiée est l'hydrolyse des esters de l'oleuropéine (6) conduisant au 11-méthyl-oléoside (30) et à l'hydroxytyrosol (29). L'hydrolyse peut être effectuée par l'action de l'acide sulfurique à 37°C pendant 3 heures, cependant aucun rendement n'est décrit dans ces publications [24-29].

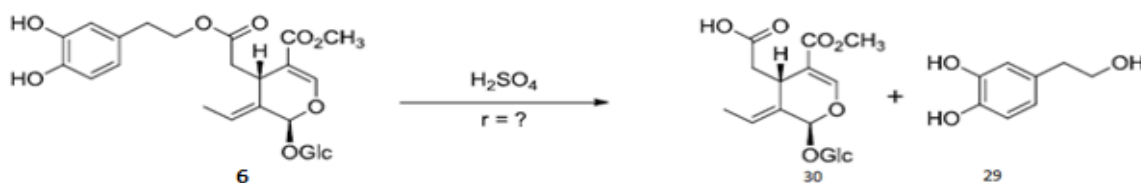


Figure .8. Hydrolyse acide de l'ester 2,4-dihydroxypénéthylique de l'oleuropéine en milieu acide[1].

I.7. L'oleuropéine comme matière première pour la synthèse organique

L'oleuropéine comme matière première pour la synthèse des nudifloside A et D. Les seuls travaux qui utilisent l'oleuropéine (6) comme matière première de synthèse sont les travaux de Hanessian *et al.* en 2006 pour la synthèse de deux sécoiridoïdes naturels isolés de *Jasminium nudiflorum* (*Oleaceae*) : le nudifloside A(32) et le nudifloside D (31)[30-33].

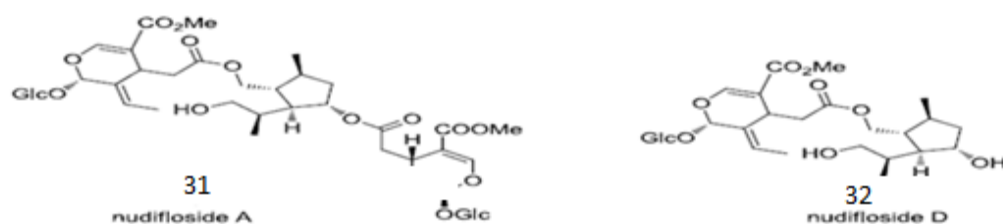


Figure.9. Le nudifloside A (31) et D (32), sécoiridoïdes de *Jasminium nudiflorum* [1].

Pour cette synthèse, Hanessian effectue l'estérification selon la méthode de Yamaguchi entre le 11-méthyl-oléosideperacétate (33) et le composé (34), commun au nudifloside A et D [34].

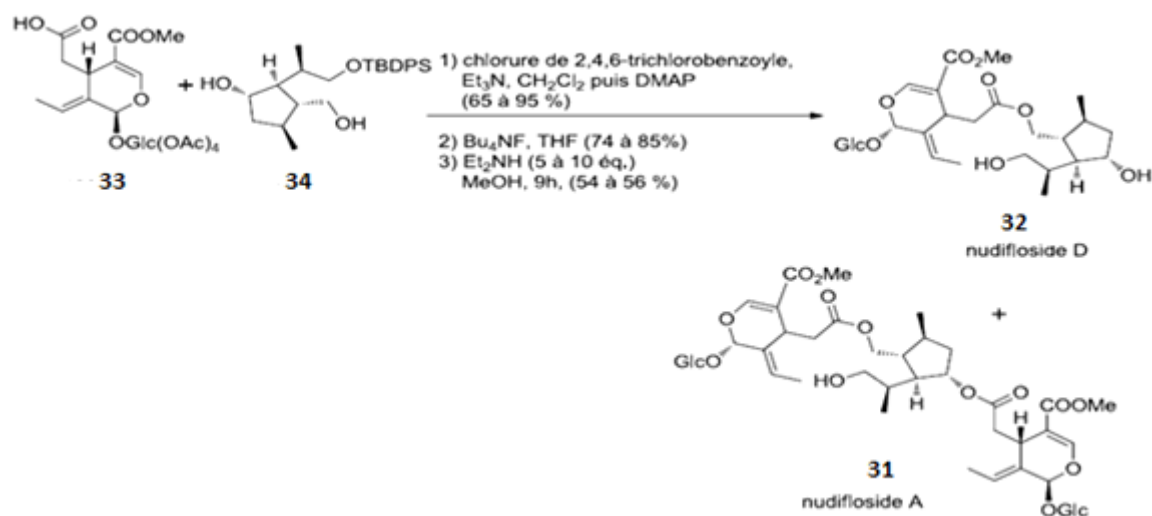


Figure. 10. Synthèse des nudiflosides A (31) et D (32) à partir de (33) [34].

I.8.Importances de l'oleuropéine

Enormément de travaux ont étudié le rôle thérapeutique de l'oleuropéine et de ses mécanismes d'action. L'oleuropéine possède de nombreux effets pharmacologiques bénéfiques sur la santé tels que :

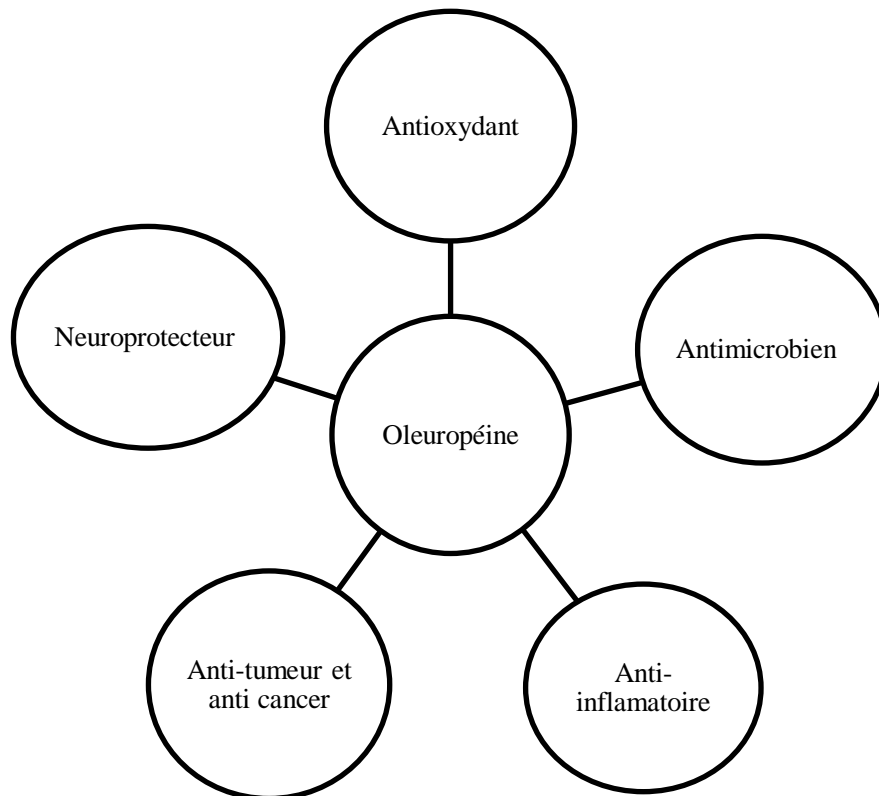


Schéma .1. Activités biologiques de l'oleuropéine (6) [2 ; 35-42].

a. Effet antioxydant

L'oleuropéine a démontré *in vitro* sa capacité à neutraliser les ERO (espèces réactives de l'oxygène) et à augmenter l'activité des molécules anti-oxydantes SOD (superoxyde dismutase)[35-36].

Il inhibe puissamment et en fonction de la dose l'oxydation induite par le sulfate de cuivre des lipoprotéines de basse densité LDL (low density lipoprotein) [2].

L'oleuropéine possède une double activité ; de neutraliser l'oxyde nitrique et d'inhiber même l'enzyme responsable de sa synthèse INOS (inducible nitric oxyde synthase)
Coni et al ont démontré *in vitro* que l'oleuropéine augmente la capacité de LDL de résister contre l'oxydation [37].

b.Effet anti-tumeur et anti cancer

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que l'incidence de certains types de cancer dans le bassin méditerranéen est plus faible par rapport à d'autres régions. L'oleuropéine a démontré sa capacité à réduire la viabilité des cellules cancéreuses en inhibant leur taux de prolifération et en induisant l'apoptose [38-40].

c. Effet neuroprotecteur

Une étude a démontré que l'oleuropéine peut diminuer et même prévenir l'agrégation du peptide amyloïde, l'un des principaux facteurs responsables de la neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer. De plus, l'oleuropéine est un inhibiteur de Tau, une protéine associée aux microtubules connue pour former des dépôts d'amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer [41-42].

d. Antimicrobien

De nombreuses études ont été démontrées que l'oleuropéine possède une forte activité antimicrobienne contre les deux Gram des bactéries positif et négatif, ainsi que les mycoplasmes. Les structures phénoliques similaires à l'oleuropéine semblent produire son effet antibactérien en endommageant la membrane bactérienne et / ou perturbant leurs peptidoglycannes cellulaires [1].

L'oleuropéine inhibe le développement et la production de l'enterotoxine B par *Staphylococcus aureus*, le développement de *Salmonella enteritidis* et la germination et le développement des spores des *Bacillus cereus*. L'oleuropéine inhibe complètement le développement de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* [2].

e. Effet anti-inflammatoire

L'oleuropéine agit en réduisant l'activité lipoxygénase et la production de leucotriène B4 [2].

f. Autres effets biologiques

Hypoglycémique, Hypotensif, Anti-mycoplasmal, Immunomodulateur [25].

Généralités sur l'olivier

II. Généralités sur l'olivier

II.1. Définition

L'olivier est l'un des arbres les plus caractéristiques de la région méditerranéenne; (il a une grande importance nutritionnelle, sociale, culturelle et économique sur les populations de cette région où il est largement distribué ; il est aussi largement utilisé en médecine traditionnelle pour ses effets thérapeutiques. Immortel et sa durée de vie est très longue : plusieurs fois centenaires voire atteindre un millénaire. Il peut vivre jusqu'à 1000 ans [43].



Figure.11. Image de l'olivier *Olea europaea* L. [50].

II.2. Classification botanique

D'après Ghedira (2008), la classification botanique d'olivier est [44] :

Embranchement : Spermaphytes

Sous-Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Ligustrales

Famille : Oléacées

Genre : *Olea*

Espèce : *Olea europaea* L.



Figure.12. Les organes d'*Olea europaea* L. [50].

II.3. Description botanique

L'olivier est un arbre vivace aux feuilles persistantes, dur, gris-vert et ayant une forme allongée. Les fleurs sont déposées en grappes sur une longue tige (l'olivier produit deux sortes de fleurs, une parfaite qui contient les deux sexes mâle et femelle et une staminée). Le tronc est gris-vert et lisse jusqu'à sa dixième année, il prend une couleur gris foncé. Le système racinaire s'adapte à la structure des sols, il reste à une profondeur de 500 à 700 cm et se localise principalement sous le tronc. Les feuilles, blanc argenté à la face inférieure, vert grisâtre à la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces, lancéolées [44-49].



Figure.13. Les feuilles d'olivier [51].

II.4. Situation dans le monde

L'olivier est d'origine très ancienne, natif d'Asie, son premier foyer se trouve au niveau de la frontière irano-syrienne [49].

Les scientifiques considéraient que les oléastres étaient un groupe homogène confiné à l'Est du bassin méditerranéen, et que l'ensemble des oliviers cultivés dérivent d'un seul et même groupe d'oléastres [49].

Dans l'hémisphère nord, l'aire de culture de l'olivier se situe entre 30° et 45° de latitude nord, et entre 30° et 45° de latitude sud [52].

L'olivier est parfaitement adapté au climat méditerranéen, Il supporte parfaitement des sécheresses prolongées mais craint les froids trop vifs et l'humidité stagnante. Il a besoin d'un ensoleillement prolongé et les fortes chaleurs de l'été ne lui font pas peur. Néanmoins, un hiver marqué lui est nécessaire pour induire la production de fleurs et donc d'olives [53].

En Algérie, la superficie oléicole est passée de 165.000 hectares en 2000 à 400.000 hectares en 2012.



Figure.14. La répartition oléicole dans le monde [54].

II.5. Compositions phytochimiques d'*Olea europaea* L.

Les composés phénoliques, métabolites secondaires, forment le groupe des composés organiques phytochimiques le plus important dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante [55].

Les feuilles d'olivier peuvent être considérées comme une source particulièrement riche en composés phénoliques ; car leur contenu polyphénolique peut atteindre jusqu'à 40g /kg de tissu sec mais ces niveaux peuvent changer considérablement. Le profil et le contenu polyphénolique des feuilles d'olivier semblent fortement influencé par le potentiel génétique [56].

De nombreux composés ont été isolés des feuilles d'*Olea europaea* L. et les composés majoritaires dans les feuilles sont les sécoiridoïdes. Ainsi en plus de l'oleuropéine (6) les extraits méthanolique ou aqueux contiennent : le déméthyleuropéine (35), le ligstroside (36), l'oléoside (4), l'oleuroside(37), l'oleuricine A(38), l'oleuricine B (39) et les aglycones (25) et (26) (Figure 17 A)[30 ; 57-58].

Des composés phénoliques ont aussi été isolés :

Le tyrosol (40), l'hydroxytyrosol (29), le rutoside (41), la 7-glucosyl-lutéoline (42), la 7-rutinoside-lutéoline (43), la 7-glucosyl-apigénine (44), la 7-rutinoside-apigénine (45) et le verbacoside (46) (Figure 17 B)[16].

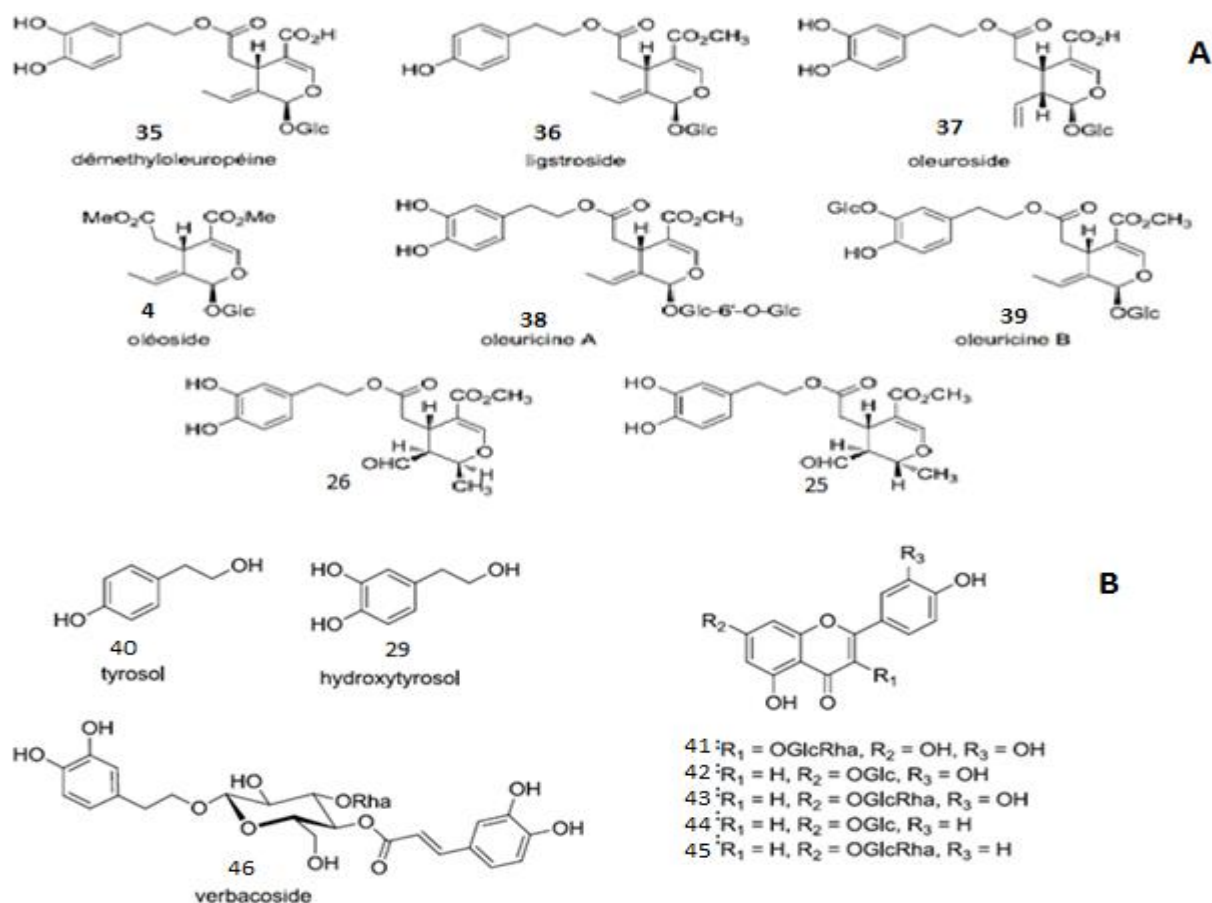


Figure.15. Les Composés phénoliques(B) et les Sécoiridoïdes (A) isolés des feuilles d'*Olea europaea* L. [16].

II.6. Activités biologiques et utilisations médicinales

L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive qui est utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Par ailleurs, les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles qui font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches scientifiques [59].

Ils sont 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). Elle exerce aussi des activités antioxydants, spasmolytiques, hypocholestérolémiantes et antiseptiques [44 ; 59-61].

*Méthodes d'analyse et de
quantification*

III. Méthodes d'analyse et de quantification :

Diverses méthodes ont été développées pour l'analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques : les techniques simples comprennent chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et électrophorèse capillaire(CE).

D'autres méthodes sophistiquées sont aussi impliquées ; à savoir, le Système de modélisation automatique (FAMS) et l'RMN, Electrospray Ionisation Mass Spectrometry Tandem (ESI-MS/MS) et des mesures à haute résolution (HRMS).

III.1. Techniques chromatographiques

Actuellement plusieurs techniques chromatographiques sont développées et validés afin de permettre une bonne analyse des différents composés organiques parmi les quelles :

a. La chromatographie sur couche mince (CCM)

➤ Définition

La chromatographie sur couche mince (CCM), est une technique repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de Solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant [62].

➤ Applications

La CCM présente plusieurs applications ; elle permet le contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique, le suivi de la réaction chimique ou d'un fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique. Elle permet également la purification de petites quantités de produit (jusqu'à 100 mg).La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

Le succès de ce mode de chromatographie est dû notamment à la facilité de sa mise en œuvre et à la possibilité de son emploi dans le domaine analytique que dans le domaine préparatif.

b. La chromatographie liquide haute performance HPLC

La chromatographie liquide haute performance est une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées [62].

L'analyse qualitative consiste à identifier les analytes par leur temps de rétention qui pour des conditions données (solvant, débit, colonne etc.) est caractéristique du composé [62].

Il peut bien sûr arriver que deux composés différents mais très proches aient le même temps de rétention. On doit donc s'assurer préalablement qu'un pic donné correspond bien à un seul analyte. C'est l'objet de toute la phase de mise au point des conditions opératoires utilisées [62].

➤ Appareillage

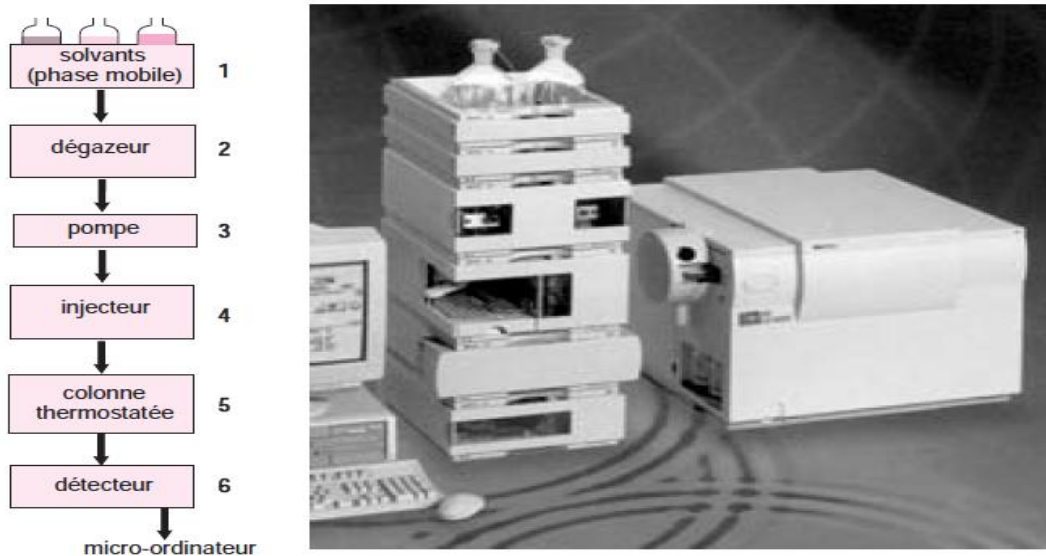


Figure.16. Schéma d'une installation HPLC avec double détection. [62].

- **Un réservoir de solvant (éluant)**

Le réservoir contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse [63].

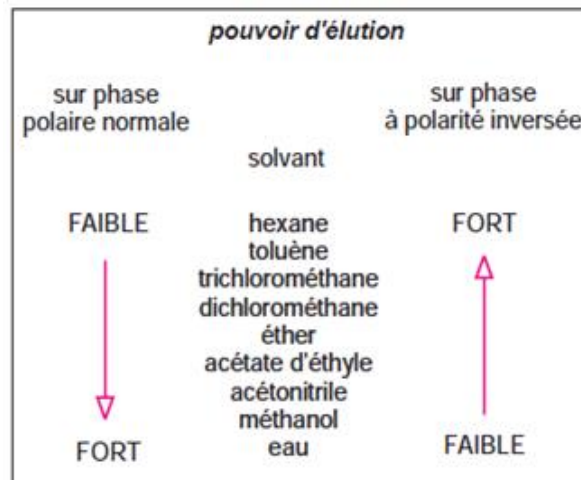


Figure .17. « Force » des solvants utilisés comme phases mobiles [62].

- **Pompes pour éluants**

Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur [63].

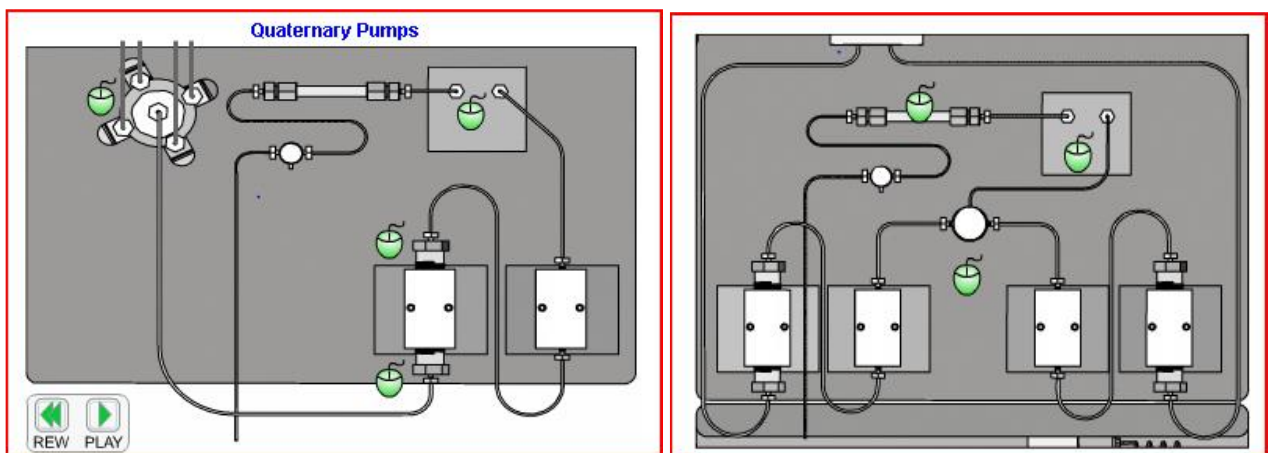


Figure .18. Pompes binaires (Haute pression) et pompe quaternaires (basse pression) [63].

- **Injecteurs**

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire deux catégories [62] : Précédés par injection directe et Précédés par boucles.

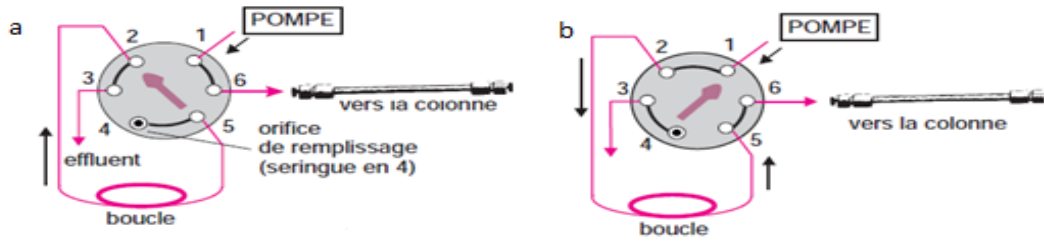


Figure.19. Représentation schématique de l'injecteur [62].

• Colonnes

Les colonnes d'HPLC se présentent comme un tube, le plus souvent en acier inoxydable 316 capable de résister aux fortes pressions. La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 25 cm et un diamètre interne (DI) est d'environ 1 ; 4,6 et 8mm.

- ❖ 1mm pour chromatographie à micro débit.
- ❖ 4,6mm chromatographie analytique classique.
- ❖ 8mm chromatographie semi-préparative.

Ces colonnes sont remplies de phase stationnaire par voie humide sous pression [62-63].

➤ **Phases Stationnaires**

Ces phases sont essentiellement constituées par de très fines particules poreuses (silice ou alumine), de forme irrégulière ou homogène. Sa caractéristique essentielle est sa granulométrie exprimée par le diamètre moyen des grains en micromètre, parmi celles on cite : le gel de silice et la silice greffé

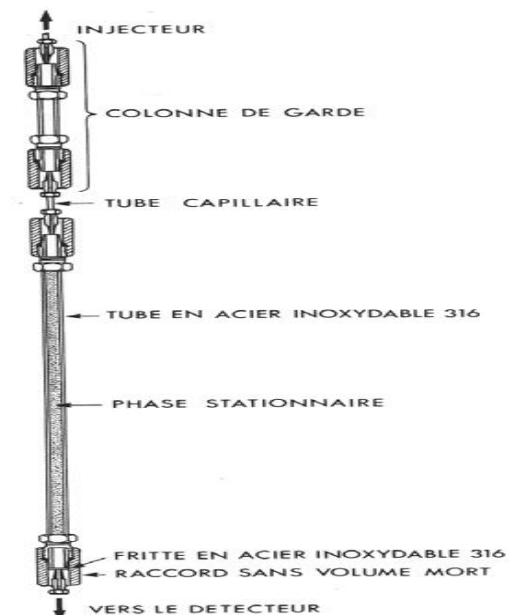


Figure.20. Représentation schématique d'une colonne HPLC.

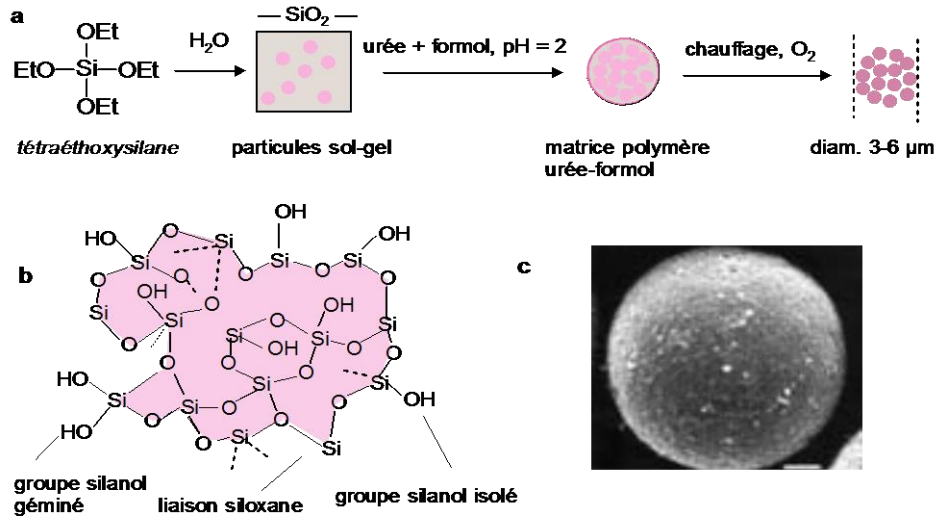


Figure.21. Structure chimique du gel de silice pour HPLC [62].

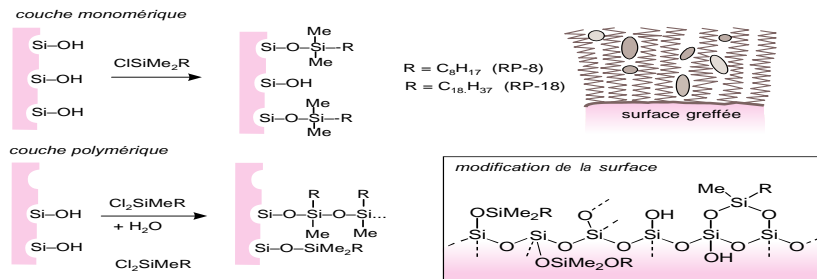


Figure .22. Structures de la silice greffée [62]

Le schéma suivant montre la différence entre les deux modes de polarités de phases normale et inversée en HPLC :

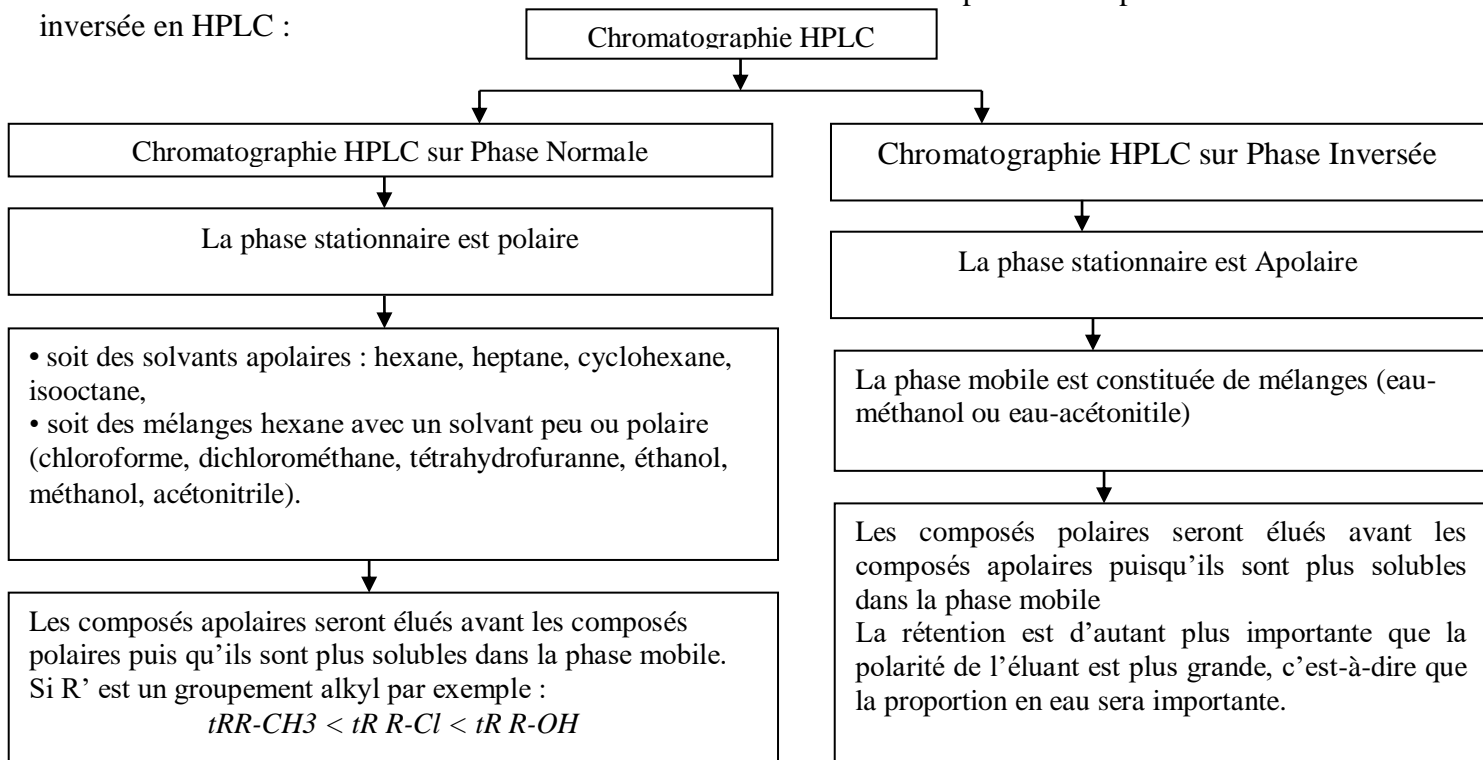


Schéma .2. Comparaison entre les polarités de Phase (normale et inversée).

➤ Détecteurs

L'analyse par chromatographie a rarement pour but de déterminer la composition totale de l'échantillon, mais plutôt de repérer la présence ou doser un composé présent, pour lequel on a choisi un détecteur bien adapté.

- Détecteurs spectrophotométriques

La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer ($A = \epsilon lc$) : l'absorbance A de la phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde λ ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV ou le visible [63]. Photomètre UV-Visible, Détecteur à barrettes de diodes (DAD)

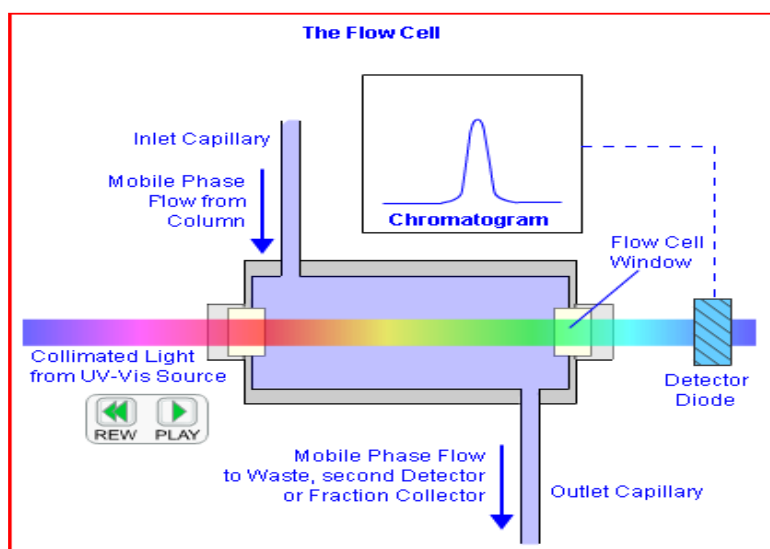


Figure .23.Cellule d'un détecteur UV-visible[63].

➤ Applications

La HPLC est très utilisée comme méthode d'analyse qualitative et quantitative pour séparer et doser des espèces diverses d'analytes: inorganiques, organiques et biologiques

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide haute performance est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de Séparation. Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse :

- ❖ des composés thermosensibles
- ❖ des composés très polaires
- ❖ ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Travaux antérieurs

IV. Travaux antérieurs

Depuis 1908, l'oleuropéine (6) a été l'objet de nombreuses études et continue d'être un sécoiridoïde d'intérêt puisque plus de 1000 études à son sujet sont recensées dans la base de données SCI-Finder. Entre 1908 et 1990 seulement 81 études sur le sujet ont été publiées, soit une moyenne d'une publication par an. De 1990 à 1997 la moyenne passe à 10 publications par an, puis le nombre de publications par an explose pour atteindre environ 100 publications par an à partir de 2009. Ce phénomène peut s'expliquer en partie par la découverte des propriétés biologiques de l'huile d'olive et de l'oleuropéine (6) ainsi que de leurs implications dans le régime méditerranéen décrites dans les années 90 [2].

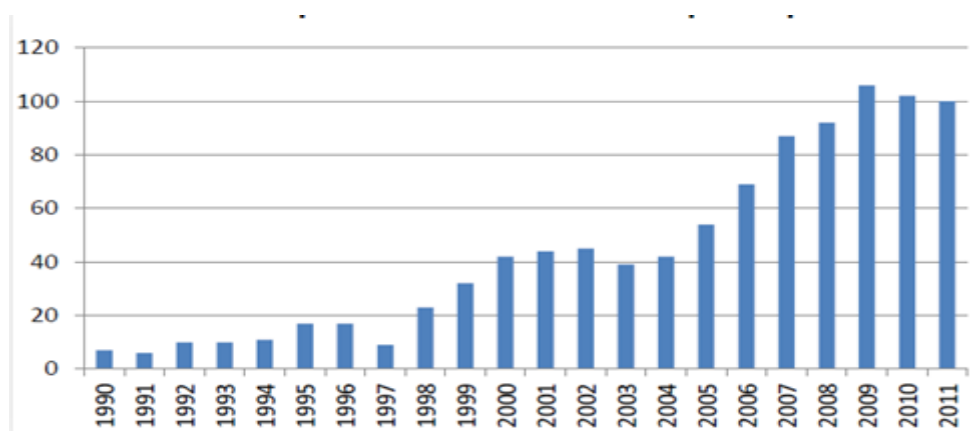


Figure.24. Diagramme des publications sur l'oleuropéine [2].

IV.1. Activités biologiques de l'oleuropéine

Plusieurs études ont été consacrées à l'étude de l'activité biologique de l'oleuropéine, nous les résumons dans le tableau suivant :

Tableau .3. Activités biologiques de l'oleuropéine d'après la littérature.

Activité biologique	Références
Antioxydant	[35-36;64-66]
Anti-inflammatoire	[67 ;25]
Anti -cancérigène	[37-40;68-69]
Anti-microbienn	[70-73]
Neuroprotecteur	[41-42 ; 1]
Hypoglycémique	[74;1]
Hypotensif	[75, 1]

IV.2. Méthodes d'analyse qualitative et quantitative

a. L'analyse de l'oleuropéine par la Chromatographie sur couche mince (CCM)

Dans la Chromatographie sur couche mince (CCM) Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules a séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique et la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers [76].

Le système choisis : Les plaques ont été développées dans des cuves saturées contenant le système solvant choisi précédemment pour la CCM. Les plaques sont séchées à température ambiante pour examiner les taches des constituants sous lampe UV (254 et / ou 365 nm). On déterminé alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal R_f .

Pour l'analyse quantitative des polyphénols par CCM, les valeurs des R_f et les fluorescences des spots ont été délimitées sous la lampe UV à 254- 365 nm, les fluorescences et les valeurs d'IRF sont mentionnées dans (le tableau 4)[76].

Tableau .4. Fluorescences et les valeurs de R_f par CCM.

RF	R_{f1}	R_{f2}	R_{f3}	R_{f4}	R_{f5}	R_{f6}
Var Chemlal	0,28	0,35	0,42	0,60	0,64	0,71
	Violet	Jaune	Bleu	Marron	Noir	Jaune pale

b. L'analyse de l'oleuropéine par la chromatographie en phase liquide (HPLC)

La chromatographie en phase liquide (HPLC) est la technique la plus fréquemment utilisée par le comité scientifique pour la quantification de l'oleuropéine. Les phases mobiles utilisées dans cette technique peuvent être phase normale ou phase inverse. Les solvants peuvent être élués en mode isocratique ou en gradient.

Tableau. 5. L'analyse d'oleuropéine dans l'extrait des feuilles d'olivier d'après littératures

Technique analytique	Détecteur	λ (nm)	Colonne	Débit (ml min ⁻¹)	Phases mobiles	Régime d'élution	t(min)	tr (min)	Teneur de l'OLP	Référence
HPLC	DAD	280	C18 LiChrospher 100 analytical column (5 μ m, 250mm \times 4mm)	1	acide acétique /eau(2,5 /97,5) acetonitrile	Gradient	60	22,2	134,4 mg/g	[77]
HPLC	UV (SPD10Avp)	280	C-18 Shim-pack VP- ODS (4,6 - 250 mm)	0.6	0,1%phosphoric acid/eau 70%acetonitrile/ eau	Gradient	50	37,5	0.14	[78]
RP-HPLC	Mass spectrometer	280	XTerraR RP18; 3,5 m, 4,6 x 10mm x 150mm column,	1	acide acétique /eau (99,9/0,1) acetonitrile/acideacétique (99,9 / 0,1) 79% eau acidifie	Gradient	80	31,9	3,26 à 8,48 mg/100 g	[79]
HPLC	Tunable absorbance	280	1) a Symmetry C18, 5_m, 3,9 x 250 mm column (Waters) 2) a SentryGuardSymmetry C18, 3,9 20 mm insert(Waters)	1	(pH3) / 0,1 M acidorthophosphorique(v/v, 1000 /2,3)-21% acetonitrile acidified with 0,1 Morthophosphoric acid (v/v, 1000: 2,3).	Isocratique	35	24	9,14 à 14,32%	[80]
HPLC	DAD	280	Lichrospher 100 RP-18 (250mm \times 4 mm, 5_m).	Different débit	6% acid acetic, 2 mM sodium acetate/eau	Gradient	45	18	22,61m g/g	[81]

L'analyse d'oleuropéine dans l'extrait des feuilles d'olivier d'après littératures (suite)

Technique analytique	Détecteur	λ (nm)	Colonne	Débit (ml /min)	Phases mobiles	Régime d'élution	Tr (min)	Teneur de l'OLP	Référence
RP-HPLC	Spectrophotometer.	280	Reversed silica phase adsorboshere XL C18 90 A column (250 mmx4,6 mm, 5 μ m)	1	acetonitrile/eau(21:79) mixture acidified with-phosphoric acid (up to pH3)	Isocratique	25	0,8 à 8,61 g/kg	[82]
HPLC	UV	280	C18 column 5 μ m, 150 \times 4.6 mm I.D.	1	200 mL C ₂ H ₃ N + 800ml H ₂ O+ 1ml CH ₃ COOH	Isocratique	16	60à 90 mg/g	[83]
HPLC	DAD	280	C18 100 A, 2.6 μ m (100 mm \times 4.6 mm, I.D.)	0.8	composait d'eau désionisée avec 0,1% de TFA et d'acétonitrile	gradient	11.5	506–1.528 mg/mL)	[84]
HPLC	DAD	280	C18 column (5 μ m particle size; 250 mm; 4.6 mm).	0.9	HCOOH/ MeOH (19:1)	gradient	46	23 mg/g	[3]
HPLC_UV	UV-vis	200à 700	N.S	1	methanol-water solution of 40:60 (v/v)	Isocratique	11.5	1.06–10.6 mg/ml	[85]

Partie expérimentale

Matériel végétal & Extraction

I. Objectifs

Le présent travail se concentre sur :

- ✓ L'optimisation des conditions d'analyse d'extrait butanolique des feuilles d'*O europaea* L.
- ✓ Essais de fractionnée un mélange complexe par CCM et leur analyse par HPLC.
- ✓ Essais d'identification des pics par temps de rétention avec comparaisons par littérateurs.
- ✓ L'étude de la relation structure –rétention de l'oleuropéine et ses dérivés par HPLC.

II. Matériel végétale

Notre travail a été effectué sur une variété de feuilles d'olivier «Chemlale» (Figure30), dans la wilaya de Ouargla. La date de la récolte été en octobre 2017.



Figure.25. Feuilles d'olivier de la variété de Chemlale.

III. Méthodologie du travail

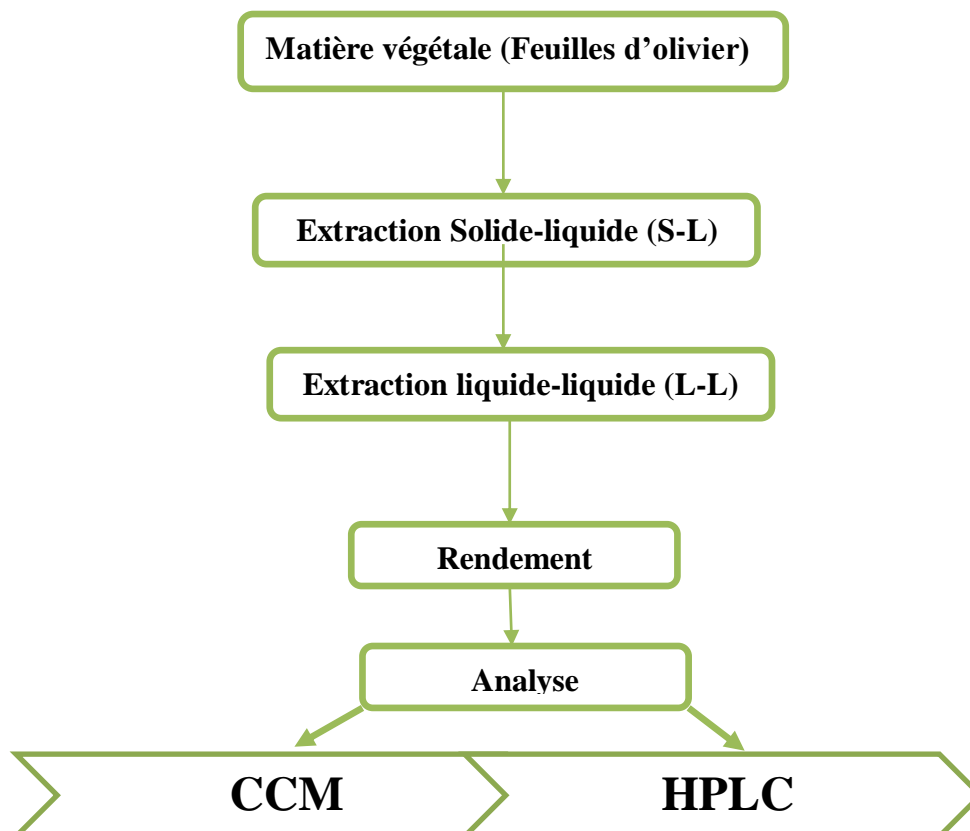


Schéma. 3. Méthodologie du travail.

III.2 Extraction des composés phénoliques :**a. Extraction solide -liquide :**

Après séchage dans un endroit sec et à l'abri de la lumière de soleil, les feuilles sont broyées, pesée (m=100g). La matière végétale obtenue est mise à macération dans l'éther de pétrole une seule fois (pour débarrasser les lipides) après filtration la matière végétale est séché et mise à macération dans un mélange hydro-alcoolique (Méthanol/eau ; 80/20 : v/v). Cette macération répétée 2 fois avec renouvellement du solvant chaque 24 heure [86].

Après filtration et évaporation de l'extrait hydro-alcoolique, cet extrait est dilué avec de l'eau distillée à raison de 100ml pour 100g de matière sèche, on laisse la solution en repos une nuit puis on filtre [86]. Le protocole d'extraction S-L est résumé dans **(le schéma 4)**:

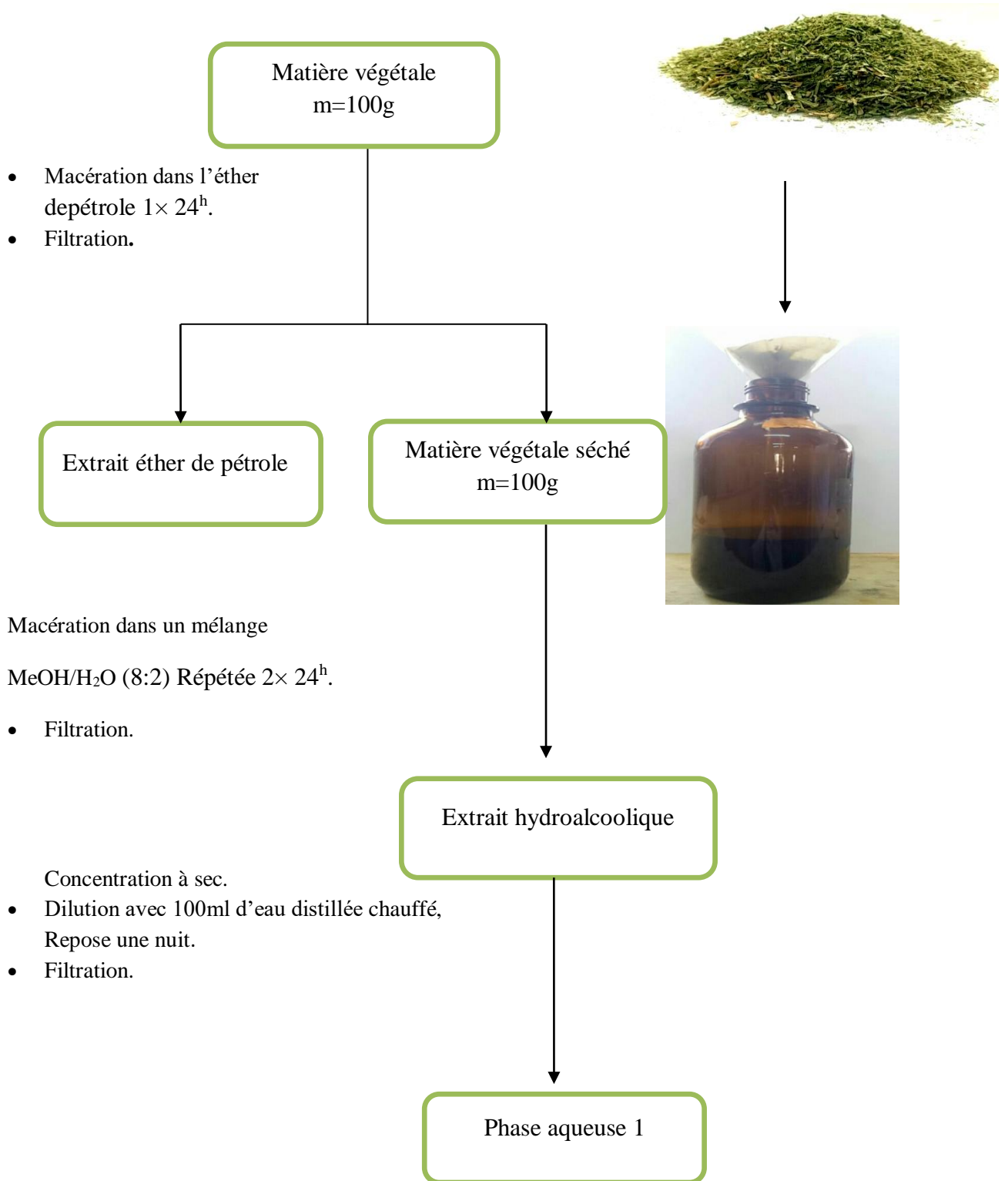


Schéma .4. Le protocole d'extraction Solide –Liquide des feuilles d'olivier [86].

b. Extraction liquide – liquide :

Après la filtration de l'extrait hydro-alcoolique (phase aqueuse1), la solution a subi des extractions liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane puis l'acétate d'éthyle et enfin avec le n-butanol [86].

Chaque extraction est répétée trois fois sauf que l'acétate d'éthyle deux fois. Le protocole d'extraction L-L est résumé dans (le schéma 5):

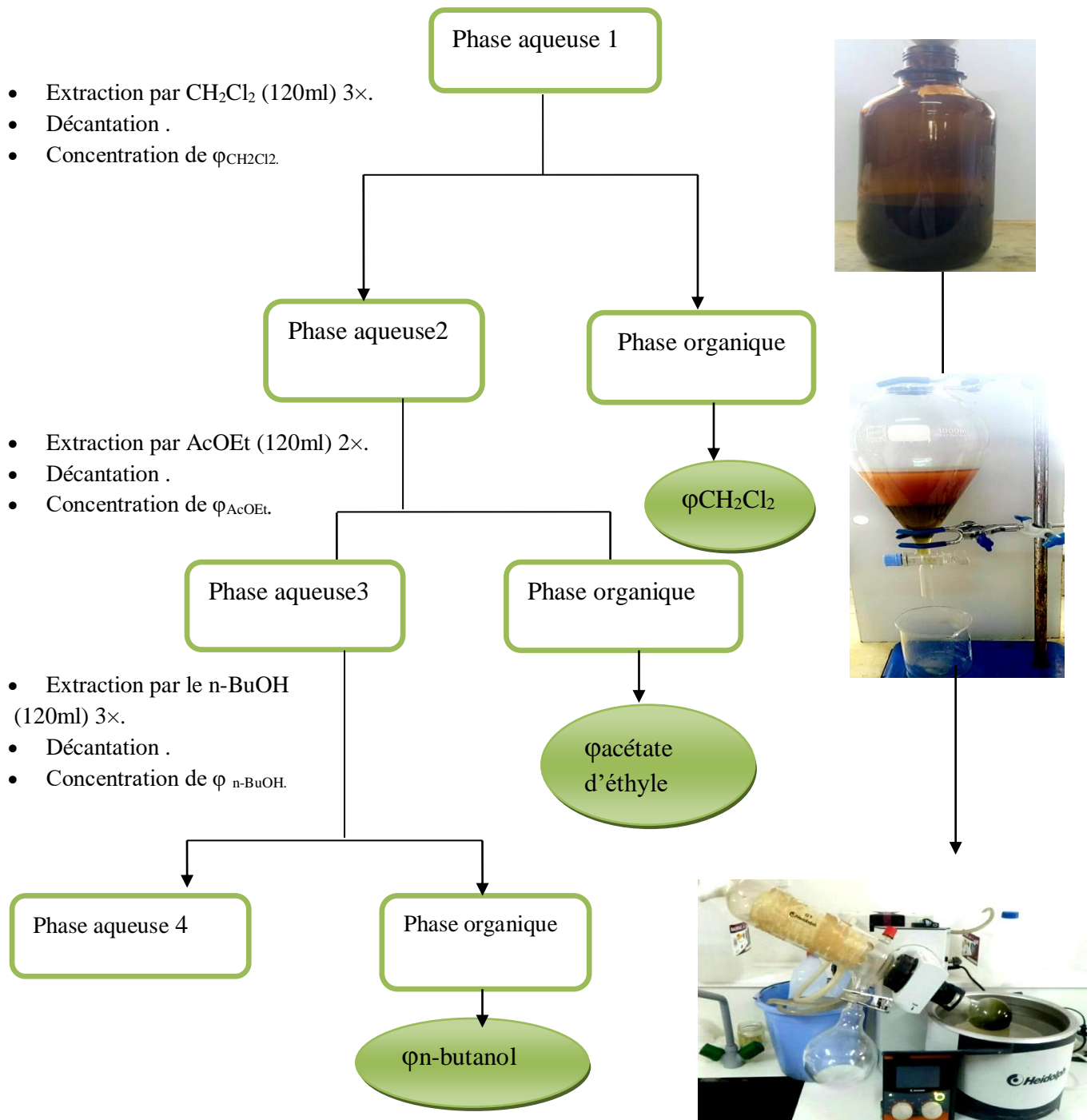


Schéma .5. Le protocole d'extraction Liquide -Liquide par différentes phases [86].

*Etude analytique (qualitative)
de l'extrait par CCM et HPLC*

I. Etude analytique (qualitative) des différents extraits par CCM

Le choix de l'éluant est essentiel. Il n'est pas toujours fourni avec le mode opératoire et il est important de savoir le choisir. L'éluant est souvent un mélange de plusieurs (2 ou 3) solvants dans des proportions bien établies. Ce choix dépend de la polarité.

Pour obtenir un meilleur système chromatographique pour l'extrait polaire, la phase stationnaire donc sera le gel de silice de même pour la phase mobile on a effectué beaucoup de test pour choisir le meilleur éluant :

1. (Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau) : (8.1 /1.1/0.81).
2. (Chloroforme/ Acétate d'éthyle /Acide acétique) : (4.54/4.54 /0.909).
3. (Chloroforme/Méthanol / Acide acétique /Eau) : (8.635/1.295/250 μ l/431 μ l).
4. (Chloroforme/ Acétate d'éthyle /Acide formique) : (5/4/1).
5. (Toluène/Acétate d'éthyle /Méthanol) : (5/3/2)
6. (Ethanol/Dichlorométhane) : (2/8) ;(5/5)
7. (Acétate d'éthyle/ Chloroforme) : (8/2) ;(7/3) ;(6/4).
8. (Méthanol/Dichlorométhane) : (9/1) ;(8/2) ;(7/3) ; (5/5).
9. (Dichlorométhane/Ethanol/Eau): (8.37/1.47/0.147) ;(8.5/0.75/0.75) ; (8/1/1) ; (7.5/1.25/1.25) ;(5/2.5/2.5) ;(2.25/2.25/5.5) ;(2/2/6) [76].



Figure .26. Les systèmes de CCM utilisés pour l'analyse de l'extrait butanolique [BMD].

Après migration du système sur la plaque CCM, on procède à la révélation des chromatogrammes par une lampe UV : à 254 nm (extinction de la fluorescence) et 366 nm (fluorescence propre).

II. Analyses par HPLC :

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) offre une approche analytique basée sur l'interaction de type stérique, polaire ou d'adsorption entre la phase stationnaire et l'échantillon. Par conséquent, nous avons adopté cette technique pour analyser et connaître les conditions optimales pour la séparation des composés.

II.1. La description de l'appareil

La plateforme HPLC (YL 9100 HPLC système) est composée de :

- ✓ un dégazeur.
- ✓ une pompe quaternaire.
- ✓ La colonne utilisée était une Atlantis Dc18 (5µm, 4,6 x 250 mm).
- ✓ un détecteur UV-Visible.



Figure .27.Appareil HPLC YL 9100 utilisé dans notre travail..

Programme YL- Clarity

Les systèmes de données sophistiqués YL-Clarity est facile pour utiliser et offrir une gestion étendue des données ainsi qu'un contrôle total des produits HPLC YL9100 entiers.

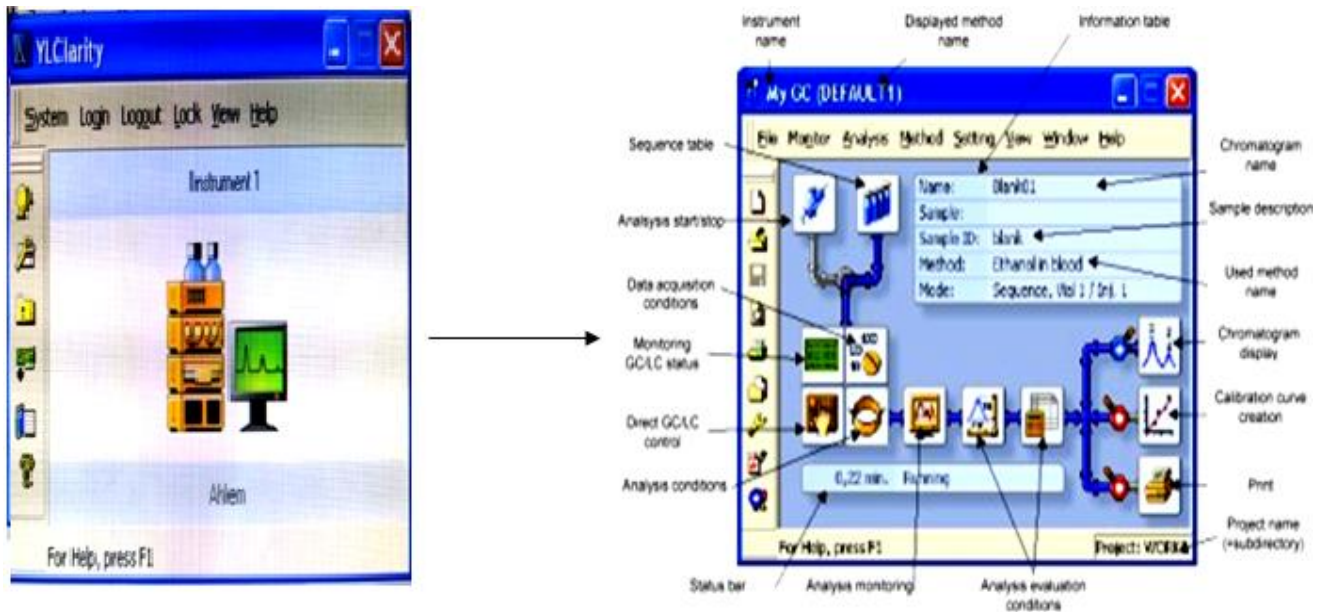


Figure .28. Logiciel YL- Clarity. Utilisé dans l'exploitation des résultats.[BMD].

II.2. Préparation des échantillons

L'analyse par HPLC effectuée sur l'extrait butanolique. L'échantillon est préparé à partir 1mg d'extrait butanolique et 10ml de MeOH grade HPLC.

II.3. Analyse de l'extrait butanolique par HPLC :

D'après la littérature [3;78 ;80;83] on a effectué une analyse par HPLC de l'extrait butanolique (1mg/ml). La phase mobile est un mélange de solvants binaire composé d'acétonitrile (solvant A), et d'eau (solvant B).

Cette analyse a été réalisée à température ambiante de 25°C.

III. Optimisations des conditions opératoires pour l'analyse de l'extrait par HPLC

L'injection normale de l'extrait a donné le chromatogramme suivant :

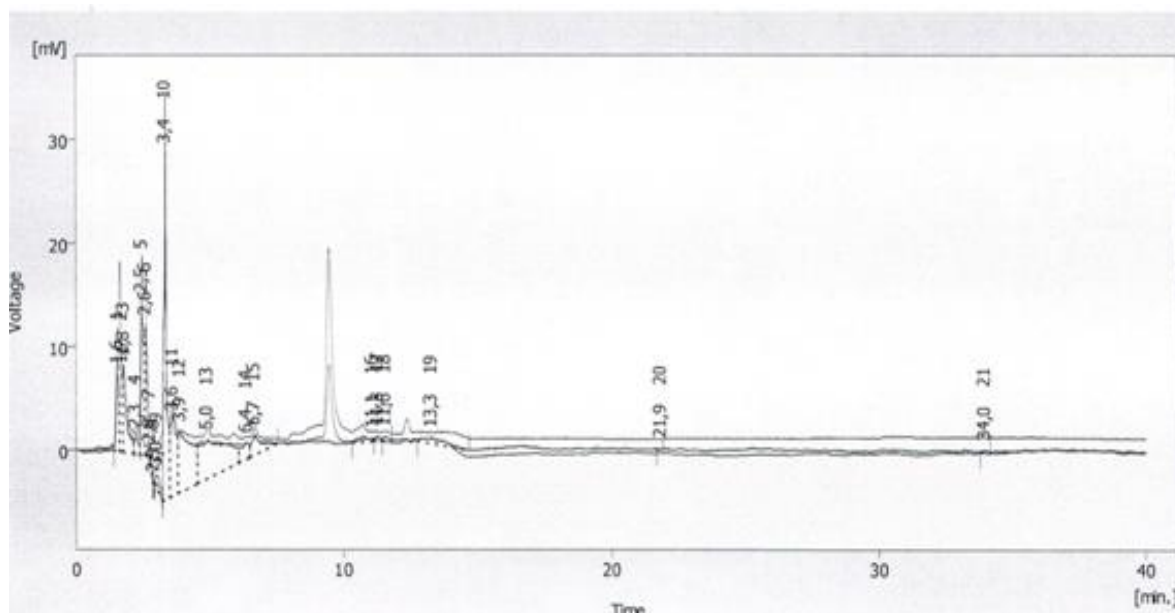


Figure .29. Chromatogramme de l'extrait butanolique [BMD].

On constate que ce chromatogramme n'est pas parfait (séparation médiocre) d'où la nécessité de l'optimisation des conditions opératoires en termes de débits, polarité, etc. pour parfaire cette analyse.

III.1. Longueur d'onde λ :

Nous appliquerons les trois longueurs d'onde (254, 280 et 330nm) [83 ;87-88], et en fonction des résultats obtenus, nous déterminerons la longueur d'onde la plus appropriée pour notre analyse.

III.2. Polarité de la phase mobile :

Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en

mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluant qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés.

Pour cela, nous avons fait de nombreuses modifications dans la polarité de la phase mobile qui sont indiqués dans les tableaux suivants :

Tableau .6. l'analyse de l'extrait butanolique par HPLC en fonction de Polarité de la phase mobile

Système (a)			Système (b)			Système (c)			Système (d)			Débit
t (min)	A%	B%	t(min)	A%	B%	t(min)	A%	B%	t (min)	A%	B%	1 (ml/min)
0	5	95	0	5	95	0	25	75	0	27	73	
2	5	95	2	10	90	2	30	70	2	29	71	
20	25	75	8	10	90	20	35	65	20	31	69	
50	50	50	10	25	75	50	40	60	50	33	67	
/	/	/	15	30	70	/	/	/	/	/	/	

À travers le chromatogramme de chaque phase mobile, nous choisissons celle qui a donné le meilleur résultat.

III.3. Débit (ml/min) :

Pour cette analyse, nous avons varié le débit trois fois : 1 ;0,9 et 0,8 ml /min.

Tableau.7. l'analyse de l'extrait butanolique par HPLC en fonction du débit de la phase mobile

Temps(min)	A %	B%	Débit (ml/min)		
0	5	95	1	0.9	0.8
2	5	95	1	0.9	0.8
20	25	75	1	0.9	0.8
50	50	50	1	0.9	0.8

III.4. Détection :

Pour modifier la détection on a modifié les suivants :Global peak width : (0.5 min et 0.1 min) et Global threshold : (1mv et 0.1 mv)

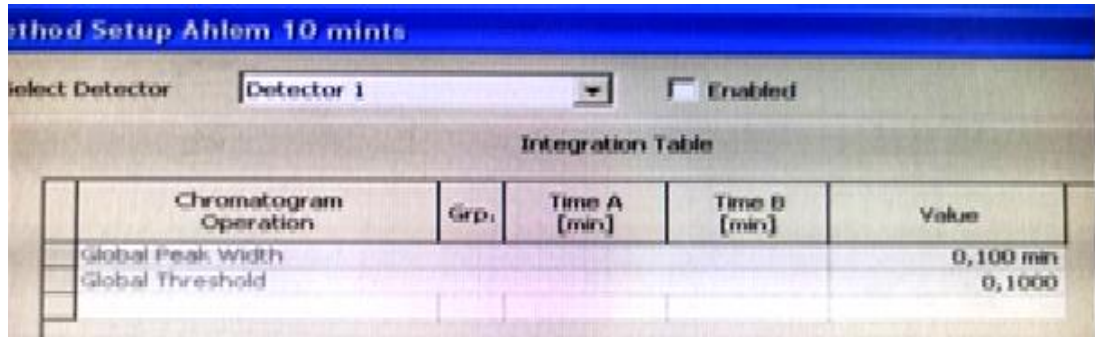


Figure .30. Caractéristiques de la détection par YL – CLARITY.

*Séparation d'un mélange
complexe par CCM et analyse
des fractions par HPLC*

I. Séparation d'un mélange complexe :**I.1. Séparation par CCM :**

Après avoir choisi le meilleur système chromatographique avec quelques modifications, nous réappliquons ce système sur une plaque plus grande (10×20cm).

Après migration du système sur la plaque CCM, on procède à la révélation des composantes par une lampe UV : à 254 nm et 366 nm .

L'interprétation qualitative des chromatogrammes s'effectue par la détermination des facteurs de rétention R_f . La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, Elle dépend de la composition de l'éluant utilisé. Ce R_f est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant.

$$R_f = \frac{x}{y} = \frac{\text{hauteur de la tache}}{\text{hauteur du front du solvant}}$$

I.2. Analyse par HPLC :

A la fin de l'analyse CCM on racle les taches obtenues, on les dissout dans le méthanol grade HPLC, on les filtre deux fois, et ensuite on réalise une analyse par HPLC. Le protocole de la séparation par CCM et HPLC pour le système choisi est représenté dans **le Schéma 6** :

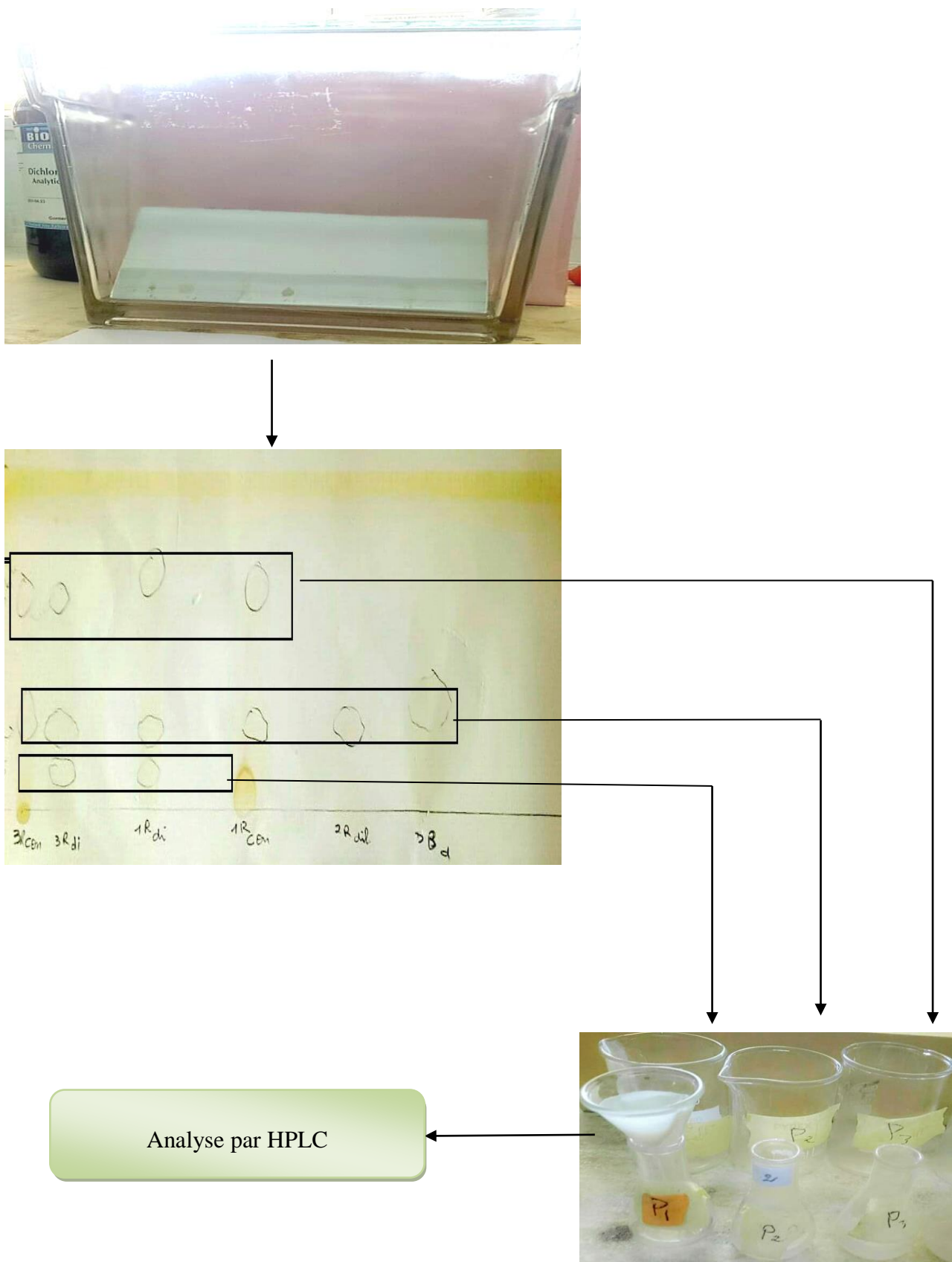


Schéma .6. protocole d'analyse chromatographique CCM et HPLC[BMD].

Résultats et Discussions

Résultats et Discussions

I. Rendements d'extraction :

Les rendements des trois extraits (E_{BuOH} , E_{DCM} , E_{AcOEt}) sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau.8. Rendements de l'extrait des feuilles d'olivier.

Matériel végétal	Extrait	Rendements (%)
Les feuilles d'olivier	Dichlorométhane	2.498
	Acétate d'éthyle	2.434
	n- butanol	13.31

On constate que les rendements sont différents dans les trois extraits : E_{BuOH} , E_{DCM} et E_{AcOEt} , De plus ces extraits présentent une bonne solubilité dans le méthanol.

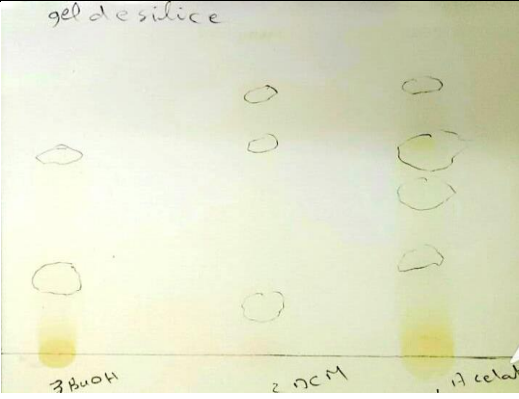
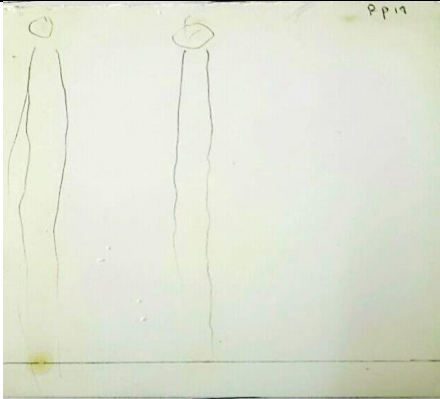
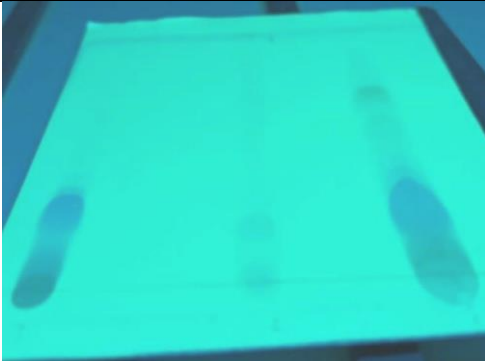

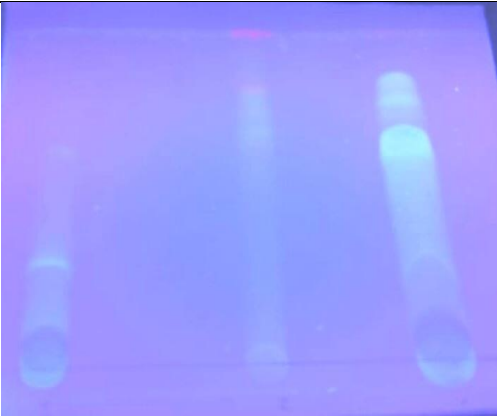
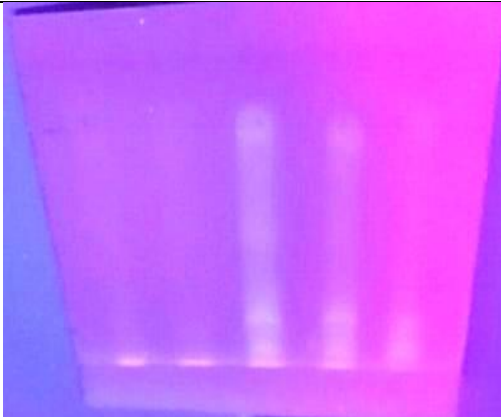
II. Etude analytique (qualitative) des différents extraits par CCM

II.1. Choix de la phase stationnaire

Afin de déterminer la phase stationnaire appropriée pour l'analyse des échantillons, nous avons choisi deux phases (gel de silice ; Rp18 griffé). Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau.9. Résultats obtenus dans le choix de la phase stationnaire

Système : CH₂Cl₂/EtOH/H₂O : (28 /4.41/0.441)


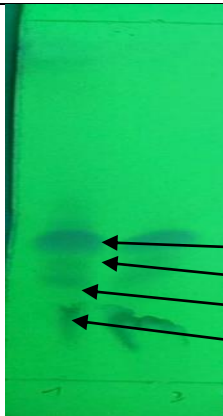




Type de CCM	Gel de silice	Rp18 griffé
Révélation à la lumière du jour		
Révélation à UV 254 nm		
Révélation à UV 360nm		
R_f	R_f extrait BuOH : R_{f,1}= 0.24 ; R_{f,2}= 0.62 R_f extrait DCM : R_{f,1}=0.15 ; R_{f,2}=0.67 ; R_{f,3}=0.82 . R_f extrait AcOEt : R_{f,1}=0.32; R_{f,2}=0.52 R_{f,3} = 0.66; R_{f,4} = 0.86 .	N.S

D'après les résultats précédents, nous remarquons que la révélation des spots est plus claire par l'utilisation de gel de silice, donc la phase appropriée pour l'analyse des échantillons est le gel de silice.





II.2. Choix de la phase mobile

On a résumé les résultats obtenus par les systèmes : 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 dans le tableau suivant :

Tableau.10. Chromatogrammes des systèmes 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5.

Système	Révélation à la lumière du jour	Révélation à UV 254 nm ou 360nm	R _f
Sys1:EtOAc/MeOH/H₂O 8.1 /1.1/0.8			R_{f,4}= 0.34 R_{f,3}= 0.27 R_{f,2}= 0.24 R_{f,1}= 0.16
Sys2 :CHCl₃/ EtOAc/CH₃COOH (4.54/4.54 /0.909).			N.S
Sys3: CHCl₃/MeOH /CH₃COOH /H₂O (8.635/1.295/250µl/431µl).			N.S

Les chromatogrammes des systèmes 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 (suite).

Système	Révélation à la lumière du jour	Révélation à UV 254 nm ou 360 nm	R _f
Sys4 : CHCl ₃ / EtOAc/HCOOH (5/4/1).			N.S
Sys5 : phCH ₃ /EtOAc/MeOH (5/3/2).			N.S

On remarque que :

Le nombre des spots fractionnés est variable en fonction de système d'éluion utilisé. L'éluion des plaques par :



sys1 :

A révélé la présence de quatre spots qui n'ont pas clairement éloigné. \Rightarrow mauvais système.

Sys 2, 3, 4,5 :

Migration forte vers le haut de la plaque proche du front de l'éluant. \Rightarrow Mauvais système.




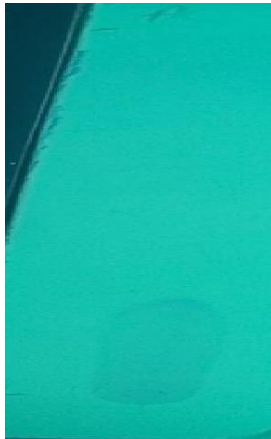
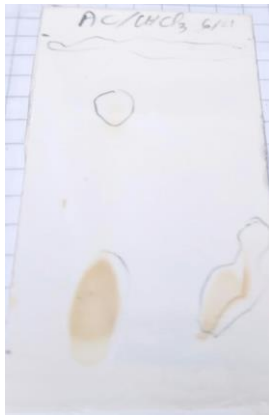

Tableau.11. Résultats des chromatogrammes de système 6.

Sys 6 : Ethanol / Dichlorométhane			
Proportion de EtOH / CH ₂ Cl ₂	Révélation à la lumière du jour	Révélation à UV 254 nm	R _f
5/5			N.S
2/8			N.S

Sys 6 : 5 /5 \Rightarrow Mauvaise migration des spots.

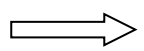
2 /8 \Rightarrow Faible éloignement entre les spots

Tableau.12.Résultats des chromatogrammes de système 7
Sys 7 : Acétate d'éthyle/ Chloroforme

Proportion de EtOAc / CHCl ₃	Révélation à la lumière du jour	Révélation à UV 254 nm	R _f
8/2			N.S
7/3			N.S
6/4			N.S

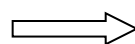
Sys 7 :

8/2, 7.3 :les spots sont restés sur la ligne de base







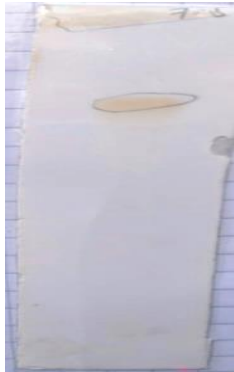



Mauvais système.

6/4 : observation d'un seul spot qui a faiblement migré




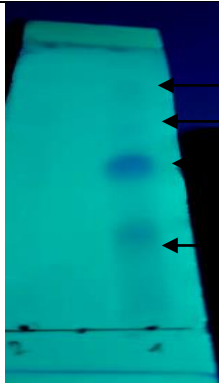

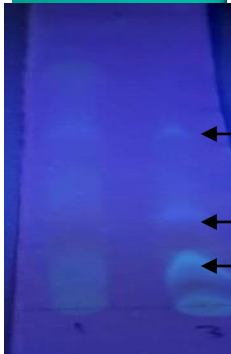




Mauvais système.

Tableau.13. Chromatogrammes de système 8.

Proportion de MeOH / CH ₂ Cl ₂	Révélation à la lumière du jour	Révélation à UV 254 nm	R _f
9/1			N.S
8/2			N.S
7/3			N.S
5/5			N.S







Sys 8 : mauvaise migration vers le haut de la plaque proche du front de l'éluant.

Tableau.14. Résultats des chromatogrammes de système 9.

Sys 9 : Dichlorométhane / Ethanol /Eau			
Proportion de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$	Révélation à la lumière du jour	Révélation à UV 254 nm	R_f
8.37/1.47/0.147			$R_{f4}=0.77$ $R_{f3}=0.6$ $R_{f2}=0.487$ $R_{f1}=0.26$
8.5/0.75/0.75			$R_{f,3}=0.28$ $R_{f,2}= 0.15$ $R_{f,1}=0.063$
8/1/1			N.S
7.5/1.25/1.25			N.S

Résultats des chromatogrammes de système 9 (suite).

Sys 9 : Dichlorométhane / Ethanol /Eau

Proportion de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$	Révélation à la lumière du Jour	Révélation à UV 254 nm ou 360nm	R_f
5/2.5/2.5			N.S
2.25/2.25/5.5			N.S
2/2/6			N.S

Pour ce système (Sys 9), on déduit ce qui suit :

(8.37/1.47/0.147): Bonne séparation, ce qui permet de calculer distinctement les valeurs de R_f

(8.5/0.75/0.75) : Migration assez bonne, les spots sont modérément séparés.

(8/1/1) ; (7.5/1.25/1.25) ; (5/2.5/2.5) ; (2.25/2.25/5.5) ; (2/2/6).: Migration totale vers le haut de la plaque, aucune caractérisation possible.

D'après les résultats précédents, nous concluons que :

- ✓ Lorsque l'interaction est polaire/polaire \Longrightarrow La migration est lente.
- ✓ Lorsque l'interaction est polaire/apolaire \Longrightarrow La migration est rapide.
- ✓ Valeur élevée du facteur de rétention \Longrightarrow La composante est polaire et plus soluble dans la phase mobile (φ_m).
- ✓ Faible valeur du facteur de rétention \Longrightarrow La composante est apolaire et plus soluble dans la phase mobile (φ_m).

Par conséquent, le meilleur système pour analyser l'extrait est : (Dichlorométhane/Ethanol/Eau) : (8.37/1.47/0.147).

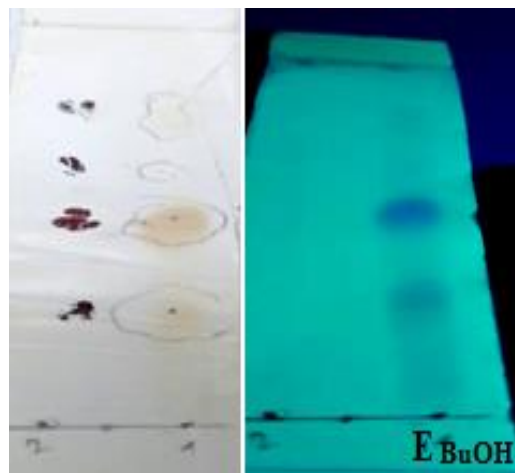


Figure .31.Chromatogramme CCM optimisé pour l'analyse de l'extrait butanolique.

III. Etude analytique (qualitative) des extraits par HPLC

III.1. Analyse de l'extrait des feuilles d'olivier obtenu d'après la littérature

✓ **En 2012.** Aouidi, F *et al* ont effectué les analyses quantitatives des polyphénols dans les extraits de feuilles d'olivier par HPLC, les résultats de cette analyse sont présentés dans le chromatogramme suivant [3].

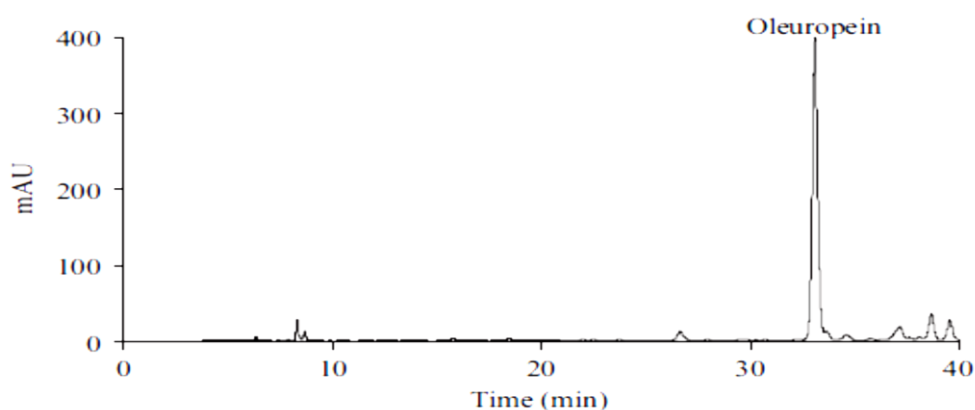


Figure. 32. Chromatogramme HPLC d'un extrait d'échantillon de feuille d'olivier. Pic oleuropéine ($t_R = 33,07$ min). La détection était à 280 nm [3].

✓ **Altiok ,Eet al, en 2008,** ont analysé les polyphénols des extraits des feuilles d'olivier (*Olea europaea* L.) isolé avec une technique adsorption sur la fibre par HPLC, les résultats de cette analyse ils sont présentés dans le chromatogramme et le tableau suivant [78].

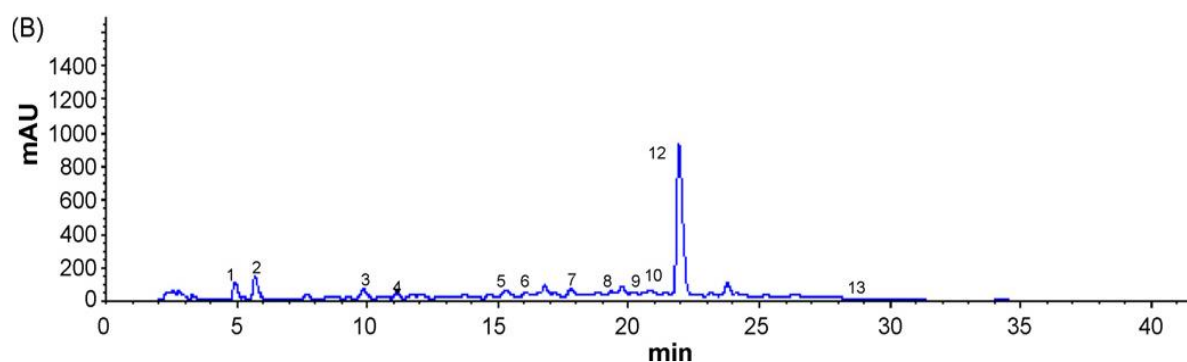


Figure. 33. Profil HPLC d'extraits bruts de feuilles d'olivier (2% OLE, P/v) [78].

Tableau.15. Analyse des composés phénoliques de l'extrait des feuilles d'olivier par HPLC d'après la littérature

Phenolics	# Of peak	% Peak area
Hydroxytyrosol	1	2.27
Tyrosol	2	1.85
Catechin	3	2.23
Caffeic acid	4	1.09
Vanillic acid	5	3.076
Vanillin	6	2.519
Rutin	7	4.66
Luteolin-7-glucoside	8	1.92
Verbascoside	9	6.1
Apigenin-7-glucoside	10	2.3
Diosmetin-7-glucoside	11	—
Oleuropein	12	29
Luteolin	13	0.8

- ✓ l'analyse par HPLC de l'extrait des feuilles d'olivier, effectuée par **K.Kiritsakis *et al*, en 2010**, a donné les chromatogrammes suivants [80].

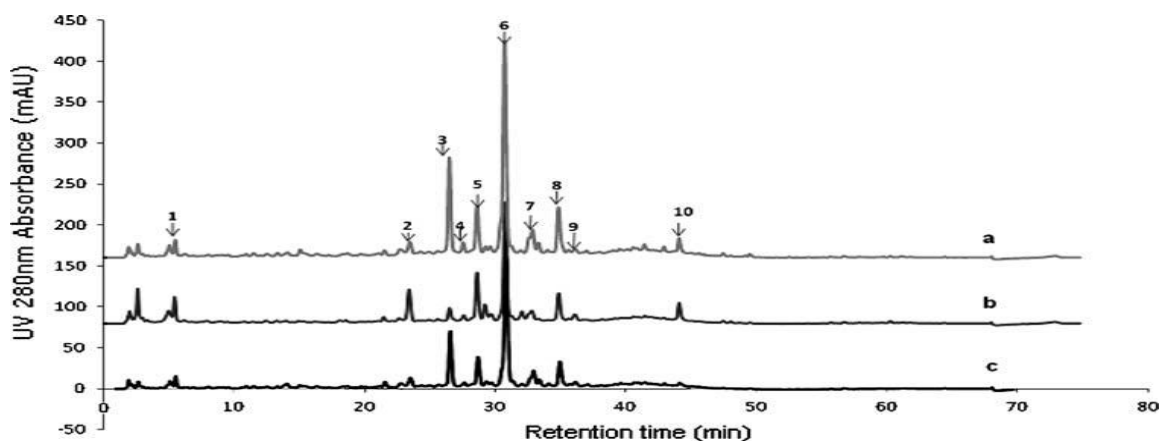


Figure.34. Chromatogrammes RP-HPLC des extraits des trois cultivars à 280 nm (1 secologanoside, 2 déméthyleuropeïne, 3 oleuropeindiglucoside, 4 lutéoline-7-O-glucoside, 5 rutine, 6 oleuropeïne, 7 oleuroside, 8 quercétine, 9 ligstroside, 10 verbeascoside). (akalamon, b koroneiki, c megaritiki)[83].

- ✓ En 2014, Al-Rimawi, F. a développé et validé une méthode simple et précise pour la détermination de l'oleuropeïne par RP-HPLC [83].

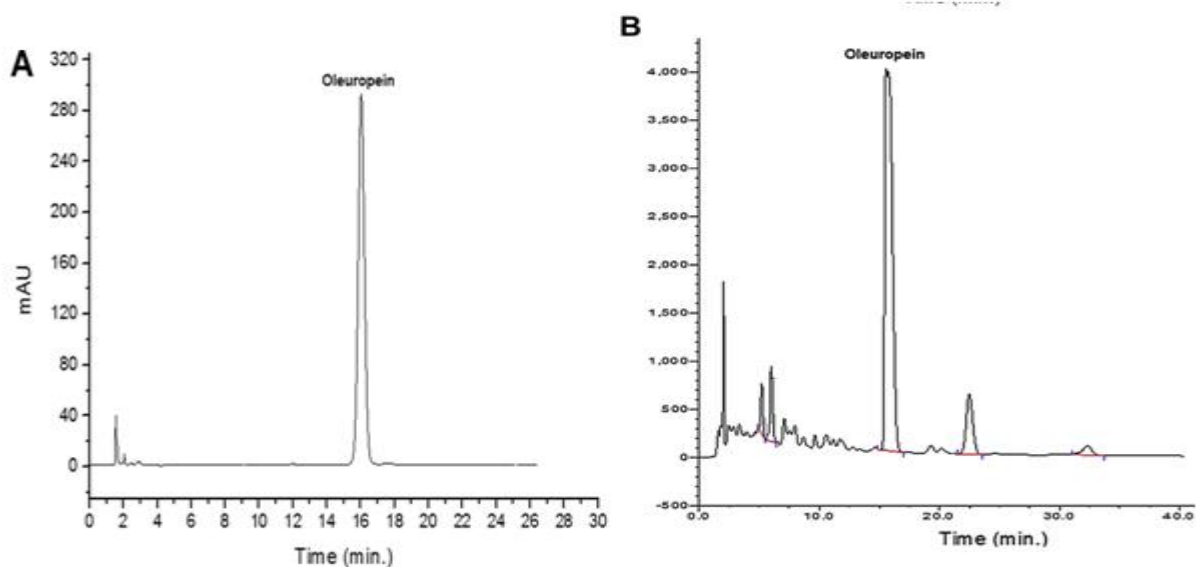
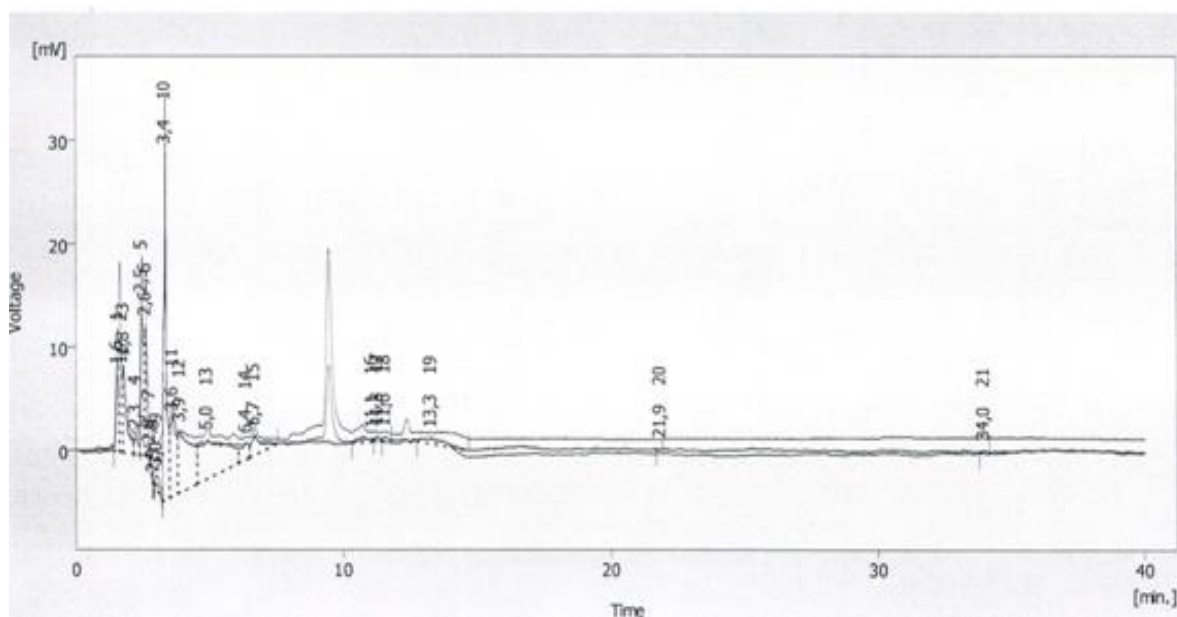


Figure.35.Chromatogramme d'oleuropéine. (A) Étalon d'oleuropéine. (B) Échantillon de feuilles d'olivier analysées pour l'oleuropéine $t_R= 16$ min ; d'autres pics qui apparaissent dans le chromatogramme sont pour d'autres composés présent dans les feuilles d'olivier[83].

III.2. Analyse par HPLC de l'extrait butanolique :



D'après la littérature et les résultats obtenus par HPLC de l'extrait des feuilles d'olivier et spécifiquement l'analyse d'oleuropéine, nous confirmons l'identification de « l'oleuropéine » (majoritaire) (Figure .29).

IV. Optimisation des conditions opératoires de l'HPLC :

IV.1. longueur d'onde λ :

Les résultats de l'optimisation par la longueur d'onde sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau.16. Résultats obtenus par les différentes longueurs d'onde utilisées

longueur d'onde λ (nm)	280	254	330
Temps de rétention (t_R)	1.703	1.710	1.710
Area (mV.s)	1966.156	1537.220	1286.911
Heigt (mV)	172.177	136.900	125.444
Area (%)	46.7	43.6	43.9
Heigt (%)	40.3	36.7	37.9
W 05 (min)	0.16	0.15	0.13
Peak purity	852	953	961

Nous remarquons qu'en changeant la longueur d'onde, les données du chromatogramme varient.

Ce qui est prévisible puisque le composé doit avoir un maximum d'absorption à une longueur d'onde caractéristique ce qui est le cas pour notre composé à savoir 280nm. (Résultat conforme à la littérature)[3 ; 83-85].

IV.2. Polarité de la phase mobile :

Les résultats des chromatogrammes obtenus par l'optimisation de la polarité de la phase mobile sont résumés dans le tableau 17.

Tableau.17. Chromatogrammes des systèmes (a,b,c et d).

Longueur d'onde λ (nm)	Système a	Système b	Système c	Système d
Temps de rétention (t_R)	9.477	9.273	10.157	22.170
Area (mV.s)	279.814	494.825	682.440	6392.338
Heigt (mV)	18.141	19.049	34.653	355.506
Area (%)	23.5	24.9	30.2	36.6
Heigt (%)	16.0	15.9	15.9	39.4
W 05 (min)	0.21	0.29	0.24	0.24
Peakpurity	982	494	984	916

Evidemment, le débit de la phase mobile a une grande influence sur la durée d'une analyse mais sa variation ne doit pas être très grande car la perte de charge serait importante pour la phase stationnaire, ce qui entrainerait l'obtention des analyses non fiables. Par ailleurs la diminution du débit conduira à l'augmentation, des temps de rétention mais aussi à une meilleure séparation dans plusieurs cas. Ceci apparait bien dans les résultats obtenus dans ce travail au vu de la figure 36.

IV.4. Détection :

Les chromatogrammes obtenus par l'optimisation de la détection par HPLC sont les suivantes :

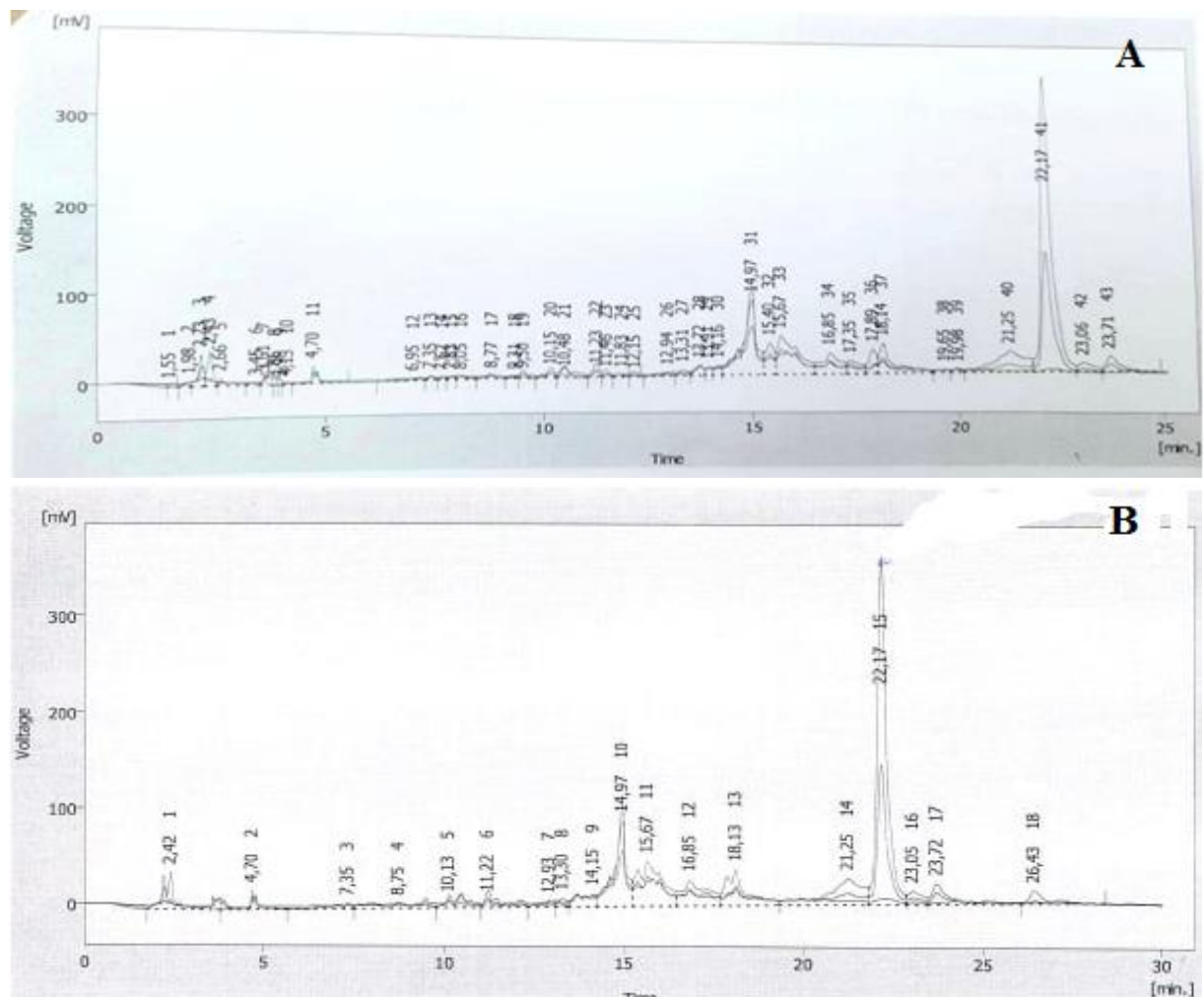


Figure. 37. Chromatogrammes obtenus par la modification de la détection par HPLC
(a : 0.1 min ; 0.1 mv b : 0.5 min ; 1mv)

En comparant les résultats des chromatogrammes A et B, nous remarquons une nette différence dans les pics du chromatogramme, car le chromatogramme B était plus clair que le chromatogramme A. (Si on augmente les facteurs de la sélectivité (Largeur de pic globale Seuil global)) .Par conséquent, les conditions appliquées dans le chromatogramme B: 0,5 min ; 1mv est le mieux adapté pour cette analyse

V. Résultat de la séparation par CCM et analyse des fractions par HPLC

V.1. Résultat de la séparation par CCM

Système A : Dichlorométhane/Ethanol/Eau :(24.9/4.41/0.441)

La révélation de profil chromatographique pour ce système donné dans la figure suivante

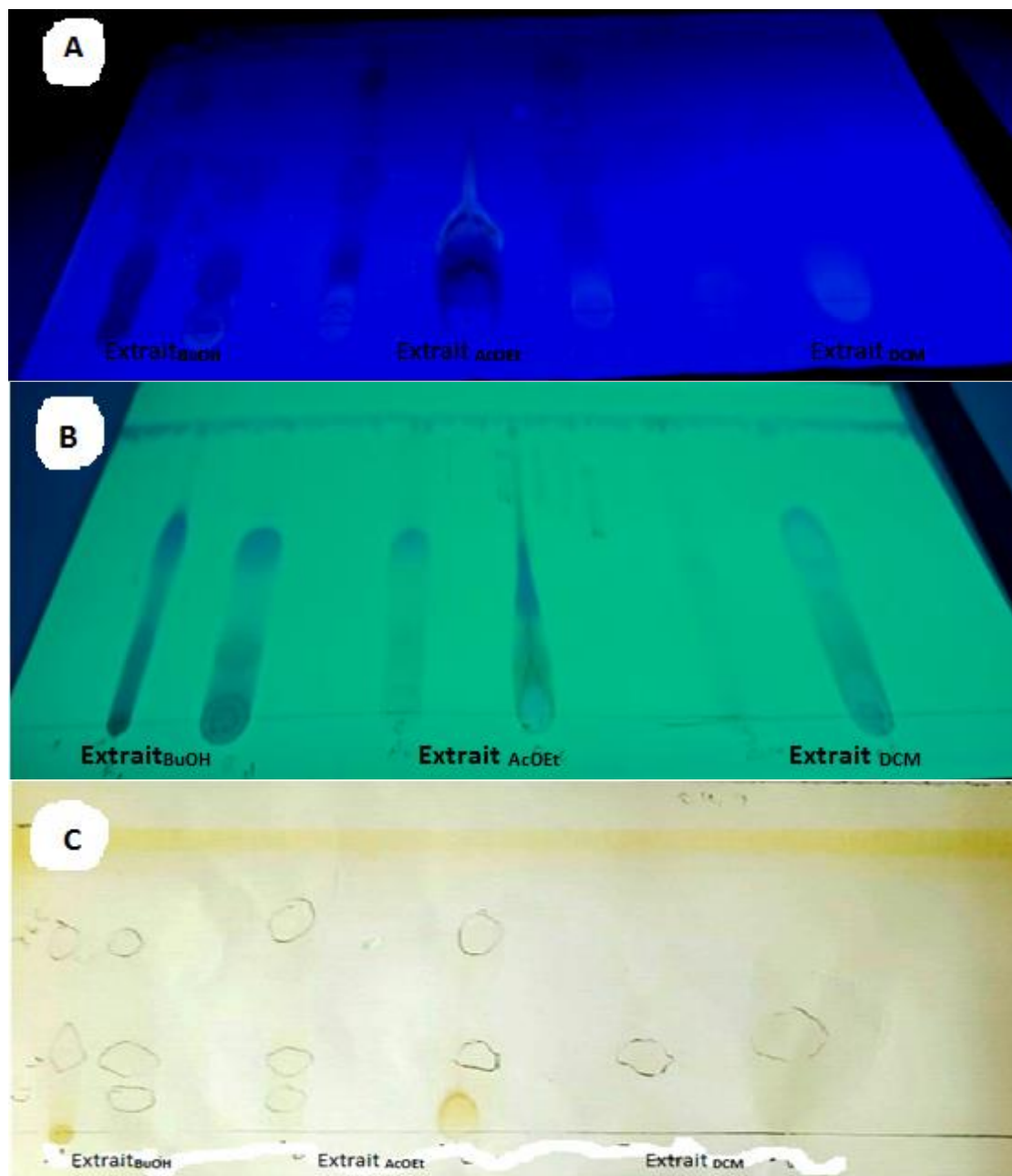


Figure.38. Chromatogramme CCM de l'extrait de *Chemlale* dans le system A. (a : la révélation de chromatogramme par UV 360 nm ; b : la révélation de chromatogramme par UV 254 nm ; c : révélation de chromatogramme à la lumière du jour).

Le profil chromatographique de l'extrait de chemlale a permis de montrer la présence de plusieurs fractions à des R_f différents. Le résultat de la détection des spots par UV et R_f sont représentés dans le tableau 18 suivant :

Tableau.18. chromatogramme de l'extrait des feuilles d'olivier système A

	Extrait_{BuOH}	Extrait_{DCM}	Extrait_{AcOEt}
N° de spot	3	1	3
R_f	$R_{f,1} = 0.117$	$R_{f,1} = 0.235$	$R_{f,1} = 0.117$
	$R_{f,2} = 0.235$		$R_{f,2} = 0.235$
	$R_{f,3} = 0.647$		$R_{f,3} = 0.66$
Colure de spot	254	Spot 1 : /	Spot 1 : Vert claire
		Spot 2 : bleu vert	Spot 2 : bleu vert
		Spot 3 : /	Spot 3 : vert claire
	360	Spot 1 : rose claire	Spot 1 : Rose move
		Spot 2 : rose foncé	Spot 2 : Rose
		Spot 3 : rose claire	Spot 3 : rose Claire

A travers le chromatogramme et le tableau précédent, nous constatons que la migration des échantillons dans ce système était bonne, ce qui nous a permis de calculer des valeurs variables de R_f .

On conclu aussi que :

- ✓ Valeur élevée du facteur de rétention \implies La composante est polaire et plus soluble dans la phase mobile (ϕ_m).
- ✓ Faible valeur du facteur de rétention \implies La composante est apolaire et plus soluble dans la phase mobile (ϕ_m).

Système B : Dichlorométhane/Ethanol/Eau : (28/4.41/0.441)

La révélation de profil chromatographique pour ce système donné dans les figures suivantes :

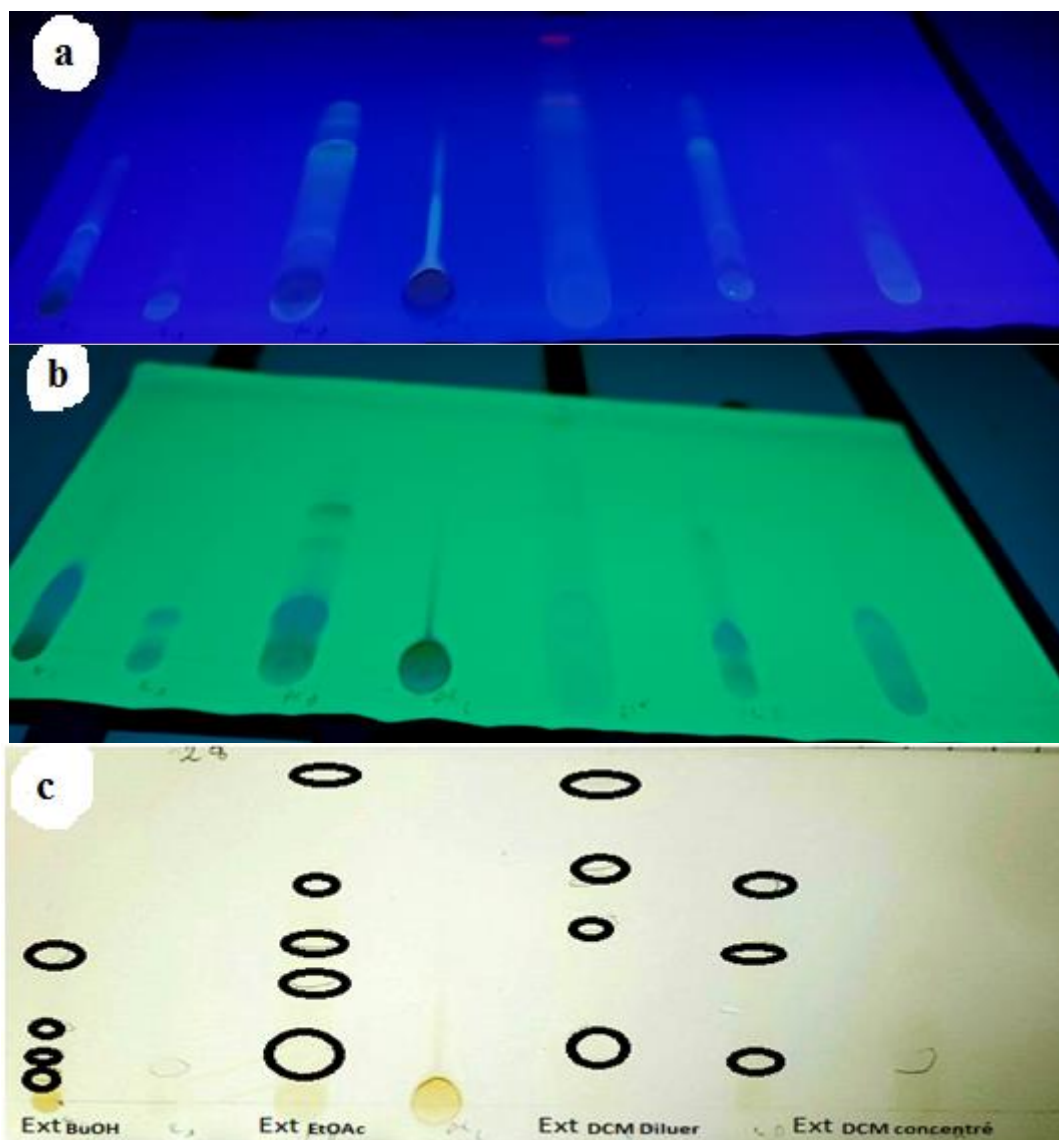


Figure.39. Chromatogramme CCM de l'extrait de *Chemlale* dans le système B ;

a : la révélation de chromatogramme par UV 360 nm

b : la révélation de chromatogramme par UV 254 nm

c:révélation de chromatogramme à la lumière du jour

Tableau.19. chromatogramme de l'extrait des feuilles d'olivier système B

	Extrait _{BuOH}	Extrait _{AcOEt}	Extrait _{DCM}
N° de spot	4	5	3
R_f	R _{f,1} = 0.086	R _{f,1} = 0.2	R _{f,1} = 0.15
	R _{f,2} = 0.137	R _{f,2} = 0.537	R _{f,2} = 0.475
	R _{f,3} =0.212	R _{f,3} =0.662	R _{f,3} = 0.662
	R _{f,4} =0.425	R _{f,4} =0.7	
		R _{f,5} =0.93	
Couleur de spot	254	Spot 1 : bleu vert	Spot 1 : vert claire
		Spot 2 : /	Spot 2 : bleu
		Spot 3 : /	Spot 3 : /
Couleur de spot	360	Spot 1 : Rose foncé	Spot 1 : Rose move
		Spot 2 : Rose foncé	Spot 2 : Rose Claire
		Spot 3 : Rose foncé	Spot 3 : Rose Claire
		Spot 4 : Rose Claire	Spot 4 : Rose Claire
			Spot 5 : Rose Claire

D'après le chromatogramme et le tableau précédent, nous constatons que la migration des échantillons dans ce système était bonne, ce qui permet de calculer les différentes valeurs de R_f.

On note également que certaines taches sont apparues à la longueur d'onde 360 nm et n'apparaissaient pas à la longueur 280 nm, ce qui confirme que l'extrait contient de nombreux composés phénoliques. On conclut aussi que :

- ✓ Valeur élevée du facteur de rétention \implies La composante est polaire et plus soluble dans la phase mobile (φ_m).
- ✓ Faible valeur du facteur de rétention \implies La composante est apolaire et plus soluble dans la phase mobile (φ_m).

De ce qui précède, nous avons conclu que pour une bonne analyse de l'extrait, nous devons appliquer les conditions suivantes :

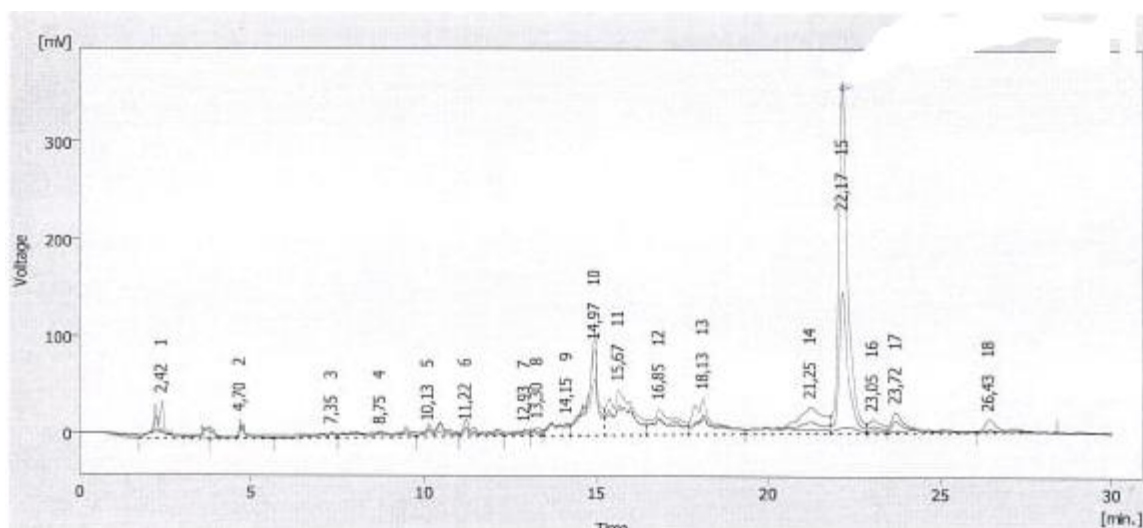


Figure .40.Chromatogramme HPLC obtenu après l'optimisation des conditions d'analyse de l'extrait.

Tableau.20.Conditions optimales pour l'analyse de l'extrait butanolique par HPLC

Temps (min)	A %	B%	Débit (ml/min)	Global peak width(min)	Global threshold(mv)	Louneur d'onde (nm)
0	5	95	0.8	0.5	1	280
2	10	90	0.8	0.5	1	280
8	15	85	0.8	0.5	1	280
10	25	75	0.8	0.5	1	280
15	27	73	0.8	0.5	1	280
20	30	70	0.8	0.5	1	280
25	33	67	0.8	0.5	1	280

Les fluctuations de la ligne de base s'explique par la présence d'impuretés de silice dans l'échantillon.

Système B : Dichlorométhane/Ethanol/Eau : (28/4.41/0.441)

Les résultats de l'analyse du système B par HPLC sont illustrés par la figure 42 suivante :

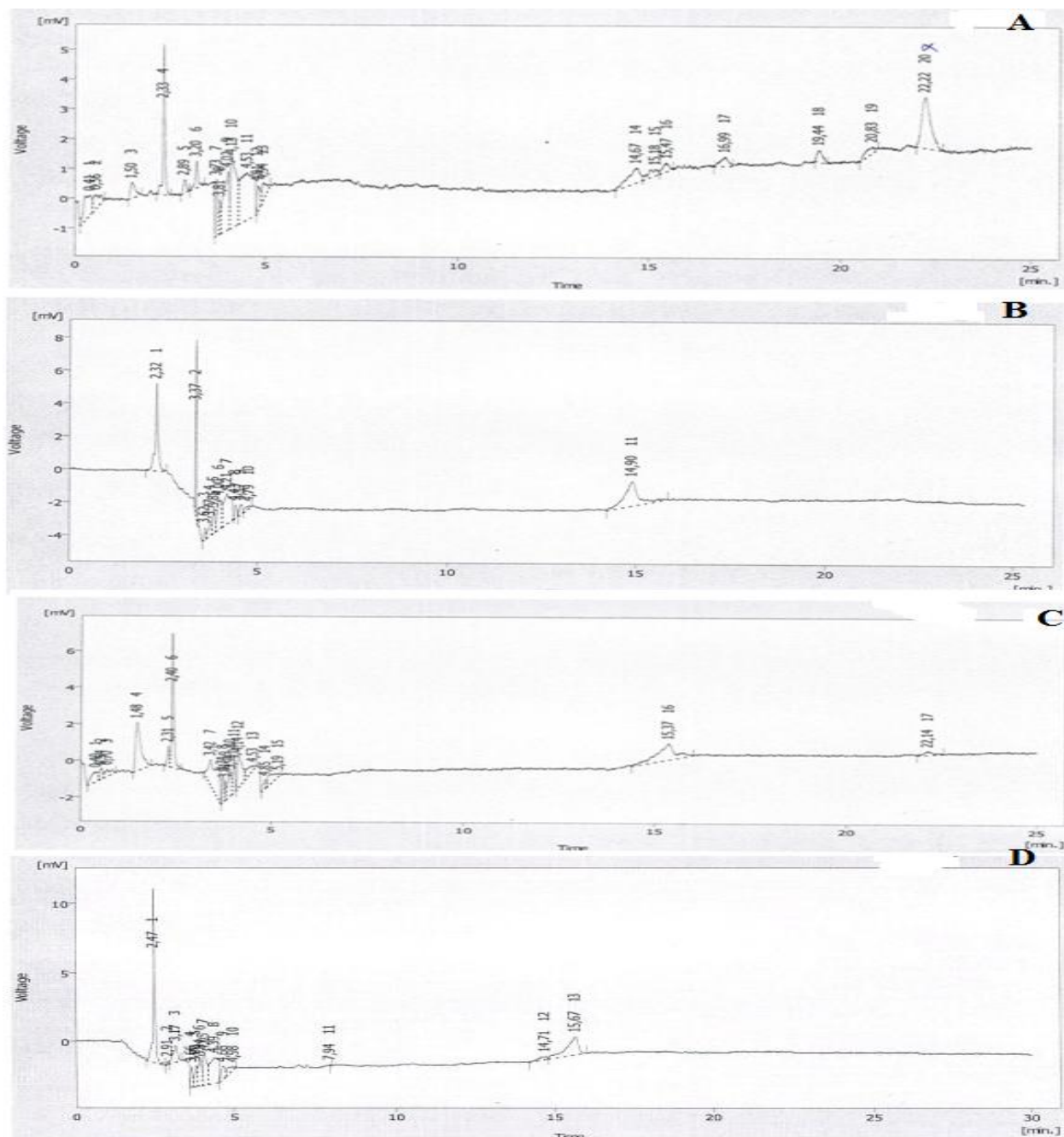


Figure.42. Chromatogramme de A : BS1+BS2 B : BS3 C:BS4 et D:BS5.

D'après les chromatogrammes des taches séparées, nous n'avons pas pu séparer le composé principal mais nous avons réussi à réduire la charge de l'extrait de butanol, l'injection de la solution qui contient la tâche d'oleuropéine était plus claire pour l'identification de ce composé.

Grâce à ces résultats, nous combinons les échantillons similaires dans le chromatogramme

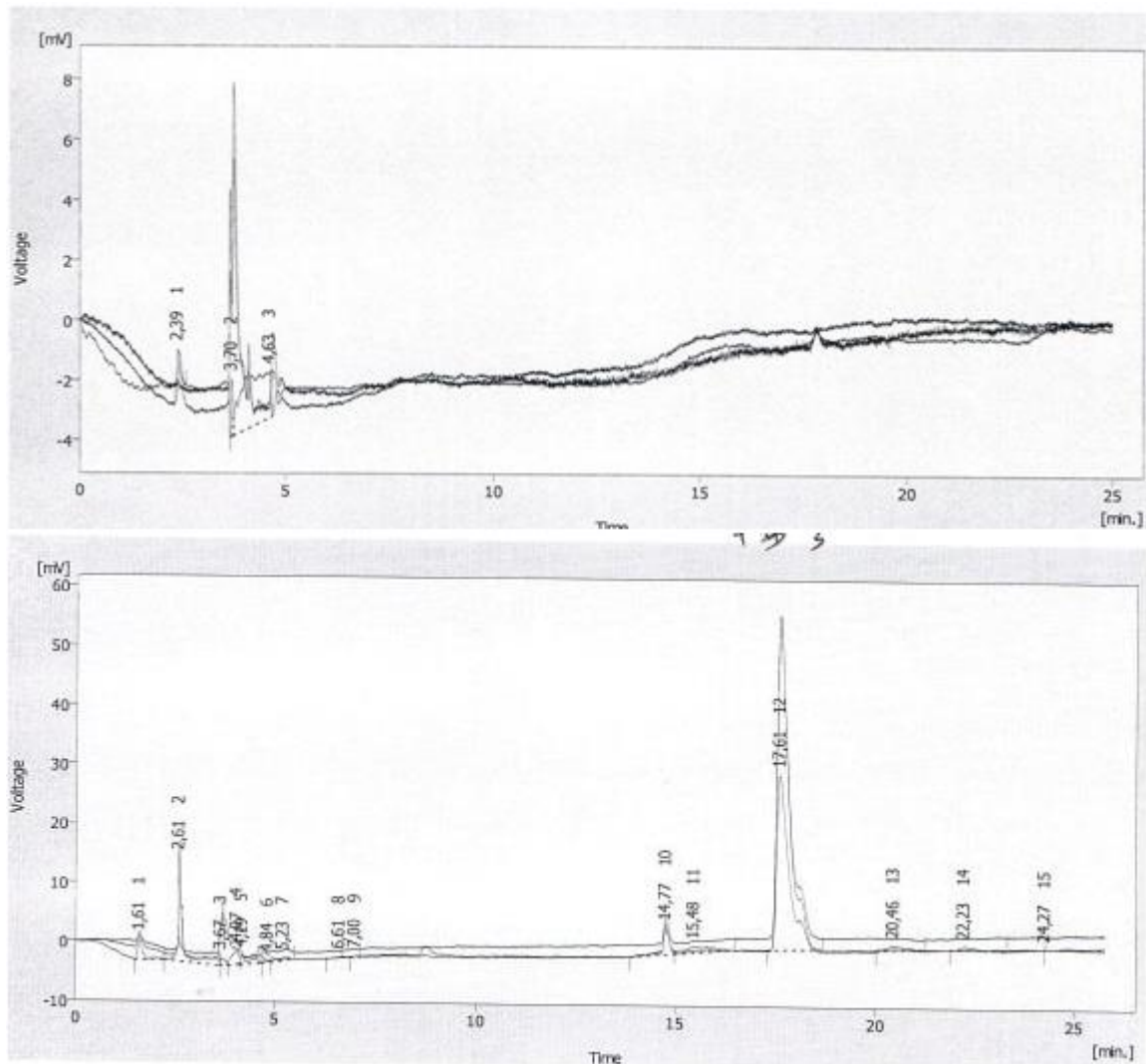


Figure.43. Chromatogramme HPLC de la fraction des systèmes A et B

On remarque que le chromatogramme est moins riche que celui de l'extrait butanolique.

Conclusion

L'objet de notre travail était une étude systématique sur la relation rétention – structure de l'oleuropéine et ses dérivés mais le contre temps dû au problème sanitaire, ne nous a pas permis de développer cette étude telle qu'elle a été conçue initialement. Néanmoins, nous avons pu réaliser l'analyse qualitative de l'oleuropéine en fonction de certains paramètres chromatographiques et une application sur l'extrait des feuilles d'olivier par HPLC

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

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

Les résultats obtenus par HPLC sont cohérents avec les travaux de la littérature, et confirment que ce composé représente le taux le plus élevé dans les feuilles d'olivier.

Il serait également intéressant de séparer et purifier les autres composantes des extraits obtenus (chromatographie préparative), afin de les tester séparément et caractériser éventuellement leurs propriétés biologiques.

Nous pouvons retenir un très bon acquis, à travers ce travail de fin d'études, c'est la maîtrise de l'un des outils analytiques de base : La chromatographie, et l'exploitation méthodologiques de certains résultats.

Références bibliographiques

[1]: Lemoine, H. (2012). Les sécoiridoïdes d'*Olea europaea* et du *Lonicera tatarica*: matières premières destinées à la conception de nouveaux synthons chiraux pour la synthèse de composés biologiquement actifs et outils pour le développement de nouvelles méthodes d'extraction et de synthèse (Doctoral dissertation).

[2]: Omar, S. H. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia pharmaceutica*, 78(2), 133-154.

[3]: Aouidi, F., Dupuy, N., Artaud, J., Roussos, S., Msallem, M., Gaime, I. P., & Hamdi, M. (2012). Rapid quantitative determination of oleuropein in olive leaves (*Olea europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 292-297.

[4]: Rimawi, W. H., & Salim, H. (2016). Wild versus Cultivated Olive Leaves Extracts: Antioxidant Activity, Analysis of Total Phenolics and Oleuropein Content.

[5]: Panizzi, L.; Scarpati, M.; Oriente, G. (1960). The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazz. Chim. Ital.*, 90, 1449–1485.

[6]: Kurkin, V. A., Zapesochayaya, G. G., & Grinenko, N. A. (1990). Iridoids of the bark of *Syringa vulgaris*. *Chemistry of Natural Compounds*, 26(5), 592-593.

[7]: Inouye, H., Yoshida, T., Tobita, S., Tanaka, K., & Nishioka, T. (1974). Über die monoterpenglucoside und verwandte naturstoffe—XXII: Absolutstrukturen des oleuropeins, Kingisids und Morronisids. *Tetrahedron*, 30(1), 201-209.

[8]: Damtoft, S., Franzyk, H., & Jensen, S. R. (1992). Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior*. *Phytochemistry*, 31(12), 4197-4201.

[9]: Ansari, M., Kazemipour, M., & Fathi, S. (2011). Development of a simple green extraction procedure and HPLC method for determination of oleuropein in olive leaf extract applied to a multi-source comparative study. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 8(1), 38-47.

[10]: Takenaka, Y., Tanahashi, T., Shintaku, M., Sakai, T., & Nagakura, N. (2000). Secoiridoid glucosides from *Fraxinus americana*. *Phytochemistry*, 55(3), 275-284.

- [11]: Shen, Y. C., Lin, S. L., & Chein, C. C. (1996). Jaspolyside, a secoiridoid glycoside from *Jasminum polyanthum*. *Phytochemistry*, 42(6), 1629-1631.
- [12]: Konno, K., Yasui, H., Hirayama, C., & Shinbo, H. (1998). Glycine protects against strong protein-denaturing activity of oleuropein, a phenolic compound in privet leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 24(4), 735-751.
- [13]: Romani, A., Pinelli, P., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., Gravano, E., & Tattini, M. (2000). HPLC analysis of flavonoids and secoiridoids in leaves of *Ligustrum vulgare* L.(Oleaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4091-4096.
- [14]: Sugiyama, M.; Machida, K.; Matsuda, N.; Kikuchi, M. A secoiridoid glycoside from *Osmanthus asiaticus*. *Phytochemistry* (1993), 34, 1169–1170.
- [15]: Damtoft, S., Franzyk, H., & Jensen, S. R. (1993). Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry*, 34(5), 1291-1299.
- [16]: Le Tutour, B., & Guedon, D. (1992). Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 31(4), 1173-1178
- [17]: Walter, W. M., Fleming, H. P., & Etchells, J. L. (1973). Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied microbiology*, 26(5), 773-776.
- [18]: Capasso, R., Evidente, A., Visca, C., Gianfreda, L., Maremonti, M., & Greco, G. (1997). Production of glucose and bioactive aglycone by chemical and enzymatic hydrolysis of purified oleuropein from *Olea Europea*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 61(3), 365-377.
- [19]: Gariboldi, P., Jommi, G., & Verotta, L. (1986). Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 25(4), 865-869.
- [20]: Guiso, M., & Marra, C. (2005). Highlights in oleuropein aglycone structure. *Natural product research*, 19(2), 105-109.
- [21]: Bianco, A. D., Piperno, A., Romeo, G., & Uccella, N. (1999). NMR experiments of oleuropein biomimetic hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(9), 3665-3668.

- [22]: Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G., & Zetta, L. (1995). 1 H and 13 C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (12), 1519-1523.
- [23]: Bianco, A., Jensen, S. R., Olesen, J., Passacantilli, P., & Ramunno, A. (2003). Acid rearrangement of secoiridoids related to oleuropein and secologanin. *European journal of organic chemistry*, 2003(22), 4349-4354.
- [24]: Hamza, M., Khoufi, S., & Sayadi, S. (2012). Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater. *Food chemistry*, 131(4), 1430-1436 .
- [25]: de la Puerta, R., Gutierrez, V. R., & Hout, J. R. S. (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical pharmacology*, 57(4), 445-449.
- [26]: Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G. F., & Galli, C. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis research*, 78(2), 151-160.
- [27]: Liu, J., Schalch, W., Wang-Schmidt, Y., & Wertz, K. (2010). U.S. Patent Application No. 12/596,268.
- [28]: Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46(7), 976-988.
- [29]: Maiuri, M. C., De Stefano, D., Di Meglio, P., Irace, C., Savarese, M., Sacchi, R., ... & Carnuccio, R. (2005). Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 371(6), 457-465.
- [30]: Hanessian, S., Mainetti, E., & Lecomte, F. (2006). Synthesis and stereochemical confirmation of the secoiridoid glucosides nudiflosides D and A. *Organic letters*, 8(18), 4047-4049.
- [31]: Tanahashi, T., Takenaka, Y., Nagakura, N., & Nishi, T. (1999). Three secoiridoid glucosides from *Jasminum nudiflorum*. *Journal of natural products*, 62(9), 1311-1315.
- [32]: Tanahashi, T., Takenaka, Y., Nagakura, N., & Nishi, T. (2000). Five secoiridoid glucosides esterified with a cyclopentanoid monoterpene unit from *Jasminum nudiflorum*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 48(8), 1200-1204.

- [33]: Takenaka, Y., Tanahashi, T., Taguchi, H., Nagakura, N., & Nishi, T. (2002). Nine new secoiridoid glucosides from *Jasminum nudiflorum*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 50(3), 384-389.
- [34]: Inanaga, J., Hirata, K., Saeki, H., Katsuki, T., & Yamaguchi, M. (1979). A rapid esterification by means of mixed anhydride and its application to large-ring lactonization. *Bulletin of the chemical society of Japan*, 52(7), 1989-1993.
- [35]: Visioli, F., Bellosta, S., & Galli, C. (1998). Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life sciences*, 62(6), 541-546.
- [36]: Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., ...&Kremastinos, D. T. (2006). The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *The journal of nutrition*, 136(8), 2213-2219.
- [37]: Hamdi, H. K., & Castellon, R. (2005). Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(3), 769-778.
- [38]: Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., & Balsano, C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *International journal of molecular sciences*, 15(10), 18508-18524.
- [39]: Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S. M., Montalcini, T., Pujia, A., & Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of transnational medicine*, 12(1), 219.
- [40]: Han, J., Talorete, T. P., Yamada, P., & Isoda, H. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 59(1), 45-53.
- [41]: Bazoti, F. N., Bergquist, J., Markides, K. E., & Tsarbopoulos, A. (2006). Noncovalent interaction between amyloid- β -peptide (1–40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(4), 568-575.

Liste des Références bibliographiques

- [42]: Daccache, A., Lion, C., Sibille, N., Gerard, M., Slomianny, C., Lippens, G., & Cotelte, P. (2011). Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry international*, 58(6), 700-707.
- [43]: Claridge, M. F., & Walton, M. (1992). The European olive and its pests-management strategies. MONOGRAPHS-BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL, 3-3.
- [44]: Ghedira, K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83-89.
- [45]: Metzidakis I T, (1997). Proceedings of the third international symposium on Olive growing: Acta Horticulture, Crete, Chania & Greece. 1(474).
- [46]: Burnie, G., Forrester, S., Greig, D., & Guest, S. (2006). *Botanica: Encyclopédie de botanique et d'horticulture*. Menges, Paris.
- [47]: Rugini, E. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 14(3), 207-214.
- [48]: Maillard R., (1975). L'olivier .Maison des agriculteurs .Ed .Invuflec .Paris, 147
- [49]: Loussert R .et Brousse G ., (1978) .L'olivier .Ed . Maisoneuvre et Larose , Paris .447
- [50] :https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/16/Olea_europaea_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-229.jpg24/08/2020 23:09 .
- [51]:<https://static.passeportsante.net/i55888-olivier-feuille.jpg> 24/08/2020 23:09 .
- [52]: Civantos, L. (1998). L'olivier, l'huile d'olive et l'olive. *Conseil oléicole international*, p130.
- [53]:www.afidol.org1/6/2020 1:31
- [54]:www.afidol.org infolive24/08/2020 23:09
- [55] : Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., & Sapirstein, H. D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry*, 82(4), 390-393.
- [56] : Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(5), 97

- [57] : Kuwajima, H., Uemura, T., Takaishi, K., Inoue, K., & Inouet, H. (1988). A secoiridoid glucoside from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 27(6), 1757-1759.
- [58] : Wang, X. F., Li, C., Shi, Y. P., & Di, D. L. (2009). Two new secoiridoid glycosides from the leaves of *Olea europaea* L. *Journal of Asian natural products research*, 11(11), 940-944.
- [59] : Bahloul, N., Boudhrioua, N., & Kechaou, N. (2008). Moisture desorption–adsorption isotherms and isosteric heats of sorption of Tunisian olive leaves (*Olea europaea* L.). *Industrial crops and products*, 28(2), 162-176.
- [60] : Zarzuelo, A., Duarte, J., Jimenez, J., Gonzalez, M., & Utrilla, M. P. (1991). Vasodilator effect of olive leaf. *Planta medica*, 57(05), 417-419.
- [61] : Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, M. J., Utrilla, M. P., Jimenez, J., & Osuna, I. (1992). Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta medica*, 58(06), 513-515.
- [62] : Rouessac, F., & ROUESSAC, A. (1997). *Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes*, 6^{ème} édition. ISBN 2 10 048425 7
- [63] : V. Jacob Iut de Chimie de Grenoble (2010) *La Chromatographie Liquide haute Performance (HPLC)*. Salle de TP de Génie Analytique Présentation Théorique de la HPLC
- [64] : Visioli, F., Galli, C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences*, 55(24), 1965-1971.
- [65] : Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R., & Carlini, E. A. (2000). Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*, 35(1), 45-54.
- [66] : Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A. D. R. J., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food chemistry*, 68(4), 457-462.
- [67] : Miljković, D., Dekanski, D., Miljković, Ž., Momčilović, M., & Mostarica-Stojkovic, M. (2009). Dry olive leaf extract ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical Nutrition*, 28(3), 346-350

- [68] :Kimura, Y., & Sumiyoshi, M. (2009). Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *The journal of nutrition*, 139(11), 2079-2086.
- [69] :Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., & Sayadi, S. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and chemical toxicology*, 49(1), 179-184.
- [70] : Sudjana, A. N., D’Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., ... & Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 461-463.
- [71] : Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., ... & Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162.
- [72] : Lee, O. H., & Lee, B. Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource technology*, 101(10), 3751-3754.
- [73] :Markin, D., Duek, L., & Berdicevsky, I. (2003). In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern in vitro. Mycoses*, 46(3-4), 132-136
- [74] :Furneri, P. M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N., & Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International journal of antimicrobial agents*, 20(4), 293-296.
- [75] :Giamarellos-Bourboulis, E. J., Geladopoulos, T., Chrisofos, M., Koutoukas, P., Vassiliadis, J., Alexandrou, I., ... & Tzepi, I. (2006). Oleuropein: a novel immunomodulator conferring prolonged survival in experimental sepsis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Shock*, 26(4), 410-416.
- [76] :Lama-Muñoz, A., Contreras, M. D. M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2019). Optimization of oleuropein and luteolin-7-o-glucoside extraction from olive leaves by ultrasound-assisted technology. *Energies*, 12(13), 2486.
- [77] : Himour, S., Yahia, A., Belattar, H., & Bellebcir, L. (2016). Etude phytochimique des feuilles d’*Olea europaea* L. var Chemlel d’Algérie. *Journal of Bioresources Valorization*, 1(1), 34.

- [78] : Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., & Ülkü, S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 342-348.
- [79] : Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., & Sayadi, S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108(1), 253-262.
- [80] : Kiritsakis, K., Kontominas, M. G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., & Kiritsakis, A. (2010). Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(4), 369-376.
- [81] : Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., & Balansard, G. (2001). Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 618-621.
- [82] : Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., & Di Fonzo, V. (2006). Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(2), 434-440.
- [83] : Al-Rimawi, F. (2014). Development and validation of a simple reversed-phase HPLC-UV method for determination of oleuropein in olive leaves. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 285-289.
- [84] : Bertolini, T., Vicentini, L., Boschetti, S., Andreatta, P., & Gatti, R. (2016). A novel liquid chromatography method using diode-array detector for the determination of oleuropein in dietary supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 198-202.
- [85] : Xie, P. J., Huang, L. X., Zhang, C. H., You, F., & Zhang, Y. L. (2015). Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. *Food and Bioprocess Technology*, 93, 29-38.
- [86] : Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. (2008). *Hy. Chemico-Biological Interactions*, 176(2-3), 88-98.

Liste des Références bibliographiques

[87]: Khemakhem, I., Gargouri, O. D., Dhouib, A., Ayadi, M. A., & Bouaziz, M. (2017). Oleuropein rich extract from olive leaves by combining microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration. *Separation and Purification Technology*, 172, 310-317.

[88]: Romani, A., Mulas, S., & Heimler, D. (2017). Polyphenols and secoiridoids in raw material (*Olea europaea* L. leaves) and commercial food supplements. *European Food Research and Technology*, 243(3), 429-435.