



UNIVERSITE MOHAMMED V- AGDAL
FACULTE DES SCIENCES
RABAT



N°D'ORDRE 3618

THESE DE DOCTORAT
Présentée par
N'nabinty SYLLA

Discipline : Sciences chimiques et BioTechnologiques

Option : Chimie-physique

Spécialité : Phytochimie

**VALORISATION DES DÉCHETS DE L'INDUSTRIE OLÉICOLE :
ENCAPSULATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DE
GRIGNON D'OLIVE ET ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE
L'ENCAPSULATION SUR LEURS EFFETS ANTIOXYDANT ET
ANTIDIABÉTIQUE**

Soutenu le : 02/04/2022
Devant le Jury composé de :

Présidente: Mme DAKKA Nadia, Professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V ;

Rapporteur: Mr TAOURIRTE Moha, Professeur de l'Enseignement Supérieur, Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech, Université Cadi Ayyad ;

Rapporteur: Mr TABYAOUI Hamid, Professeur de l'Enseignement Supérieur, Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V ;

Rapporteur: Mr KARTAH Badr Eddine, Professeur habilité à la Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V ;

Examineur: Mr DANGLES Olivier, Professeur de l'Enseignement Supérieur, Université d'Avignon-INRAE ;

Examineur: Mr EL KACEMI Kacem, Expert, Professeur de l'Enseignement Supérieur, Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V ;

Encadrante: Mme EL HAJJI Hakima, Professeur de l'Enseignement Supérieur, Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V ;

DEDICACE

«Gloire à Dieu le tout miséricordieux, le très miséricordieux»

Merci seigneur de m'avoir donné de merveilleux parents, qui m'ont permis de rêver mais, surtout qui m'ont donnés les moyens de réaliser mes rêves. Ainsi, je suis fier de vous dédier ce modeste travail, fruit de beaucoup de sacrifices. Je saisis l'opportunité pour vous réitérer l'immense amour que j'ai pour vous.

Je dédie également ce modeste travail à mes défunts grands-parents Moussa Sylla, Ibrahima Sory Yansané, Sango Binty Sylla, Salématou Camara, tous aussi généreux les uns que les autres. J'ai profité à chaque instant de ce travail des retombées de votre bonté ainsi que de votre humanisme. Puisse vos âmes reposer en paix.

A mon oncle Sekou Mady Yansané, parti trop tôt, un esprit brillant, qui a été enlevé à notre affection, de là où tu es nul doute que tu sois fier de ta go ndi. Je te dédie également ce travail.

A mon petit frère Ibrahima Sory Sylla (SIS), dyslexique, cela l'a empêché d'aller loin dans les études, je te dédie ce travail, car je sais que dans un autre monde tu aurais été plus brillant que moi, je t'aime mon frère.

REMERCIEMENT

J'étais loin de me douter que je m'embarquais sur un navire qui allait voguer au gré du vent, en me faisant vivre de grandes frayeurs par les moments de tempêtes. Tel a été mon ressenti tout au long de cette thèse, mais je n'ai aucunement le regret de m'être embarquée dans cette aventure, qui a été riche en rencontres, en connaissances, en leçons de vie bref une aventure qui m'a transformée à jamais. Comme tout périple, le mien est arrivé à sa fin, il est temps d'exprimer ma gratitude à toutes ses belles personnes qui m'ont accompagnées tout au long du voyage.

La première partie de cette thèse a été réalisée à la faculté des sciences d'AGROPARC à Avignon, au sein du laboratoire des antioxydants naturels et dont le directeur est **Olivier Dangles**, un monsieur aussi brillant qu'humaniste, il m'a chaleureusement accueilli et fait intégrer au sein d'une équipe formidable, je ne saurais vous dire à quel point je suis reconnaissante et heureuse de vous avoir rencontré. J'ai eu l'honneur de faire la connaissance de Pr **Tomao Valérie**, mon superviseur de stage, que je remercie de m'avoir accordé de son temps précieux pour le bon aboutissement de mon travail.

Merci à **Christian Ginie** du côté de l'équipe micronut de l'IRNRAE, pour ta générosité, ta disponibilité, ton soutien et tes encouragements pour le bon déroulement de mes travaux. Merci à **Dr Hélène Bitard** « Sheiaz » pour tes conseils, ton aide et surtout ton sourire généreux. Merci également à **Dr Julie Anne**, pour toute l'aide que tu as su m'apporter, merci pour le vélo de ton père, j'espère qu'il fait le bonheur de quelqu'un d'autre maintenant.

Merci à **Pr Nathalie Soumille** pour votre gentille attention, les échanges entre deux m'ont fait plaisir. A notre technicien **Rosa Maxence** pour ta disponibilité, ce fut un plaisir de te côtoyer. Egalement à **Julien** notre comptable, pour sa patience et sa proactivité face à mes demandes. Merci à **Barbara**, une généreuse et souriante dame, avec qui j'ai pris du plaisir à échanger à chacune de nos rencontres. Merci à l'ensemble des équipes du côté de la faculté d'AGROPARC et de l'INRAE d'AVIGNON ainsi qu'aux personnels.

La deuxième partie de cette thèse a été réalisée au laboratoire des pathologies humaines, dont la directrice est **Pr Dakka Nadia**, à qui j'exprime toute ma gratitude pour m'avoir accepté dans son laboratoire, mais également pour avoir pris le soin de me confier à **Dr Bouyahia Abdelhakim** professeur à la faculté des sciences, dont j'ai bénéficié de l'expérience et des connaissances sur l'étude de la pathologie du diabète, je le remercie pour sa patience et ses conseils. Egalement, merci à la doctorante **Douae** pour son aide et sa disponibilité, j'ai passé de délicieux moments en ta compagnie.

Tout naturellement, je remercie ma directrice de thèse **Mme El hajji Hakima** Professeur de l'Enseignement Supérieur, Faculté

des Sciences de Rabat, qui n'a ménagée aucun effort pour un meilleur aboutissement de ce travail. Son goût prononcé pour le travail bien fait, sa connaissance scientifique des polyphénols m'ont permis de m'améliorer tout au long de cette thèse. Sa ténacité et sa force mentale ont été des valeurs que j'ai intégrées et sans aucun doute qui ont fait toute la différence dans les moments difficiles de ce projet.

Grand merci aux membres du jury de cette thèse :

Mme Dakka Nadia Professeur de l'enseignement supérieur et Directrice du laboratoire de Biologie et des pathologies humaines à la Faculté des Sciences de Rabat, merci d'avoir accepté de présider ma soutenance, ce fut un un grand honneur pour moi.

Mr Taourirte Moha Professeur de l'Enseignement Supérieur, et doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech, merci d'avoir accordé de votre temps précieux à la révision de ce travail, vos remarques pertinentes ont permis d'améliorer le contenu final de ce manuscrit.

Mr Tabyaoui Mohamed, Professeur de l'Enseignement Supérieur et vice doyen académique à la Faculté des Sciences de Rabat, merci d'avoir accepté d'examiner ce travail, malgré votre emploi du temps très chargé.

Mr Kartah Badr Eddine, Professeur habilité à la Faculté des Sciences de Raba, merci d'avoir consacré votre temps à l'examen de ce manuscrit.

Mr Dangles Olivier Professeur de l'Enseignement Supérieur, et Directeur adjoint d'UMR408 de l'Université d' Avignon-INRAE, merci d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mr El Kacemi kacem, expert, Professeur de l'Enseignement Supérieur, à la Faculté des Sciences de Rabat, merci pour votre soutien, votre disponibilité et votre amabilité pour un meilleur aboutissement de cette thèse.

Ce travail est le résultat de la contribution de plusieurs collaborateurs à qui je tiens à adresser mes sincères remerciements.

Grand merci à **Pr Charouf** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour la réalisation de mon premier article, j'ai bénéficié de l'expérience de ses doctorants **Dr Hajib** et **Dr Nounah**, avec lesquels j'ai passé d'agréables moments, auxquels je dis merci et ainsi qu'au reste des doctorants que j'ai rencontrés lors de mon passage dans votre laboratoire.

Je tiens à exprimer ma gratitude à l'ensemble des enseignants, et personnels de la faculté des sciences de Rabat, plus particulièrement au **Pr Sadki khalid**, mon encadrant en licence sa rigueur et ses compétences en matière de recherche ont fait de moi une passionnée de la recherche et une étudiante très impliquée dans tous mes travaux. Et au **Pr Hassikou Rachida** mon encadrante en master, en plus d'avoir bénéficié de ses compétences dans son domaine, j'ai aussi bénéficié de son instinct maternel, de son

altruisme, de sa force de conviction. Son parcours exemplaire fait d'elle à mes yeux une référence à suivre autant professionnellement qu'humainement.

Merci à **Dr Arazeem** et **Dr Sultan** pour vos aides et vos précieux conseils. Sans oublier les doctorants et doctorantes (**Hajar, Mouna, Loubna...**) ainsi que les professeurs du laboratoire d'électrochimie et de chimie analytique de la faculté des sciences de Rabat.

Cette aventure m'a permis de redécouvrir le lien profond que j'ai avec ma famille et mes amis, à qui je tiens à réitérer mes remerciements.

A mon **père** qui aurait sacrifié jusqu'au dernier centime pourvue que je poursuive ma thèse et que je la clôture avec brio.

A ma **mère**, pour toutes ses prières nocturnes et tous les sacrifices pour une réussite à la hauteur de mon travail.

A mon oncle **Aboubacar Sidiki Yansané**, merci pour ton aide, tes encouragements. Les voyages en famille m'ont à chaque fois rebooster. Merci à **tanti Sayon**, pour tes mots de soutien, pour tes douas ainsi pour que tes meilleurs souhaits. Sans oublier vos trois enfants **Mami Sali, Koro Ami et tonton Kerfala**, puisse Dieu vous bénir.

A mes tantes, **Fatoumata yari yansané et Mamaissata yansané, Salématou Yansané** merci pour tout l'amour porté à l'enfant timide que je fui, me remémorer des doux souvenirs de mes vacances à vos côtés, cela m'apaisait lors des moments difficiles de mon projet.

A mon oncle **Alsény Yansané**, merci également pour ton amour inconditionnel et tes conseils bienveillants lors de tes moments de lucidité.

A mon grand frère **Issiaga Sylla**, merci d'être mon ami, mon soutien. Nos longues conversations m'ont fait beaucoup de bien. Et merci de rêver toujours en grand pour moi.

A ma grande sœur **Fatoumata Sylla**, je n'ai guère oublié le sacrifice de la sauce Gombo parmi tant d'autres, une nuit passée loin de ta famille pour moi, j'espère que par ce modeste travail je saurai exprimer toute ma gratitude. Merci à ton mari, pour l'accueil chaleureux que vous m'aviez réservé lors de mon séjour, également merci à vos amis **Fofana, tonton Bangali et tanti Véronique** du côté de Marseille. Sans oublier mes neveux **Papa Franck Seydouba et tonton Ghilain Ibrahima**.

A **Aminata Sylla**, ma petite sœur, si jeune mais déjà si grande par son attitude responsable, autant tu es fière de moi autant je le suis de toi ma jumelle du 31 Août, merci Mami ndi.

Merci au reste de la famille, **Sokho Mbadi, Nfaoussou, Ndouké Ndouké, Fatim Doumbouya, Mmah Sylla, Tata Maimouna, Ntan Mmah...** sans oublié mes belles sœurs **Kadiatou et Fanta**, merci pour toute l'aide apportée à papa et maman.

Merci aux amis les plus fidèles du monde **Mr Camara Alhassane** et **Pr Mansaré Sara**, j'ai la chance de vous avoir à mes côtés, car vous n'avez jamais cessé de me témoigner votre soutien dans toutes mes entreprises. Sans oublier le reste de la team Fadesa, merci à vous pour les merveilleux moments, **nfori Ilias, Koto Bailo, Astu, Maf, tanti Mbalia, Houleymatou, ainsi que mes adorables BB Marilyne, Alhassane, Boubba, Sory Binta, Nga Fatou et Profesorino Kémoko**. Puisse l'âme de notre dernier reposer en paix.

Lors de mon stage en France, j'ai eu le plaisir de faire la connaissance de personnes formidables avec qui je me suis liée d'amitié et qui m'ont apporté tout le soutien dont j'avais besoin pour mener à bien mes travaux.

Merci à ma bande d'ami du côté d'Avignon, **Samaké Diassé, Dr Bouari Ahmed, Dr Fatma Madbi (mama Africa), Sallah, Dr Fella**, merci les amis d'avoir été présent pour moi, j'ai passé des moments délicieux et inoubliables à vos côtés et le parcours centre-ville Avignon-Agro parc est dans le top 3.

Merci à **Hélène** la spécialiste des abeilles, stagiaire à l'INRAE, pour ta gentillesse, pour avoir joué le chauffeur pour nous tout le temps, tu es une formidable personne.

Merci à mon **Bro Djibril Oularé** je ne saurais exprimer en quelques mots toute ma gratitude face à ta générosité spontanée.

Merci à la plus SWAG des **mami ANNA LINA** du côté de Toulouse, il n'existe pas de mot aussi fort pour te dire à quel point je suis reconnaissante pour tout, merci pour ton accueil chaleureux, les promenades dans Toulouse, le festival de gers, le trajet Avignon-Toulouse, les Alpes, la rencontre avec **Eric, Carol et Serge** de formidables personnes,... merci **Anna**.

Merci à **Mr Camara et Mme Camara** pour votre hospitalité lors de mon passage à Marrakech dans le cadre du congrès sur les plantes aromatiques et médicinales, ce fut un réel plaisir de vous avoir connu.

Des belles personnes j'en ai rencontré, je pense à **Mr Keita Gaoussou, Mr Jermouni, Mr Bah** de l'ambassade de Guinée, **Aminata bangoura**, merci d'avoir contribué à mon épanouissement pour une meilleure finalité dans mon travail.

Merci à ma belle mère, **maman José** pour vos prières et l'amour profond que vous avez pour moi, mes belles sœurs **mama FAFA, mama Josy et mama Merveille**, merci pour le respect et la considération ainsi que pour vos prières, sans oublié mes **BB Naiacita, Terrycito, Kady et Hervé**. Puisse l'âme de **Pèpère** reposer en paix, deux heures d'échange avec lui ont largement suffi pour que je comprenne littéralement la métaphore de Amadou Hampaté Ba « En Afrique quand un vieux meurt c'est une bibliothèque qui brûle » cette métaphore le disait, repose en paix beau père, et à jamais dans nos cœurs et nos prières.

Et comme on le dit, le meilleur pour la fin. A toi mon futur mari **Benjamin Tavares**, peu de personnes le savent, mais tu étais là depuis le début de cette aventure, tu es l'ami qui m'incita à m'inscrire en thèse, l'amoureux qui fit tout son possible pour que cela se déroule en de bonnes circonstances, tu m'as soutenu, présenté à des personnes pour m'aider dans mes travaux de recherche. Merci pour tes sacrifices, pour ta compréhension, pour ta patience... Puisse Dieu fortifier notre amour. TE AMO QUERIDO !

Résumé

Les composés phénoliques issus des déchets de l'industrie oléicole sont néfastes pour l'environnement mais très bénéfiques pour l'organisme grâce à leur pouvoir antioxydant très élevé, c'est dans ce contexte que notre étude s'inscrit, en l'occurrence la valorisation des composés phénoliques issus des déchets de l'industrie le grignon d'olive, par la technique d'encapsulation par lyophilisation en utilisant l'amidon de pomme de terre comme matériau d'encapsulation, dans le but de stabiliser ses molécules qui sont thermo et photosensibles, et également réalisée une cinétique du relargage du phénol encapsulé (tyrosol). Notre étude se poursuit par la mise en évidence de l'influence de l'encapsulation sur les activités antioxydante et antidiabétique des composés phénoliques encapsulés en comparaison avec les composés phénoliques libres et le tyrosol encapsulé seul. Nous avons obtenu de très bons pourcentages d'encapsulation dans le cas des biophénols de grignon d'olive encapsulés et du tyrosol encapsulé sous microonde. Les meilleures activités antioxydante et antidiabétique ont été obtenues avec les échantillons de composés phénoliques encapsulés ensuite les composés phénoliques libres. L'analyse de l'ensemble des échantillons par microscopie électronique à balayage MEB-EDS a permis d'observer le changement morphologique de l'amidon sous chauffage microonde et chauffage conventionnel, mais également nous avons pu évaluer la composition chimique des échantillons ce qui a permis de confirmer la présence des composés phénoliques dans l'amidon.

Mots- clés : Grignon d'Olive, Composés Phénoliques, Tyrosol, Encapsulation, Effet Antioxydant, Effet Antidiabétique.

Abstract

Phenolic compounds from olive industry waste are harmful for the environment but very beneficial for the organism thanks to their very high antioxidant power, and it is in this context that our study falls, in this case the valorisation of phenolic compounds from olive pomace industry waste, by the technique of encapsulation by freeze-drying using potato starch as encapsulation material, with the aim of stabilising its molecules which are thermo and photosensitive, and also carried out a kinetic of the release of the encapsulated phenol (tyrosol). Our study continues by highlighting the influence of encapsulation on the antioxidant and anti-diabetic activities of the encapsulated phenolic compounds in comparison with free phenolic compounds and the encapsulated tyrosol alone. We obtained very good encapsulation percentages in the case of encapsulated olive pomace biophenols and microwave encapsulated tyrosol. The best antioxidant and antidiabetic activities were obtained with the encapsulated phenolic samples followed by the free phenolics. The analysis of all the samples by SEM-EDS scanning electron microscopy allowed us to observe the morphological change of the starch under microwave and conventional heating, but also we could evaluate the chemical composition of the samples which allowed us to confirm the presence of phenolic compounds in the starch.

Key Words : Olive Pomace, Phenolic Compounds, Encapsulation, Antioxidant, Antidiabetic.

Sommaire

Introduction générale	1
<i>Première Partie : Encapsulation Des Biophénols De Grignon D'olive Par La Matrice D'amidon De Pomme De Terre</i>	4
Introduction	5
<i>Synthèse Bibliographique</i>	9
1. Grignon d'olive	10
1.1. Définition	10
1.2. Types de grignon d'olive	10
2. Les composés phénoliques	14
3. Procédé d'encapsulation	17
3.1. Définition	17
3.2. Méthodes d'encapsulation	20
3.2.1. Séchage par pulvérisation ou atomisation (<i>spray-drying</i>)	21
3.2.1.1. Avantages et Inconvénients	22
3.3.2. Séchage par congélation ou lyophilisation (<i>freeze-drying</i>)	24
3.3.2.1. Avantages et Inconvénients	25
3.3.2.2. Stabilité du produit lyophilisé	25
4. Les matériaux de revêtement ou d'enrobage ou d'encapsulation	27
4.1. Généralité Amidon	27
4.1.1. Définition	27
4.1.2. Classification des amidons natifs	29
4.1.3. Structure physique de l'amidon	30
4.1.4. Structure chimique de l'amidon natif	31
4.1.4.1. Amylose	32
4.1.4.1.1. Amyloses V et complexes d'inclusion	32
4.1.4.1.2. Cristaux lamellaires de type allomorphiques V	32
4.1.4.1.3. Complexes V6	33
4.1.4.2. Amylopectine	34
5. Traitement thermique de l'amidon	34
5.1. Comportement des granules d'amidon hydratées aux faibles températures	34
5.2. La gélatinisation	35
5.2.1. Mécanisme de la gélatinisation	35
5.3. Rétrogradation et gélification	37

5.3.1. Les mécanismes de rétrogradation et de gélification	38
6. Les amidons modifiés et leurs propriétés	38
7. Choix de la technique et du matériau d'encapsulation	39
<i>Matériels Et Méthodes</i>	40
1. Matériels	41
2. Méthodes.....	41
2.1. Gélatinisation de l'amidon de pomme de terre par chauffage conventionnel (chauffage par conduction) et chauffage sous micro-ondes	41
2.1.1. Chauffage par conduction.....	41
a) Principe	41
b) Protocole.....	41
2.1.2. Chauffage sous micro-ondes	43
a) Principe	43
b) Protocole.....	43
3. Encapsulation du tyrosol dans l'amidon de pomme de terre	44
3.1. Structure chimique du tyrosol	44
3.2. Chauffage par conduction.....	45
a) Protocole	45
3.3. Lyophilisation	45
3.4. Chauffage sous micro-ondes	45
a) Protocole	45
3.5. Rendement brut.....	46
3.6. Caractérisation des poudres (chauffage conventionnel et chauffage sous micro-ondes)...	46
3.6.1. Rinçage à l'éthanol	46
3.6.2. Hydrolyse acide de l'amidon.....	47
3.7. Détermination de l'efficacité d'encapsulation	47
3.8. Analyse au Microscope Electronique à Balayage (MEB) équipé de sondes EDS (Energy Dispersive Spectroscopy)	47
a) Principe	47
b) Protocole	48
3.9. Relargage du tyrosol par digestion enzymatique.....	50
3.9.1. Encapsulation et relargage contrôlé	50
3.9.2. Procédure expérimentale.....	50
3.9.3. Expérience de contrôle.....	50
3.9.4. Hydrolyse enzymatique	50

4. Encapsulation des biophénols du grignon d'olive.....	51
4.1. Description du Grignon d'olive	51
4.2. Caractérisation du grignon d'olive	51
4.3. Pre-traitement par pétrissage (kneading).....	52
Protocole	52
<i>Results Et Discussion</i>	54
1. Gélatinisation de l'amidon de pomme de terre par chauffage conventionnel et par chauffage sous micro-ondes	55
1.1. Chauffage par conduction.....	55
1.2. Chauffage sous micro-ondes	55
2. Encapsulation du tyrosol.....	55
2.1. Rendement et efficacité d'encapsulation	55
2.1.1. Rendement brut.....	55
2.1.2. Efficacité d'encapsulation	56
2.2. Analyse au MEB équipé de sonde EDS des lyophilisats du complexe amidon/tyrosol.....	57
2.2.1. Analyse MEB	57
2.2.3. Analyse EDS ou EDX.....	58
2.4. Relargage du tyrosol par digestion enzymatique (<i>in vitro</i>).....	59
3. Encapsulation des biophénols du grignon d'olive.....	61
3.1. Caractérisation du grignon de départ par UPLC-DAD-MS	61
3.2. Quantification et identification des composés phénoliques des fractions éthanolique et aqueuse.....	64
3.3. Détermination du rendement brut et de l'efficacité d'encapsulation	64
3.4. Analyse au MEB équipé de sonde EDS des lyophilisats	66
3.4.1. MEB	66
3.4.2. MEB-EDS.....	66
Conclusion	68
Références.....	69
<i>Deuxieme Partie : Activité Antioxydante Et Antidiabetique Des Composés Phénoliques Libres Et Encapsulés De Grignon D'olive</i>	80
Introduction	81
<i>Synthèse Bibliographique</i>	83
1. Généralité sur le diabète	84
1.1. Homéostasie glycémique	84
1.2. Les hormones régulatrices de la glycémie.....	85

1.2.1. Insuline	85
1.2.2. Mode d'action de l'insuline.....	86
1.2.3. Glucagon.....	87
1.2.4. Mode d'action du glucagon.....	87
1.3. Pathologie diabétique	88
1.3.1. Définition.....	88
1.3.2. Classification.....	88
1.3.2.1. Diabète de type 1	88
1.3.2.2. Diabète de type 2	89
1.3.2.3. Diabète gestationnel	90
1.3.2.4. Autres types de diabètes sucrés.....	91
1.4. Epidémiologie	91
1.5. Traitement médicamenteux	92
1.5.1. Antidiabétiques oraux	92
1.5.2. L'insuline injectable (insulinothérapie).....	93
1.6. Traitement du diabète par les plantes médicinales.....	93
1.7. Le stress oxydant et le diabète	94
1.7.1. Définition.....	94
1.7.2. Les entités oxydantes et leur production	94
1.7.2.1. La production des entités oxydantes au niveau cellulaire	95
1.8. Les cibles biologiques du stress oxydant.....	96
1.9. Implications du stress oxydant dans le diabète et pathologie associée.....	96
1.9.1. Le diabète.....	97
1.9.2. Glutotoxicité liée à l'hyperglycémie.....	97
1.9.2.1. Auto-oxydation du glucose.....	97
1.9.2.2. Voie des polyols.....	98
1.9.2.3. Voie de la PKC	99
1.9.3. Glycation des protéines et formation des AGEs.....	100
1.9.3.1. Formation des AGEs	100
1.9.4. Conséquences de la glycation	101
1.10. Défenses antioxydantes des cellules β	101
1.11. Effet du stress oxydant sur l'insulino-sécrétion et l'insulino-résistance.....	101
1.12. Préventions par les antioxydants	103
1.13. Les systèmes de défenses antioxydants	104

1.14. Les enzymes antioxydantes	104
1.14.1. Superoxydes dismutases (SOD).....	104
1.14.2. Catalase (CAT)	105
1.14.3. Glutathions peroxydases (GPx) et glutathions réductases (GR)	105
1.15. Les systèmes antioxydants non enzymatiques et leurs effets	106
1.16. Importance des antioxydants alimentaires.....	107
1.17. Risque des antioxydants.....	107
1.18. Les antioxydants dans le diabète	108
1.19. Les composés d'origine naturelle non vitaminique.....	108
1.20. Les polyphénols	109
1.20.1. Implication de quelques biophénols du grignon d'olive dans le diabète.....	109
1.20.1.1. Hydroxytyrosol	110
1.20.1.2. Tyrosol	111
1.21. Digestion enzymatique et absorption intestinale des glucides.....	112
1.21.1. Alpha amylase.....	112
1.21.1.1.Définition	112
1.21.1.2.Structure	113
1.21.1.3.origines.....	113
1.21.1.4.Mécanisme d'action	113
1.21.1.5.Régulation de la synthèse de l' α -amylase	114
1.22. Acarbose	115
<i>Matériels Et Méthodes</i>	116
1. Matériels	117
1.1. Préparation des échantillons.....	117
2. Méthodes	118
2.1. Dosage des composés phénoliques.....	118
2.2. Dosage des polyphénols totaux.....	118
2.3. Méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu	118
a) Principe	118
b) Protocole	118
c) Expression des résultats	118
2.4. Dosage flavonoïdes	118
a) Principe	119
b) Protocole	119

c) Expression des résultats	119
2.5. Evaluation de l'activité antioxydante.....	119
2.6. Méthode DPPH	119
a) Principe	120
b) Protocole	120
2.7. Méthode ABTS	121
a) Principe	121
b) Protocole.....	122
3.2.4. Evaluation de l'effet inhibiteur des échantillons sur l'enzyme α amylase.....	122
2.8. Méthode iode-amidon.....	122
a) Principe	122
2.9. La réaction enzymatique : réactifs et mode opératoire	123
b) Protocole.....	123
c) Expression des résultats	124
<i>Résultats</i>	125
1. Résultats	126
1.1. Caractérisation des échantillons.....	126
1.2. Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes	127
1.3. Etude de l'activité antioxydante	129
1.3.1. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	129
1.4. Piégeage du radical ABTS ⁺	130
1.5. Activité antidiabétique	131
1.5.1. Effet inhibiteur des composés phénoliques de grignon d'olive sur l' α -amylase malt <i>in vitro</i>	131
<i>Discussion</i>	132
Discussion.....	133
<i>Conclusion</i>	140
Conclusion.....	141
Référence	142
<i>Conclusion Générale Et Perspectives</i>	163
Résumé.	171
Abstract.	172

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PARUES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL

1. Malapert, A.; Reboul, E.; Dangles, O.; Thiéry, A.; Sylla, N.; Tomao, V. One-Step Extraction of Olive Phenols from Aqueous Solution Using-Cyclodextrin in the Solid State, a Simple Eco-Friendly Method Providing Photochemical Stability to the Extracts. *Molecules* 2021, 26, 4463. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/15/4463>.
2. N'nabinty Sylla ; Abdelhakim Bouyahya ; DouaeTaha ; Nadia Dakka ; Hakima Elhajji, Study of the antioxidant and antidiabetic activity in vitro of free and encapsulated phenolic compounds of olive pomace. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* September 2021, Volume 36,102126. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102126>.
3. N'nabinty Sylla,Hakima EL Hajji, Kacem EL Kacemi, Extraction of the polyphenols from olive mill wastewater (margine) enriched with bioactive compounds from olive leaves by different techniques and influence on antioxidant activity, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (soumis).
4. N'nabinty Sylla, Hakima EL Hajji, Kacem EL Kacemi, Valorisation de la margine par extraction des polyphénols. 6^{ème} Symposium International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales, SIPAM6. FST Marrakech 16-18 Mars 2017.
5. N'nabinty Sylla, Hakima EL Hajji, Kacem EL Kacemi, Extraction of the polyphenols from the mixture (vegetable water, olive leaves and distilled water) heated under microwave and the cap. IXth Trans-Mediterranean Symposium on Heterocyclic Chemistry, IXth TRAMECH. FST Fès 22-15 Novembre 2017.

LISTE DES TABLEAUX

PREMIERE PARTIE : ENCAPULATION DES BIOPHENOLS DE GRIGNON D'OLIVE PAR LA MATRICE D'AMIDON DE POMME DE TERRE

Tableau 1: Composition chimique des différents types de grignon	100
Tableau 2 : Quelques composés phénoliques identifiés par Malapert et al.....	122
Tableau 3 : Exemples des propriétés de quelques composés phénoliques	155
Tableau 4 : Quelques domaines d'application des composés encapsulés	177
Tableau 5 : Classification des procédés d'encapsulation	20
Tableau 6 : Quelques exemples d'encapsulation par la technique de séchage par pulvérisation.....	233
Tableau 7 : Quelques exemples de composés phénoliques encapsulés par lyophilisation.....	26
Tableau 8 : Teneurs matière sèche (% MS) en amylose et en amylopectine	311
Tableau 9 : Température de gélatinisation de l'amidon selon l'origine botanique	366
Tableau 10 : Conditions d'analyse MEB.....	49
Tableau 11 : Conditions d'analyse UPLC-DAD	522
Tableau 12 : Rendement brut de récupération du complexe tyrosol - amidon.....	555
Tableau 13 : Efficacité d'encapsulation (rapport massique tyrosol/amidon = 1:10).....	566
Tableau 14 : Quantification et identification des composés phénoliques du grignon d'olive de départ (temps de rétention, longueur d'onde d'absorbance maximale, m/z du pic moléculaire, équation des courbes d'étalonnage des différents standards)	63
Tableau 15 : Rendement brut de récupération des complexes phénols de grignon – amidon (1 :10) .	644
Tableau 16 : Encapsulation des composés phénoliques	655

DEUXIEME PARTIE: ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIDIABETIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES LIBRES ET ENCAPSULES DE GRIGNON D'OLIVE

Tableau 1 : Les principales glucosidases intestinales connues.....	115
Tableau 2: les différents produits étudiés constitués de composés phénoliques libres et encapsulés	1170
Tableau 3: Récapitulatif des analyses des échantillons analysés	12629
Tableau 4: Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans les extraits des échantillons étudiés.....	12831
Tableau 5: IC50 du radical DPPH• par les échantillons étudiés	12932
Tableau 6: IC50 du radical ABTS+ par les échantillons étudiés.....	13033
Tableau 7: IC50 de l'activité d'α amylase de malt du contrôle positif et des différents échantillons étudiés.....	13134

LISTE DES FIGURES

PREMIERE PARTIE : ENCAPULATION DES BIOPHENOLS DE GRIGNON D'OLIVE PAR LA MATRICE D'AMIDON DE POMME DE TERRE

Figure 1 : Structures d'une sélection de métabolites secondaires spécifiques à l'olive.	16
Figure 2 : les deux principales morphologies de capsules observées, mononuclée (A) et agrégat (B) .	18
Figure 3 : Différentes morphologies de microcapsule de composés phénoliques en fonction de la technique d'encapsulation	19
Figure 4 : Schéma de principe du procédé de séchage par atomisation de suspensions colloïdales	22
Figure 5 : Les différentes phases de l'état de l'eau lors du procédé de lyophilisation	25
Figure 6: Représentation schématique de la structure de l'amylose en hélice (A) et la structure de l'amylopectine en arbre (B). Chaque rond bleu représente un résidu glucose Structure chimique de l'amylose (C) et de l'amylopectine (D).....	28
Figure 7 Diagrammes de diffraction des rayons X des types cristallins A, B, C et V d'après Zobel.....	29
Figure 8: Schéma de la structure du grain d'amidon à différents niveaux d'organisation ; grain entier, alternance de zones cristallines et amorphes, structure des unités cristallines (blocklet)	30
Figure 9 Représentation schématique de la simple hélice d'amylose.	32
Figure 10 Représentation schématique des lamelles cristallines des complexes amylose-ligand de type V _{6I} , V _{6II} et V _{6III} avec les diagrammes de diffraction des rayons X	33
Figure 11 : Comportement des granules d'amidons à teneurs croissantes en amylose sous différents traitements	35
Figure 12 : Images MEB des empois d'amidons de : blé (A), pomme de terre (B).....	36
Figure 13 : Différents états du grain d'amidon placé en présence d'un excès d'eau et soumis au chauffage-refroidissement	37
Figure 14 : Courbe de transformation hydrothermique d'un grain d'amidon lors de la cuisson et du refroidissement.....	37
Figure 15 : Système de chauffage par conduction thermique de l'amidon de pomme de terre.....	42
Figure 16 : Cinétique de gélatinisation - rétrogradation de l'amidon de pomme de terre lors d'un chauffage par conduction.	42
Figure 17 : Cinétique de gélatinisation de l'amidon de pomme de terre lors d'un chauffage sous micro-ondes.....	44
Figure 18 : Structure chimique du tyrosol (2-(4-hydroxyphenyl)éthanol)	44
Figure 19 : Complexe amidon/tyrosol obtenu après 24h de lyophilisation	46
Figure 20 : Unité centrale du MEB	49
Figure 21 : (A) Pompe à rotation ; (B) Partie informatique	49
Figure 22 : Poudre de grignon utilisé dans l'encapsulation des biophénols par l'amidon de pomme de terre.....	51
Figure 23: Images MEB d'amidon chauffé à 65, 70 et 75 °C (A, B, C, resp.), de tyrosol (D) et du complexe amidon-tyrosol avec amidon gélatinisé par chauffage conventionnel (E) ou sous micro-ondes (F).....	58
Figure 24 : Spectre MEB-EDS du complexe amidon/tyrosol (chauffage conventionnel).	59
Figure 25 Spectre MEB-EDS du complexe amidon/tyrosol (chauffage micro-ondes).	59
Figure 26 : Cinétique de digestion enzymatique du complexe amidon / tyrosol à 24°C (A) et à 37°C (B).....	61
Figure 27 : Profil chromatographique du grignon d'olive de départ	62
Figure 28 : Structure chimique des composés phénoliques identifiés dans le grignon d'olive.	63
Figure 29 : Profil chromatographique à 280 nm du grignon de départ (rouge), de la fraction aqueuse (vert) et de la fraction éthanolique (bleu).	65
Figure 30 : Image MEB complexe amidon/polyphénols de grignon d'olive (A) et du grignon d'olive de départ (B).....	66
Figure 31 : Spectre MEB-EDS du grignon de départ.....	67
Figure 32 : Spectre MEB-EDS du complexe amidon/grignon (chauffage micro-ondes).....	67

DEUXIEME PARTIE: ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIDIABETIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES LIBRES ET ENCAPSULES DE GRIGNON D'OLIVE

Figure 1 : Le pancréas et la distribution des différents types cellulaires dans un ilot de	85
Figure 2 : Formation de l'insuline à partir de la proinsuline	86
Figure 3 : Structure du glucagon	87
Figure 4: Localisation des différentes complications micro et macroangiopathiques associées au diabète de type 2.....	90
Figure 5 : Répartition mondiale du diabète selon la Fédération Internationale du Diabète	92
Figure 6 : chaîne respiratoire de la mitochondrie	94
Figure 7 : schéma récapitulatif des sources des ROS, des enzymes impliquées dans la défense antioxydantes et des cibles biologiques.....	96
Figure 8 : Réaction de Fenton	96
Figure 9 : Représentation selon la projection de Fischer du glucose et de sa forme ène-diol.....	97
Figure 10 : Voie des polyols et autres voies du catabolisme du glucose.....	98
Figure 11 : Conséquence de l'activation de la PKC induite par l'hyperglycémie.....	99
Figure 12 : Formation des AGEs par la voie de Maillards.....	100
Figure 13 : Effet du stress oxydant sur l'insulino-sécrétion.....	102
Figure 14 : Mécanisme de résistance à l'insuline induite par les ROS	103
Figure 15 : Déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les systèmes de défenses antioxydantes lors du stress oxydant	104
Figure 16 : Réaction de dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène	105
Figure 17 : Réactions d'oxydation de peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation du dioxygène	105
Figure 18 : Réaction du mécanisme d'action de la glutathion peroxydase	106
Figure 19 : Réaction de réduction GSSG en GSH	106
Figure 20 : Représentation des structures secondaire et tertiaire de l' α -amylase de l'orge	114
Figure21 : structure de l'acarbose	115
Figure 22 : Le radical DPPH et sa forme réduite	120
Figure 23 : Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS ⁺ °.....	121
Figure 24 : Mécanisme antiradicalaire de l'hydroxytyrosol	122
Figure 25 : Structure chimique de l'acide Dihydrocaféique.....	127
Figure26 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	127
Figure 27 : Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	128
Figure 28 : Pourcentage inhibition du radical DPPH par le standard Trolox et les échantillons étudiés (GG départ, PP/A μ -ondes, Tyr/A conv et Tyr/A μ -ondes)	129
Figure 29 : Pourcentage d'inhibition du radical ABTS par le standard Trolox et les échantillons étudiés (GG départ, PP/A μ -ondes, Tyr/A conv et Tyr/A μ -ondes)	130
Figure 30 : Pourcentage d'inhibition de l'enzyme alpha amylase par l'acarbose et les échantillons étudiés (GG départ, PP/A μ -ondes, Tyr/A conv et Tyr/A μ -ondes).....	131

LISTE ABREVIATION

μ-ondes : Micro-ondes

ADA : Association américaine du diabète

Conv : Conventionnel

DID : Diabète insulino-dépendant

DNID : Diabète non-insulino-dépendant

DRX : Diffractométrie de rayons X

DSC : Differential Scanning Calorimetry

EDX : Spectroscopie par dispersion en énergie des rayons X

EE : Efficacité d'encapsulation

FID : Fédération Internationale du Diabète

HbA1c : Hémoglobine glyquée

HGPO : Hyper Glycémie Per Os

HMT : Heat Moisture Treatment

INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

MEB : Microscopie électronique à balayage

MNT : Maladies non transmissibles

OMS : Organisation mondiale de la santé

PP : Polyphénols

ROS : Reactive oxygen species

Tg : Température de transition vitreuse

Tyr : Tyrosol

Introduction générale

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile d'olive génère deux résidus, l'un liquide (margines) et l'autre solide (grignon) provenant de systèmes traditionnels et triphasés, ou un déchet semi-solide provenant de systèmes à deux phases. Les systèmes d'extraction triphasés, sont encore largement utilisés dans les moulins à huile d'olive, ce qui implique l'ajout de grandes quantités d'eau (jusqu'à 50 L / 100 kg de pâte d'olive) entraînant une production mondiale annuelle de plus de 30 millions de m³ de margines. Tandis que, les systèmes biphasés impliquent une réduction des volumes de margines, mais avec une concentration accrue en matières organiques [2].

En effet, lorsque les grignons sont rejetés dans la nature, elles sont sources de pollution soit parce qu'ils sont contaminés par les champignons, soit parce qu'ils rejettent des substances toxiques dans l'environnement, néanmoins, de par leur faible composition en composés phénoliques, ils sont considérés comme moins dangereux par rapport aux margines, lesquelles posent des problèmes environnementaux dans la plupart des pays oléicoles. Leur effet nocif dérive en grande partie de leur contenu en composés phénoliques. Ces composés sont difficilement biodégradables, ils empêchent les cycles biologiques du sol, et souillent les eaux naturelles lorsque les déchets solides sont rejetés sans un traitement préalable dans l'environnement.

Cependant, Le régime méditerranéen caractérisé par une consommation élevée et variée de produits végétaux (légumes, fruits, huile d'olive, thé...etc), est associé à un allongement de l'espérance de vie. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que, la protection qu'une alimentation riche en produits végétaux semble apporter contre le développement de diverses pathologies dégénératives, associées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers, serait due aux microconstituants de cette diète dont les polyphénols sont les principaux représentants [1, 2].

Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactériennes, anti-cancérigène, antidiabétique, anti-inflammatoire, antioxydante etc...) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques. Les polyphénols présentant ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies citées précédemment, en cosmétologie

et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la flaveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires [3].

L'intérêt grandissant au cours de ses dernières années pour ses molécules, implique de nombreuses études dans l'optimisation de leur extraction. Ce mémoire de thèse composé de deux parties, a pour but de présenter le travail effectué dans la valorisation des déchets de l'industrie oléicole par la technique d'encapsulation et l'étude de leur effet inhibiteur de l'enzyme alpha amylase impliqué dans la régulation du diabète.

La première partie de ce mémoire de thèse, porte sur l'encapsulation des composés phénoliques du grignon d'olive par l'amidon de pomme de terre gélatinisé sous chauffage conventionnel et sous chauffage μ -ondes. L'objectif de cette partie est tout d'abord, l'encapsulation d'un composé phénolique modèle en occurrence le tyrosol par l'amidon de pomme de terre gélatinisé sous les deux types de chauffage précédemment mentionnés, ensuite la réalisation d'une cinétique de relargage *in vitro* du composé modèle encapsulé et enfin l'analyse au MEB-EDS des différents encapsulés obtenus. Par la suite, le système d'encapsulation mis au point pour le composé modèle est appliqué aux composés phénoliques du grignon d'olive. L'intérêt de cette technique est de protéger les composés phénoliques qui sont très sensibles aux conditions défavorables (température, lumière, humidité ...).

Par ailleurs, un article a été rédigé dont la soumission dans un journal à fort facteur impact a été reportée, car des analyses complémentaires nécessitant plus de temps et d'implication de tous les collaborateurs étant requises.

La deuxième partie de ce travail, est consacrée à l'étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques encapsulés en comparaison avec les composés phénoliques de grignon non encapsulés. L'objectif de cette partie est l'évaluation de l'effet inhibiteur de l'enzyme alpha amylase des échantillons obtenus dans la première partie de la thèse, mais également l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH et ABTS de chaque échantillon.

Cette partie a fait l'objet d'un article, qui a été publié dans un journal indexé scopus et à sitescore 3.9.

A notre connaissance et d'après les études bibliographiques, c'est la première fois qu'une étude scientifique sur l'encapsulation des déchets phénoliques de grignon d'olive associant l'influence de cette encapsulation sur leurs propriétés antioxydante et antidiabétique est réalisée, d'où l'originalité de ce travail.

Références

- [1] Huang C.L., Sumpio B.E. (2008). Mediterranean diet and cardiovascular health. *American College of Surgeons*. 207 (03): 408–416.
- [2] Lalas S., Athanasiadis V., Gortzi O., Bounitsi M., Giovanoudis I., Tsaknis J., Bogiatzis F. (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*. 127: 1521–1525.
- [3] Japon-Lujan R., Janeiro P., Luque de Castro M.D. (2008). Solid-liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasoundassisted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 7231–7235.

*Première Partie : Encapsulation Des
Biophénols De Grignon D'olive Par La
Matrice D'amidon De Pomme De Terre*

Introduction

Environ 98% de la production mondiale d'olives provient du bassin méditerranéen, dont 73% du sud de l'Europe avec l'Espagne, l'Italie et la Grèce comme principaux producteurs. On retrouve également d'autres pays producteurs tels que le Maroc (3,3%), la Tunisie (4,9%), etc. [1 ; 2 ; 3]. L'industrie oléicole génère deux principaux déchets dont l'un liquide appelé margine et l'autre semi-solide appelé grignon d'olive.

Le grignon d'olive est un déchet issu des moulins à huile sous un système à deux phases. Il est composé d'eau de végétation d'olive et de fragments de peau, de pulpe et de graines solides [3 ; 4]. En raison de sa forte teneur en eau et de sa teneur en phénols, ce résidu semi-solide est considéré comme l'un des polluants les plus abondants en Méditerranée [3 ; 5].

Bien que les utilisations des grignons d'olives bruts soient multiples, étant donnée leur composition chimique encore riche en huile alimentaire, en cellulose et en matières azotées, ces déchets posent encore de sérieux problèmes pour l'environnement. Leurs effets nocifs dérivent en grande partie de leur contenu en polyphénols difficilement biodégradables [6].

De nombreuses études ont confirmé le potentiel du grignon d'olive en tant que source concentrée et rentable de composés phénoliques de l'olive. Les alcools phénoliques et les acides cinnamiques comprenant l'hydroxytyrosol (HT), le tyrosol (Tyr), l'acide caféique (CA) et l'acide p-coumarique (p-Cm) et leurs glycosides, tels que l'hydroxytyrosol-O-glucosides (HT-Glc) sont souvent les principales classes phénoliques présentes dans le grignon d'olive [3 ; 7 ; 8]. En outre, ces biophénols ont été associés à des effets thérapeutiques, tels que des activités anti-inflammatoires, antidiabétiques, cardioprotectrices et anti-apoptotiques, en raison de leur capacité à réduire le stress oxydant et à améliorer le statut antioxydant des individus [3 ; 9]. Ainsi, ils ont un fort potentiel de valorisation dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique [3].

Cependant, ces propriétés sont également responsables d'un manque de stabilité à long terme, ce qui rend ces composés naturels très sensibles à la lumière et à la chaleur. De plus, les polyphénols présentent souvent une mauvaise biodisponibilité principalement due à une faible solubilité dans l'eau. Enfin, bon nombre de ces molécules possèdent un goût très astringent et amer, ce qui limite leur utilisation dans les aliments ou dans les médicaments oraux. Pour contourner ces inconvénients, des systèmes de distribution ont été développés, et parmi eux, l'encapsulation semble être une approche prometteuse [10].

L'encapsulation est une technologie consistant à piéger des matériaux solides, liquides ou gazeux dans des capsules miniatures, de taille nano-, micro- ou millimétriques, qui peuvent libérer leur contenu à des vitesses contrôlées dans des conditions spécifiques [11 ; 12]. Elle peut également être définie par la taille des particules produites, par exemple : nanoencapsulation, microencapsulation, etc [11]. Cette technique est utilisée dans les domaines pharmaceutique, chimique, cosmétique, agroalimentaire, dans les industries de l'imprimerie, etc [10].

Les molécules bioactives encapsulées sont très diverses et peuvent être de nature hydrophile ou hydrophobe (lipophile) : polyphénols, vitamines, huiles, caroténoïdes, enzymes, arômes, probiotiques, etc. [13-17]. Selon la nature du bioactif et la méthode d'encapsulation, divers matériaux de revêtement peuvent être utilisés, soit individuellement, soit en combinaison avec d'autres matériaux, notamment les protéines, les lipides et les glucides [13 ; 18 ; 19 ; 20].

L'amidon est l'un des polymères glucidiques naturels les plus abondants, peu coûteux, ne causant pas d'allergie et sans impact sur le goût. Certaines études comparatives ont montré que les systèmes à base d'amidon donnent une meilleure efficacité d'encapsulation et fournissent une meilleure protection des molécules bioactives (par exemple, l'huile de lin et les arômes) par rapport aux systèmes à base de protéines et de gomme arabique [13 ; 21 ; 22]. De nombreuses études sont effectuées sur la composition, la structure, les propriétés et modifications des amidons provenant de diverses sources botaniques [13 ; 23 ; 24], ce qui fournit une base solide sur l'utilisation des amidons comme matériau d'encapsulation des composés bioactifs dans le but d'une libération contrôlée.

Il existe plusieurs méthodes d'encapsulation dont les plus fréquemment utilisées dans le cas des composés phénoliques sont les suivantes : séchage par atomisation (pulvérisation) ou *spray-drying*, séchage par congélation (lyophilisation) ou *freeze-drying*, nanoencapsulation, coacervation, cocrystallisation, inclusion moléculaire, encapsulation dans des liposomes, des émulsions, voire des levures comme matériaux de revêtement (*yeast encapsulation*) [18 ; 19 ; 20]. Parmi ces méthodes d'encapsulation, les technologies de séchage par atomisation ou lyophilisation sont les plus couramment appliquées.

En outre, le séchage par pulvérisation est la technique de microencapsulation la plus utilisée dans l'industrie alimentaire, en général pour la préparation d'additifs et d'arômes alimentaires secs et stables. Comparé à toutes les techniques et méthodes d'encapsulation, le processus de séchage par pulvérisation est relativement peu coûteux, simple et bien établi. Le seul

inconvenient de cette technique est la disponibilité limitée et le coût élevé des matériaux de revêtement [25].

Cependant, la lyophilisation s'est avérée être la méthode la plus appropriée pour sécher les substances thermosensibles, afin de minimiser les réactions de dégradation thermique, ainsi, elle est plus adaptée pour l'encapsulation des polyphénols [26 ; 27 ; 28]. Par contre, la lyophilisation présente certains inconvénients, tels qu'un long temps de séchage et une consommation d'énergie plus élevée.

L'objectif de cette partie de la thèse est l'encapsulation des composés phénoliques du grignon d'olive par l'amidon de pomme de terre comme matrice, en utilisant la technique de lyophilisation. Dans ce contexte, notre étude vise tout d'abord à mettre au point le système d'encapsulation en utilisant un composé phénolique modèle de faible poids moléculaire, peu coûteux et résistant à la chaleur, le tyrosol. Ensuite, le protocole optimisé sera appliqué aux composés phénoliques du grignon d'olive.

Notre approche expérimentale comporte six principaux volets :

1. Mise au point du système d'étude à savoir la solubilisation de l'amidon de pomme de terre en utilisant deux types de chauffage :
 - ❖ Chauffage conventionnel ou chauffage par conduction : réalisation d'une cinétique des phases de gélatinisation et de rétrogradation de l'amidon de pomme de terre.
 - ❖ Chauffage sous micro-ondes : réalisation d'une cinétique de la phase de gélatinisation de l'amidon de pomme de terre.
 - ❖ Détermination du rendement pour chaque type de chauffage.
2. Encapsulation par la méthode de lyophilisation du composé phénolique modèle (tyrosol) par l'amidon de pomme de terre gélatinisé sous chauffage conventionnel et chauffage sous micro-ondes.
3. Encapsulation par la méthode de lyophilisation des composés phénoliques du grignon d'olive par l'amidon de pomme de terre gélatinisé uniquement sous chauffage micro-ondes.
4. Analyse par spectrophotométrie UV-visible, UPLC-DAD-MS et microscopie (MEB-EDS) des capsules de tyrosol et de composés phénoliques.
5. Détermination de l'efficacité d'encapsulation.
6. Enfin, étude cinétique de la libération contrôlée du tyrosol encapsulé par digestion enzymatique de l'amidon.

Le sujet développé dans cette étude s'insère dans le contexte de la valorisation des déchets de l'industrie oléicole, en l'occurrence le grignon d'olive. Les travaux ont été réalisés au sein de l'équipe Micronut de l'Unité Mixte de Recherche SQPOV (Sécurité & Qualité des Produits d'Origine Végétale) associant Avignon Université et INRAE. Ce travail fait suite à une première étude dans le cadre de la thèse d'Aurélia Malapert (soutenue le 22/12/2017), intitulée « développement de nouveaux ingrédients naturels à visée nutraceutique à partir de coproduits de l'industrie oléicole » et réalisée au sein du même laboratoire. Cette étude portait notamment sur l'encapsulation des composés phénoliques du grignon d'olive dans la β -cyclodextrine (dérivé cyclique de l'amidon composé de sept unités de glucopyranose), en utilisant le séchage par atomisation et la lyophilisation comme technique d'encapsulation.

Synthèse Bibliographique

1. Grignon d'olive

1.1. Définition

Le grignon d'olive est un résidu solide de couleur brune, résultant du processus de production d'huile d'olive par pressage mécanique des fruits de l'olivier sans aucun traitement chimique. Il se compose de la coque du noyau réduit en morceaux, de la peau et de la pulpe de l'olive ; il contient encore une certaine quantité de matières grasses et une importante quantité d'eau qui varie selon la variété des olives et selon le procédé d'extraction utilisé [29 ; 30 ; 31].

1.2. Types de grignon d'olive

Les grignons d'olives sont disponibles en quantités importantes dans de nombreux pays méditerranéens. En fonction du procédé d'extraction et de l'équipement des huileries, il est possible de distinguer trois types de grignons :

- ❖ Les grignons bruts, issus des huileries utilisant le système traditionnel de presses hydrauliques et les scourtins. Leurs teneurs relativement élevées en eau (24%) et en huile (9%) favorisent leur altération rapide lorsqu'ils sont laissés à l'air libre.
- ❖ les grignons épuisés, obtenus après traitement des grignons bruts aux solvants, généralement de l'hexane, pour l'obtention d'huile utilisée en savonnerie.
- ❖ les grignons issus des huileries modernes utilisant le procédé d'extraction en chaîne continue ou super-presses [32].

Le tableau 1 résume la composition chimique des différents types de grignon d'olive.

Tableau 1: Composition chimique des différents types de grignon [33]

Types de grignon	Matière Sèche (%)	Matières minérales (%)	Matière Azotées Totales (%)	Cellulose brute (%)	Matières Grasses (%)
Grignon brut	75–80	3–5	5–10	35–50	8–15
Grignon gras partiellement dénoyauté	80–95	6–7	9–12	20–30	15–30
Grignon épuisé	85–90	7–10	8–10	35–40	4–6
Grignon épuisé partiellement dénoyauté	85–90	6–8	9–14	15–35	4–6

Le grignon d'olive contient des composés phénoliques faisant partie des facteurs inhibant la croissance des microorganismes. Ils proviennent de l'olive, dont les composés phénoliques représentent 0,3% à 5%, mais également de la dégradation de la lignine en fonction du traitement subi [34]. Les effets nocifs du grignon d'olive sont dus en grande partie à leur contenu en polyphénols difficilement biodégradables [6].

Le tableau 2 présente quelques composés phénoliques identifiés dans le grignon d'olive par Malapert et al. [35]

Tableau 2 : Quelques composés phénoliques identifiés par Malapert et al. [35]

No.	t_R (min)	Composés	λ_{max} (nm)	m/z	fragments
1	0.46	Acide quinique	-	191	173, 127, 111
U ₁	0.52	Inconnu 1	232, 267	191	173, 127, 111
U ₂	0.77	Inconnu 2	227, 279	191	173, 127, 111
2	1.75	Verbascoside-Rha	234, 282, 308	477	459, 367, 161
3	2.12	Glucoside d'acide loganique	232, 283	537	375, 331, 179
4	2.25	Hexoside d'acide vanillique	254, 293	329	167, 151, 123, 108
5	2.31	Hydroxytyrosol (HT)	227, 280	153	
6	2.35	glucoside HT 1	231, 277	315	153, 123
7	2.46	glucoside HT 2	231, 279	315	153, 123
8	2.55	Aldarate de p-coumaroyl	313	355	337, 209, 191, 147, 129
9	2.72	1- β -Glucosyl-acyclo-acide dihydroélnolique	236, 294	407	389, 375, 357, 313, 161
10	3.05	Dérivé de DCMEA hydroxylé	236	199	181, 155, 111
11	3.15	Verbascoside - CA	237, 281	461	315, 297, 161, 135
12	3.29	Tyrosol	227, 276	137	119
13	3.71	Feruloyl-hexoside	286, 320	401	355, 193
14	3.73	Caféoyl-hexoside	239, 286sh, 318	341	179, 135

Tableau 2 : Quelques composés phénoliques identifiés par Malapert et al. (suite) [35]

No.	t _R (min)	Composés	λ _{max} (nm)	m/z	fragments
15	4.02	Acide chlorogénique	244, 296, 327	353	247, 163, 135, 109
16	4.24	Acide caféique (AC)	238, 295sh, 325	179	163, 135
17	4.43	p-coumaroyl-hexoside	240, 325	325	265, 163, 119
18	4.55	Oleoside	236	389	345, 209, 165
19	5.69	Acide p-coumarique	227, 309	163	119
20	5.73	Oléoside désoxyriboside	239, 278	505	389, 345, 121
21	5.77	Aglycone d'oleuropéine	245, 282	377	197, 153
22	6.60	Acide férulique	237, 296sh, 322	193	149
23	7.75	Lutéoline-O-rutinoside	246, 346	593	285
24	7.87	Lutéoline-O-rutinoside	244, 346	593	285
25	8.18	Acide élénolique	244	241	209, 165, 139, 127, 121, 101
26	8.39	Verbascoside	235, 291sh, 330	623	461, 477, 315
27	8.82	Tétrahydro-oleuropéine	246, 279	543	525, 513
28	9.17	Nüzhenide	246, 282, 334	685	523, 453, 421, 299
29	9.41	Glucoside d'oleuropéine	250, 279	701	539, 377, 307, 275
30	9.79	Caféoyl-6'-sécoliganoside	225, 290, 327	551	507, 389, 385, 341, 281, 251, 221, 179, 161
31	9.91	10-Hydroxy-DCMO aglycone	243, 281	335	199, 155, 111
32	10.86	Comselogoside	240, 313	535	491, 389, 345, 307, 265, 163
33	11.02	Oleuroside	244, 282	539	469, 437, 377, 307, 275
34	11.09	Dérivé de ligstroside	246, 277	655	517, 361, 291, 259
35	11.69	Isomère de ligstroside	248, 282	523	453, 421, 299

sh: shoulder, DCMEA: decarboxymethyl elenolic acid, DCMO: decarboxymethyl oleuropein.

2. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans toutes les plantes vasculaires et constituent une grande famille de substances omniprésentes et variées, des molécules simples aux structures complexes. Ces substances naturelles ont toutes en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyl et dérivant du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de la voie des polyacétates [10 ; 36 ; 37 ; 38].

Les polyphénols sont couramment consommés dans l'alimentation humaine. Ils agissent comme des antioxydants et participent à la prévention des maladies associées au stress oxydant, telles que les maladies cardiovasculaires et cancer [39]. En outre, d'autres activités biologiques, telles que les effets anti-inflammatoires, antibactériens et antiviraux, ont été signalées [40].

Les polyphénols comprennent les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques), les flavonoïdes (flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidines et flavanols), les stilbènes et les lignanes [41]. La figure 1 représente quelques métabolites secondaires spécifiques à l'olive.

Les composés phénoliques sont des molécules peu stables, ayant souvent un goût amer ou astringent qu'il peut être nécessaire de masquer en vue d'applications dans les domaines agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, etc. Ce sont des composés susceptibles de s'oxyder à l'air en des produits brunâtres avec perte considérable de leur activité. Ils présentent également une solubilité dans l'eau assez limitée. Par conséquent, les applications industrielles des composés phénoliques nécessitent souvent de recourir à des techniques palliant aux différents problèmes précédemment cités. L'encapsulation est l'une des plus adaptées [10]. Quelques composés phénoliques, ainsi que leurs groupes et leurs propriétés, sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Exemples des propriétés de quelques composés phénoliques [42]

Groupes phénoliques	Exemples	Sources	Propriétés
Anthocyanidines	Cyanidine, delphinidine, malvidine, pélargonidine, péonidine, pétunidine et leurs glycosides	Fruits, fleurs	pigments naturels; Très sensible à la température, oxydation, pH et lumière, soluble dans l'eau.
Catéchines	Catéchine, épicatechine, gallocatéchine, épigallocatéchine et épigallocatéchine gallate	Thé	Sensible à l'oxydation, à la lumière et au pH, astringent et amer; légèrement soluble dans l'eau.
Flavanones	Hespérétine, hespéridine, homoériodictyol, naringénine, naringine	Agrumes	Sensible à l'oxydation, à la lumière et au pH, les aglycones sont insolubles mais les glycosides sont solubles dans l'eau.
Flavonols	Kaempférol, myricétine, quercétine et leurs glycosides	Fruits, légumes	Sensible à l'oxydation, à la lumière et au pH, les aglycones sont légèrement solubles mais les glycosides sont solubles dans l'eau.
Isoflavones	Daidzéine, génistéine, glycitéine	Soja, cacahuètes	Sensible au pH alcalin, astringent et amer; odeur de soja, soluble dans l'eau.
acides Hydroxybenzoïque	Daidzéine, génistéine, glycitéine	Baies, thé, blé	Sensible à la température, à l'oxydation, au pH et à la lumière, soluble dans l'eau.

Tableau 3 : Exemples des propriétés de quelques composés phénoliques suite [42]

Groupes phénoliques	Exemples	Sources	Propriétés
acides Hydroxycinnamique	Acide caféique, acide férulique, acide p-coumarique, acide sinapique	Fruits, avoine, riz	Sensible à la température, à l'oxydation, au pH et à la lumière ; soluble dans l'eau.
Lignanes	Pinorésinol, podophyllotoxine, stéganacine	Lin, sésame, légumes	Relativement stable dans des conditions normales, saveur désagréable; soluble dans l'eau.
Tanins (proanthocyanidines)	Castaline, pentagalloyl glucose, procyanidines	Thé, baies, vins, Chocolat	Sensible aux hautes températures et à l'oxydation, astringent et amer, soluble dans l'eau.

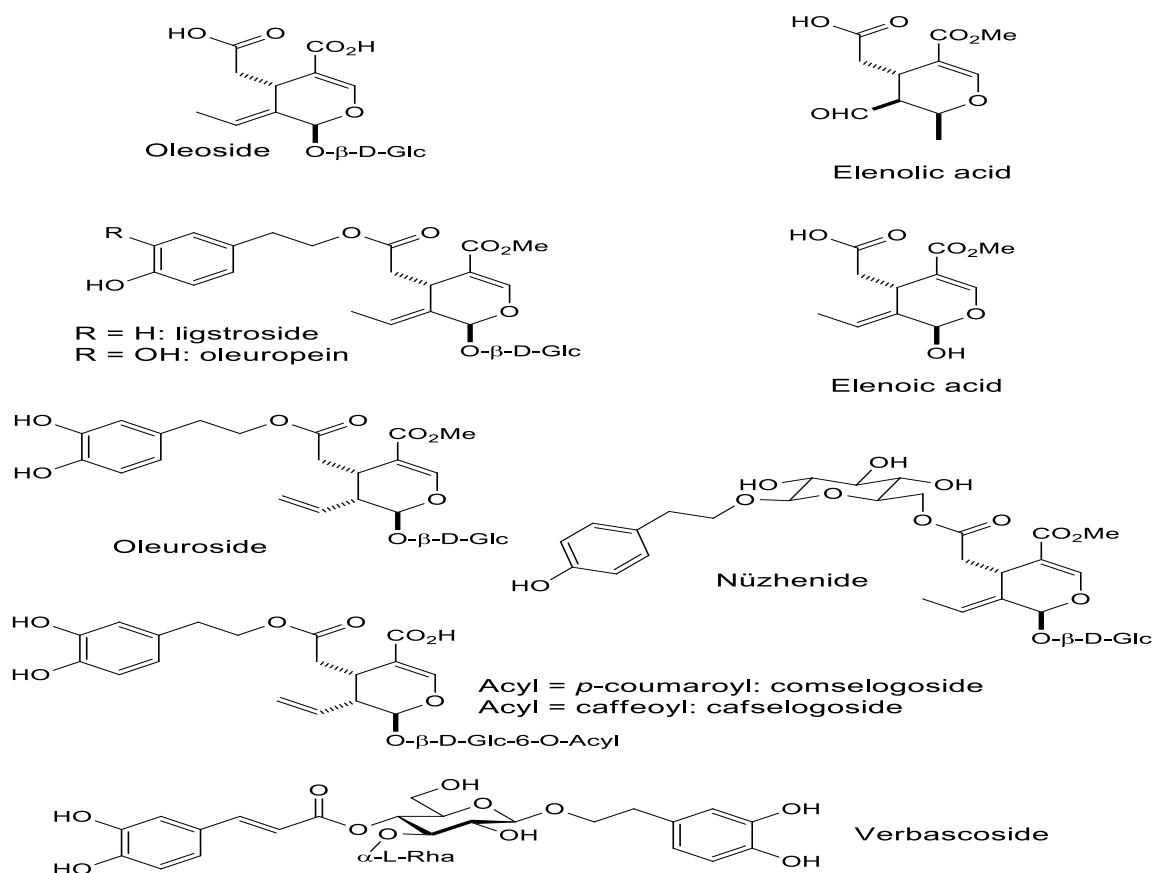


Figure 1 : Structures d'une sélection de métabolites secondaires spécifiques à l'olive

3. Procédé d'encapsulation

3.1. Définition

L'encapsulation, développée depuis plus de 60 ans, est l'ensemble des technologies permettant la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant un principe actif sous forme solide, liquide, ou gazeuse et dont la taille varie entre quelques nanomètres et quelques millimètres. Ainsi, le principe actif est protégé contre son milieu environnant : l'oxygène et l'humidité de l'air, la chaleur et la lumière [42,43 ; 44].

L'encapsulation joue un rôle important dans les industries pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire etc., car elle améliore non seulement la stabilité chimique des substances actives mais également elle permet de contrôler leur libération [10]. Le tableau 4 résume différents domaines d'application des composés encapsulés.

Tableau 4 : Quelques domaines d'application des composés encapsulés [45 ; 46]

Domaine industriel	Exemples de composés encapsulés
Pharmacie et médical	Antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins, vitamines, minéraux, antigènes, anticorps
Cosmétique	Parfums, huiles essentielles, anti transpirants, agents bronzants, colorant capillaire ...
Alimentaire	Huile essentielles, graisses, épices, arômes, vitamines, ...
Agriculture	Herbicides, insecticides, engrais, répulsif ...
Biotechnologie	Enzyme immobilisées, microorganisme, cellules vivantes, cellules artificielles, ...
Chimie	Catalyseurs, enzymes, additifs pour plastiques, inhibiteur de corrosion, retardateurs d'incendie,
Détergents	Adoucissants, antistatique, agents décolorant, cires, détachant...
Textile	Colorants, parfum, pigments, bactéricides, bioactifs médicaux, fongicides ...
Graphismes et impression	Révéléateur, cristaux liquides...
Photographie	Halogénures d'argent, pigments, colorants, plastifiants...
Electronique	Matériaux semi-conducteur, adhésif, agent de séchage...
Traitement des déchets	Microorganismes, substrats, détoxifiant, déchets industriels à risques, déchets radio actifs...

Plusieurs morphologies sont obtenues à l'issue de l'encapsulation, mais les plus couramment observées sont les capsules mononuclées (un seul noyau entouré d'une coque) ou des agrégats (plusieurs noyaux entourés par une matrice) (Figure 2)

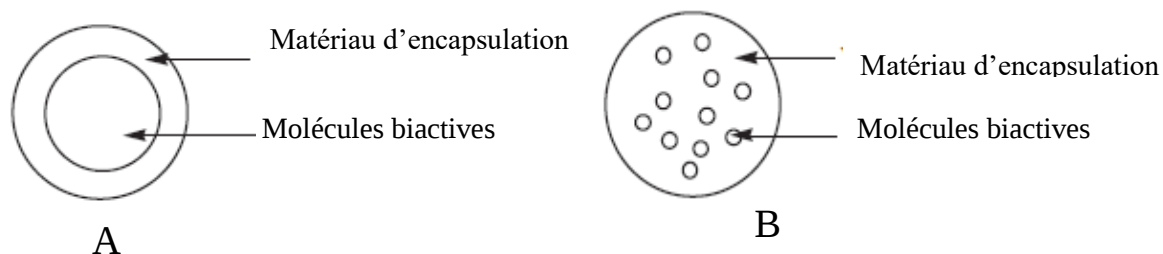


Figure 2 : les deux principales morphologies de capsules observées, mononuclée (A) et agrégat (B) [42].

L'encapsulation des composés phénoliques engendre plusieurs morphologies selon la technique d'encapsulation employée (figure 3).

Techniques d'encapsulation

Caractéristiques morphologiques

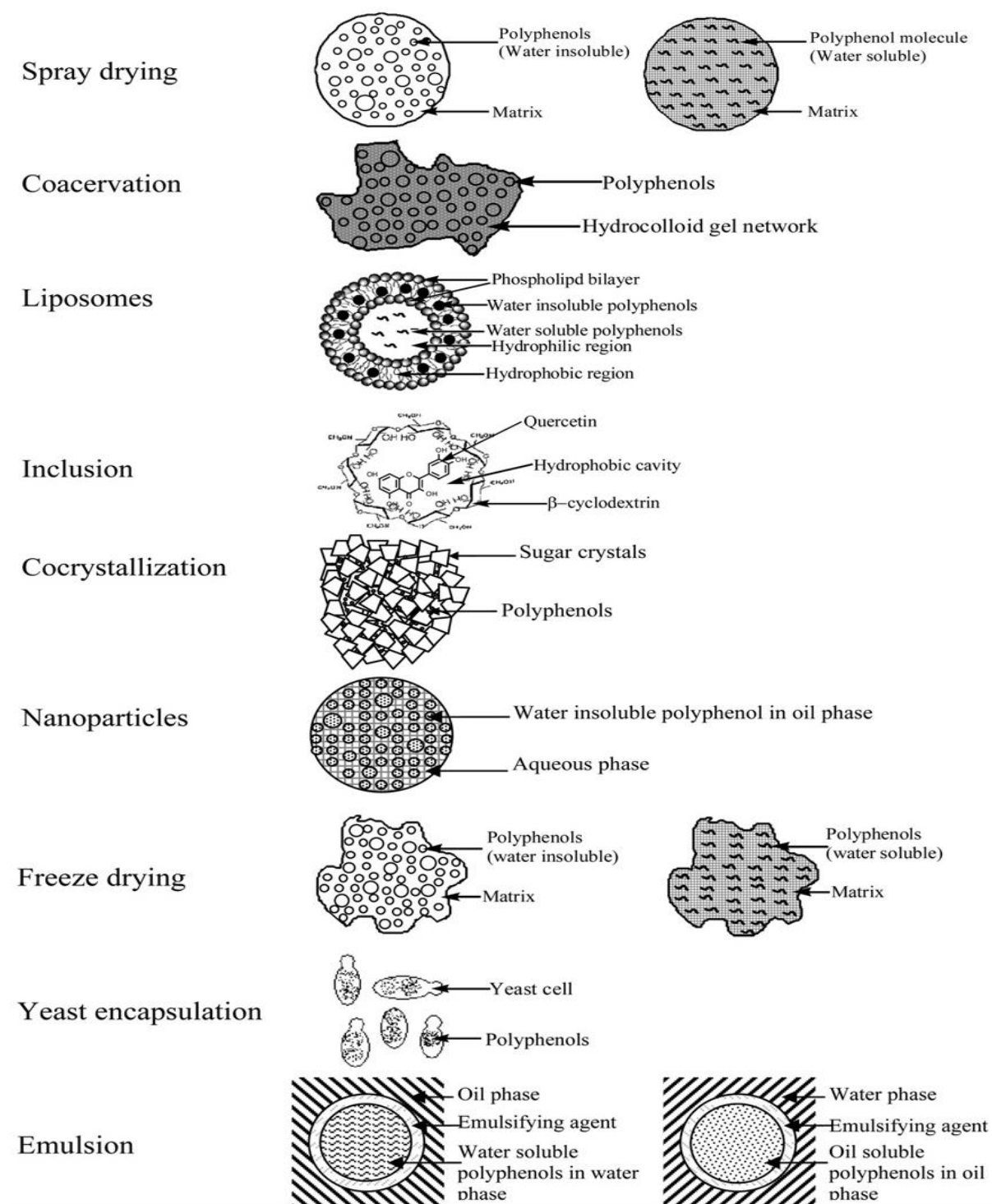


Figure 3 : Différentes morphologies de microcapsule de composés phénoliques en fonction de la technique d'encapsulation [42].

Selon les besoins liés à un domaine d'application spécifique, les particules sont élaborées pour remplir les fonctions suivantes [10] :

- ❖ Protéger un composé fragile ou instable de son environnement,
- ❖ Protéger l'utilisateur contre les effets secondaires du composé encapsulé,
- ❖ Piéger un composé (arômes, solvants organiques, pesticides, huiles essentielles, polyphénols...),
- ❖ Modifier la densité d'un liquide,
- ❖ Changer un liquide en solide,
- ❖ Isoler deux composés incompatibles qui doivent coexister dans le même milieu,
- ❖ Contrôler la libération du composé encapsulé

3.2. Méthodes d'encapsulation

La sélection de la méthode d'encapsulation dépend de l'application et des paramètres spécifiques, telles que la taille requise des particules, les propriétés physico-chimiques du noyau et des matériaux de revêtement, les mécanismes de libération, coût du processus, etc. Les procédés d'encapsulation sont variés et il est nécessaire de les classer afin de convenablement les sélectionner en fonction de la problématique traitée. Selon Benoît et al. (2013), ils peuvent être classés en trois groupes selon le principe technique : physico-chimiques, mécaniques, chimiques (tableau 5) [47, 48].

Tableau 5 : Classification des procédés d'encapsulation

Types de procédé	Mode d'encapsulation
Procédés Physico-chimiques	Séparation de phases ou coacervation (simple ou complexe)
	Evaporation – extraction de solvant
	Gélification thermique d'émulsions (<i>hot melt</i>)
Procédés chimiques	Polycondensation interfaciale
	Polymérisation interfaciale
	Polymérisation en milieu dispersé par voie radicalaire ou anionique
Procédés mécaniques	Nébulisation/séchage (<i>spray drying</i>)
	Gélification ou congélation de gouttes (<i>prilling</i>)
	Enrobage en lit fluidisé (<i>spray-coating</i>)
	Extrusion/sopronisation

Les méthodes d'encapsulation les plus appliquées aux composés phénoliques sont les suivantes : séchage par pulvérisation ou *spray-drying*, séchage par lyophilisation ou *freeze-drying*, coaservation, encapsulation par inclusion, cocrystallisation, nanoencapsulation, encapsulation dans des liposomes, des émulsions ou des levures [42].

Nous allons détailler les méthodes d'encapsulation par séchage par atomisation (*spray-drying*) ou par lyophilisation (*freeze-drying*).

3.2.1. Séchage par pulvérisation ou atomisation (*spray-drying*)

Le séchage par pulvérisation a été utilisé dès les années 30 pour encapsuler les arômes [42, 49]. Ce procédé est largement utilisé dans l'industrie pour la production de microsphères ou microcapsules, selon la nature initiale du liquide pulvérisé : solution, suspension ou émulsion [10].

La technique de séchage par atomisation implique un appareil spécifique (figure 4), permettant la formation de particules à partir d'une dispersion de composé actif dans une solution d'agent de revêtement [10, 50, 51, 52,53]. Tout d'abord, une formulation liquide contenant un agent d'enrobage et l'ingrédient actif dans un solvant est atomisée en gouttelettes via, soit une buse utilisant du gaz comprimé pour atomiser le liquide, soit un atomiseur rotatif utilisant une roue tournant à grande vitesse. Ensuite, un gaz chauffé (air ou azote) est mis en contact avec la charge atomisée à l'aide d'un disperseur de gaz, ce qui conduit à l'évaporation du solvant. Lorsque le liquide de la gouttelette s'évapore rapidement, une particule se forme et tombe au fond de la chambre. La poudre est récupérée des gaz d'échappement à l'aide d'un cyclone ou d'un filtre à manches. Les particules obtenues ont une forme sphérique, avec une gamme de taille moyenne de 10 à 100 μm [10].

Les paramètres influençant la technique de séchage par pulvérisation sont la géométrie de la buse et la viscosité initiale de la solution [10].

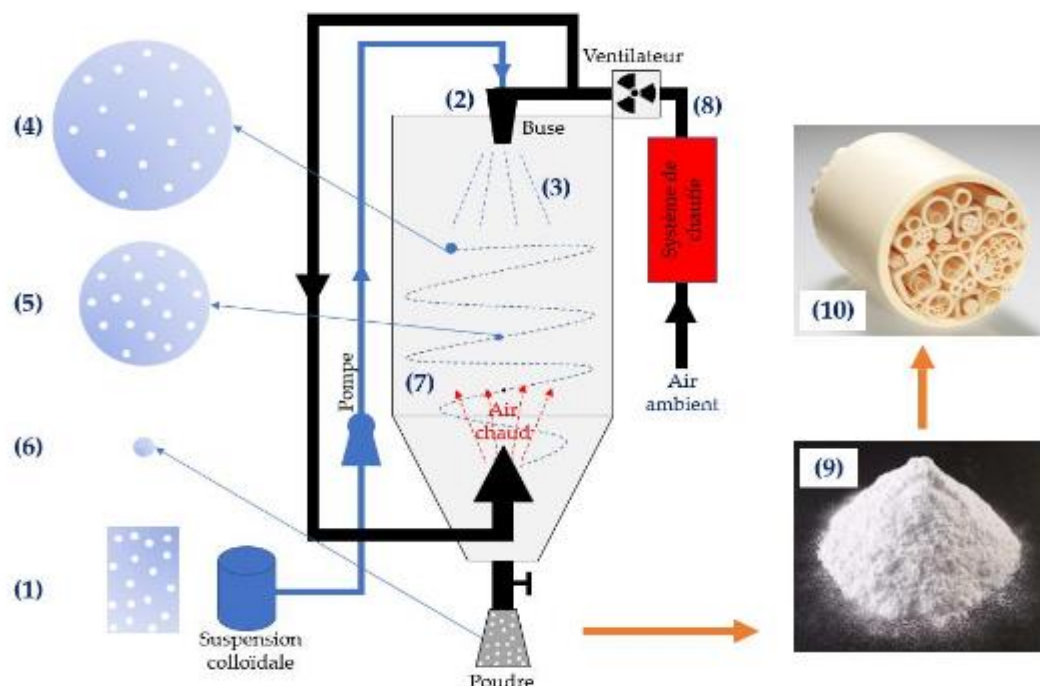


Figure 4 : Schéma de principe du procédé de séchage par atomisation de suspensions colloïdales (1) suspension, (2) système d'atomisation, (3) séchoir, (4) goutte colloïdale, (5) goutte de gel et (6) grain sec, (7) air chaud, (8) cyclone et autres systèmes de filtration ; (9) poudre et (10) exemples de composants produits par malaxo-extrusion de la poudre produite. [54].

3.2.1.1. Avantages et Inconvénients

Le séchage par pulvérisation est une méthode de séchage très rapide (15 à 30s) en raison de la très grande surface créée par l'atomisation de l'alimentation liquide. Il s'agit d'une méthode en une seule étape et le processus peut être conduit en continu. Cette technique est relativement peu coûteuse, flexible et conduit à la production de particules stables et de haute qualité, ce qui en fait la technique la plus utilisée dans l'industrie alimentaire [10].

Par contre, peu de biopolymères sont disponibles pour l'encapsulation par séchage par pulvérisation. Cependant, ces biopolymères peuvent être modifiés chimiquement par réticulation ou en ajoutant des groupes fonctionnels (acétylation et hydroxypropylation, entre autres) afin de modifier leurs propriétés physiques et chimiques [55 ; 56 ; 57].

L'utilisation de la technique de séchage par pulvérisation pour l'encapsulation des composés phénoliques est généralement limitée par les températures très élevée. La température d'entrée d'air (100 à 600°C) joue un rôle critique dans la dégradation des polyphénols pendant le séchage

par atomisation. Par exemple, dans l'étude de l'encapsulation par séchage par pulvérisation d'extrait de soja, une augmentation de la température d'entrée du gaz a conduit à un produit avec une plus faible concentration de composé phénolique [55 ; 58]. En outre, une plus grande perte d'anthocyanes a été observée lorsque la température d'entrée de l'air était plus élevée [55]. Par conséquent, l'optimisation des conditions de séchage par pulvérisation, en particulier la température de séchage, est essentielle pour un meilleur rendement en polyphénols encapsulés [55 ; 59]. Le tableau 6 regroupe quelques exemples d'encapsulation des polyphénols par séchage par pulvérisation.

Tableau 6 : Quelques exemples d'encapsulation par la technique de séchage par pulvérisation

Méthode	Produits encapsulés	Matériaux d'enrobage	Références
Séchage par pulvérisation ou par atomisation	Extrait de feuilles d'olivier	Chitosane	60
	Phénols d'extrait de marc de cerise aigre	Maltodextrine + gomme arabique	61
	Procyanidines de pepins de raisin	Maltodextrine 40% + gomme arabique 60%	62
	Polyphénols d'extrait de soja	Maldodextrine+ amidon, ou + silice (Tixosil 333)	58
	Extrait de pomme et de feuilles d'olivier riche en oleuropeine	Caséinate de sodium + lécithine de soja	63

3.2.1.2. Stabilité au stockage des produits d'encapsulation par pulvérisation

La stabilité pendant le stockage des poudres encapsulées obtenues par pulvérisation dépend des matériaux d'encapsulation, des conditions de séchage par pulvérisation, des types d'emballage et du milieu de stockage (oxygène, lumière, humidité, température et activité de l'eau) [64 ; 65].

Une basse température de stockage ainsi qu'une basse activité de l'eau conduisent à une meilleure stabilité. Par exemple, une meilleure stabilité de stockage a été observée dans le cas des extraits phénoliques de baies à une température de l'ordre de 25°C et une activité de l'eau de l'ordre de 0,33 [66].

Comme dans le cas d'autres processus d'encapsulation, le séchage par pulvérisation ne peut pas fournir 100% d'efficacité d'encapsulation. Cependant, la quantité des composés non encapsulés (situés particulièrement à la surface du matériau d'enrobage) peut être minimisée. Une meilleure efficacité d'encapsulation ne signifie pas forcément une meilleure stabilité lors du stockage [65 ; 66].

3.3.2. Séchage par congélation ou lyophilisation (*freeze-drying*) [67]

La lyophilisation est l'un des procédés les plus utilisés pour la protection des molécules thermosensibles. Il s'agit d'une opération de déshydratation à basse température consistant à éliminer par sublimation la majeure partie de l'eau contenue dans un produit initialement congelé. Ainsi, l'eau incluse dans le produit passe directement de l'état solide à l'état gazeux. Trois phases peuvent être identifiées lors de la lyophilisation (figure 5) :

- (1) Congélation du produit. Le produit est congelé à basse température (-30 à -50°C). Cette étape est déterminante car elle fixera les caractéristiques cristallines du système congelé et donc la texture de la forme lyophilisée finale.
- (2) Sublimation de la glace. Le produit congelé est ensuite introduit dans une enceinte de séchage sous vide poussé (pression absolue : 100 Pa). L'eau s'évapore par sublimation.
- (3) Désorption finale de l'eau liée (dessiccation secondaire). Il s'agit d'extraire l'eau adsorbée ou emprisonnée dans les microcapillaires.

Le lyophilisateur est généralement équipé d'une enceinte sous vide où sont déposés les produits à sécher, d'une pompe à vide, d'un panneau de commande (régulation de la pression et de la température) et d'un condenseur afin de piéger la vapeur d'eau en glace (sublimation inverse).

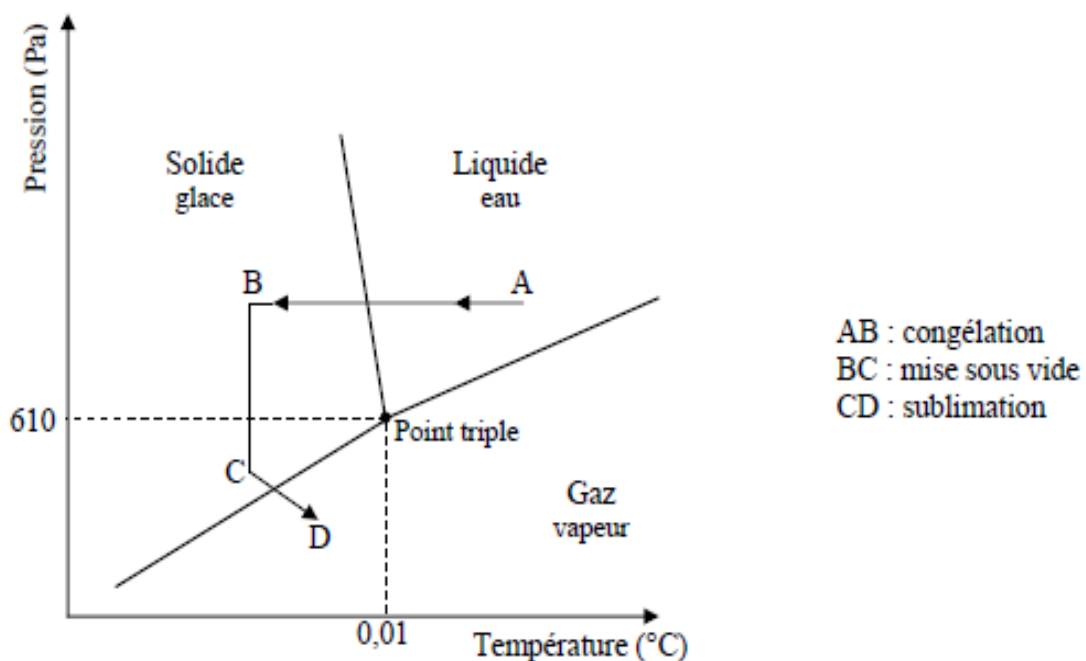


Figure 5 : Les différentes phases de l'état de l'eau lors du procédé de lyophilisation [67]

3.3.2.1. Avantages et Inconvénients

La lyophilisation s'est avérée être la méthode la plus appropriée pour sécher les substances thermosensibles, minimiser les réactions de dégradation thermique, elle est donc plus appropriée pour l'encapsulation des composés phénoliques [27].

Cependant, ce processus présente certains inconvénients, tels qu'un long temps de séchage et une importante consommation d'énergie. En outre, une comparaison à l'échelle industrielle a montré que la lyophilisation est 30-50 fois plus chère que la technique de séchage par atomisation [68]. La lyophilisation est donc généralement employée pour sécher des produits à haute valeur ajoutée et qui contiennent des arômes délicats (café, épices, pigments...).

3.3.2.2. Stabilité du produit lyophilisé

La stabilité du produit sec peut être influencée par le type de solvant avec lequel il a été lyophilisé. Ainsi il a été rapporté que la poudre de Caverject (Prostaglandine E1, médicament possédant des propriétés vasodilatatrices) obtenue par lyophilisation à partir d'un système eau-co-solvant (20 % v/v t-butanol) est beaucoup plus stable que celle obtenue à partir d'une simple solution aqueuse. L'amélioration de la stabilité du produit semble liée à une nette augmentation de la surface spécifique du produit sec (à peu près 5 fois) obtenue en utilisant le système à base de t-butanol [69].

Il a été également rapporté que le Cefazolin sodium (antibiotique du groupe des céphalosporines) lyophilisé à partir d'un système à co-solvant (mélange alcool isopropylique/eau) présente une stabilité chimique plus importante [69 ; 70]. En présence du cosolvant, le Cefazolin sodium initialement amorphe cristallise pendant la congélation. La lyophilisation couplée à un traitement thermique (recuit) favorise la formation de la phase cristalline du produit, phase qui présente une meilleure stabilité.

L'utilisation de co-solvant organiques s'avère doublement bénéfique, d'une part, en raison de temps de lyophilisation plus courts, et, d'autre part, du fait que l'on obtient un lyophilisat moins collapsé. D'autres alcools à courte chaîne carbonée tels que le méthanol, l'éthanol et le n-propanol sont également connus pour avoir le même effet sur le cefazolin sodium [69 ; 71]. Par contre, dans certains cas, la lyophilisation à partir de co-solvant organiques peut donner des systèmes moins stables, par exemple lors de la lyophilisation d'une protéine bovine à partir d'un mélange eau/diméthyl sulfoxyde [69 ; 72]. Les résultats expérimentaux ont montré que la protéine dissoute est dénaturée au point de réduire son activité enzymatique après reconstitution.

Les capsules de linoléate de menthyle obtenues par lyophilisation ont été mieux conservées contre l'oxydation que celles obtenues par atomisation (spray-dring) et ceci quelle que soit l'humidité relative [73].

Tableau 7 : Quelques exemples de composés phénoliques encapsulés par lyophilisation

Méthode	Produits encapsulés	Matériaux d'enrobage	Références
Lyophilisation	Marc de raisin (anthocyanes)	Maltodextrine DE 20	74
	Extrait mûr (Rubus chamaemorus) riche en polyphénols	Maltodextrine DE5-8 et DE18.5	75
	Curcumine	β -cyclodextrine	76
	Huile de maïs	Maltodextrine	77
	Lycopène	Cyclodextrine	78

4. Les matériaux de revêtement ou d'enrobage ou d'encapsulation

Le principe actif (polyphénols, vitamines, huiles, caroténoïdes, enzymes, arômes, probiotique) [13-17] à protéger est piégé ou enrobé dans un revêtement qui l'isole du milieu extérieur. La stabilisation des molécules bioactives se produit parce que le matériau de revêtement agit comme une barrière de perméabilité physique pour l'oxygène et d'autres espèces susceptibles de diffuser. Par conséquent, la durée de conservation des produits encapsulés pourrait être prolongée [79].

Selon la nature et le type d'encapsulation, divers matériaux de revêtement ont été utilisés pour l'encapsulation, notamment les protéines, les glucides et les lipides [13 ; 18 ; 19 ; 80]. Le choix de ces matrices dépend de facteurs liés aux objectifs et aux conditions d'utilisation du produit, au procédé d'encapsulation et au coût d'utilisation [81].

Les systèmes à base de polysaccharides (par exemple, l'amidon) peuvent encapsuler une gamme de molécules bioactives hydrophiles et hydrophobes, contrairement au système à base de lipides. Les polysaccharides sont plus appropriés aux conditions de haute température, contrairement aux systèmes à base de lipides et de protéines qui sont moins tolérants (fusion des lipides, dénaturation des protéines).

L'amidon natif est généralement modifié par des méthodes physiques, chimiques ou enzymatiques pour avoir les propriétés (par exemple, une hydrophobie accrue) pour différentes applications, telles que l'encapsulation et la libération contrôlée [13 ; 20 ; 24].

De par son faible coût, son absence de goût et sa nature non-allergène, l'amidon est souvent sollicité pour encapsuler les molécules bioactives [13 ; 14 ; 16 ; 17 ; 82 ; 83 ; 84 ; 85].

Quelques études ont montré que les systèmes à base d'amidon donnent une efficacité d'encapsulation plus élevée et une meilleure protection des ingrédients alimentaires (par exemple, huile de lin et arômes) que les systèmes à base de protéines et de gomme arabique [13 ; 21 ; 86].

4.1. Généralité Amidon

4.1.1. Définition

L'amidon natif correspond au produit brut, extrait sans modification de la molécule. Il est synthétisé à partir du D-glucose, sucre simple produit pendant la photosynthèse des plantes [86]. L'amidon est un sucre de réserve chez les végétaux et une importante source glucidique chez l'homme. Il peut se concentrer dans différentes parties des plantes : les racines, les bulbes

ou les tubercules comme dans le cas de la pomme de terre et le manioc ; dans les graines comme dans le cas du maïs, du blé, du riz, etc. ; et dans la moelle de la tige : chez le sagoutier et le zamier [24].

C'est un nutriment abondant, renouvelable, peu coûteux, qui trouve dans les aliments de multiples fonctions comme épaississant, gélifiant, liant sous sa forme d'empois d'amidon granulaire. Sous forme hydrolysée, l'amidon est utilisé comme matière sucrante, liante ; il fait partie des additifs alimentaires [57]. L'amidon est composé de deux types de polymères de glucose liés entre eux par des liaisons α -(1,4) glycosidiques : l'amylose (figure 6 A et C) et l'amylopectine (figure 6 D et E) [87 ; 88 ; 89].

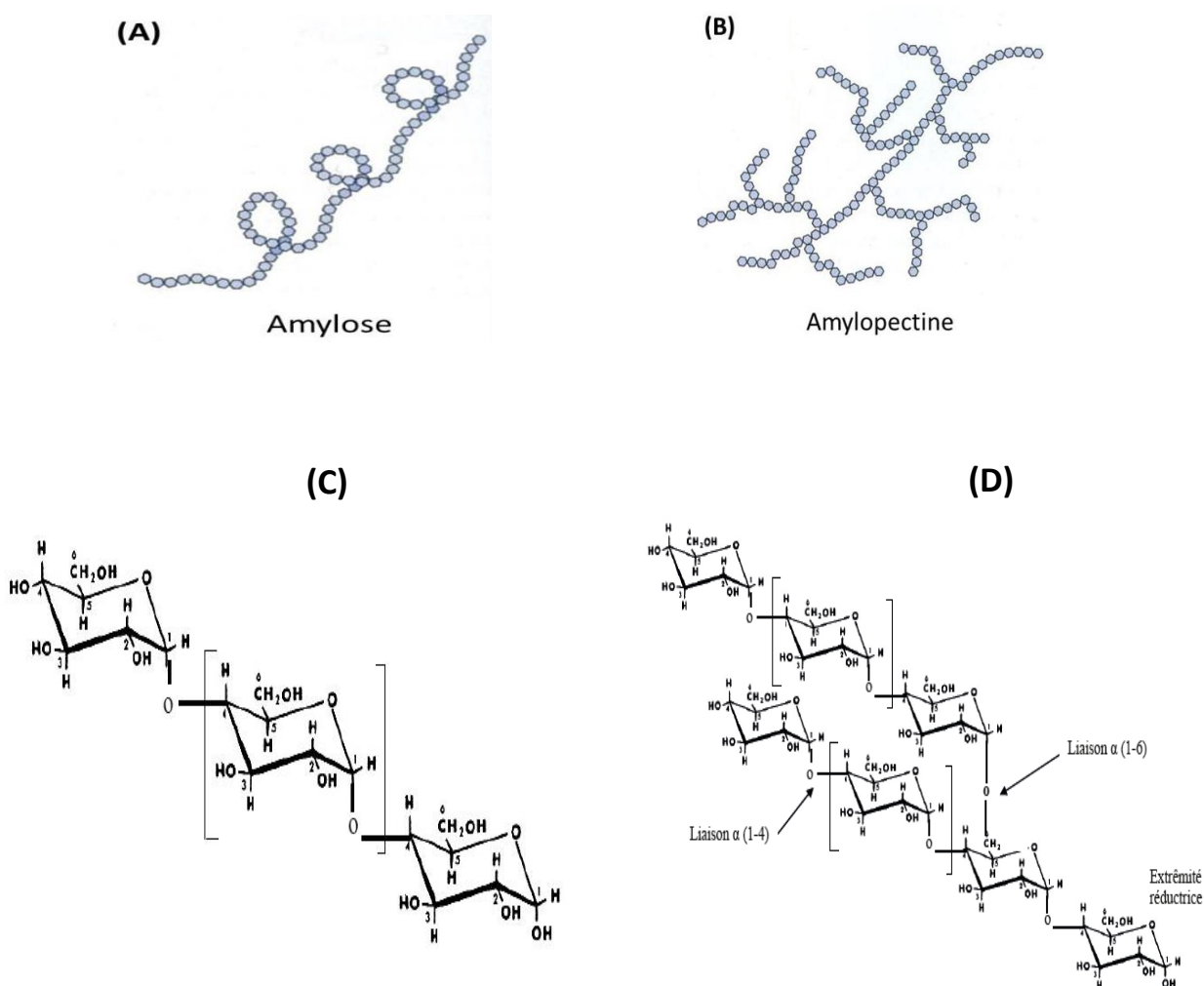


Figure 6: Représentation schématique de la structure de l'amylose en hélice (A) et la structure de l'amylopectine en arbre (B). Chaque rond bleu représente un résidu glucose [87]. Structure chimique de l'amylose (C) et de l'amylopectine (D) [88 ; 89].

4.1.2. Classification des amidons natifs

Les amidons natifs peuvent être classés en quatre groupes (A, B, C et V) selon leur diffractogramme (figure 7). Le type A est caractéristique des amidons de céréales (amidon de blé et de maïs cireux). Le type B se retrouve principalement dans des amidons de tubercules et de céréales riches en amylose. Le type C correspond aux amidons des légumineuses. Il s'agit d'un mélange des deux types cristallins A et B. Le type V est observé lors de la formation de complexes entre l'amylose et divers composés (iode, alcools, cyclohexane, acides gras...) [88 ; 90].

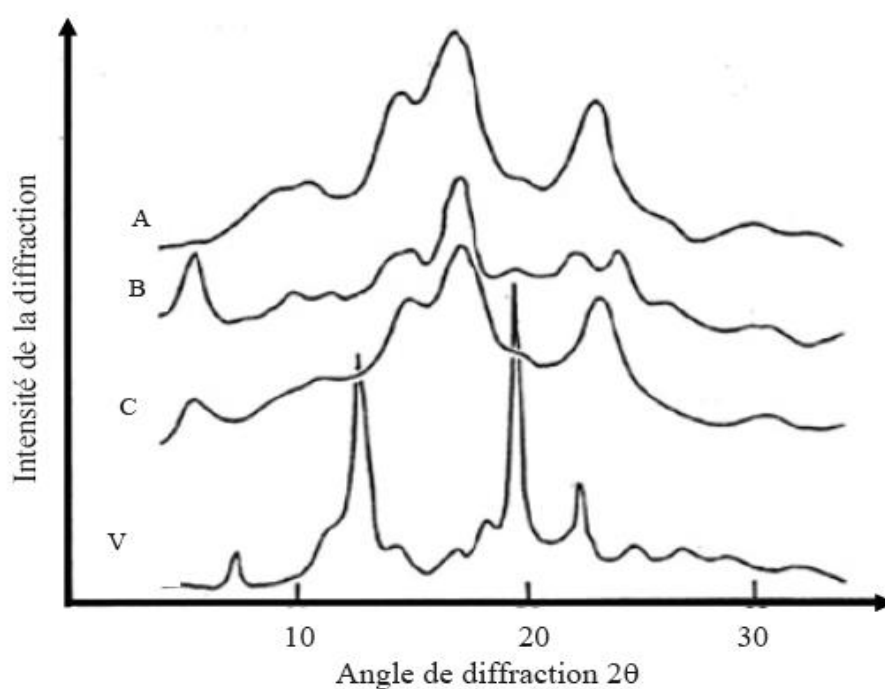


Figure 7 : Diagrammes de diffraction des rayons X des types cristallins A, B, C et V d'après Zobel [88 ; 91]

Les diffractogrammes des amidons du type A sont caractérisés par de grands pics autour de 15°, 17°, 18° et 23° tandis que ceux du type B ont de grands pics autour de 5° et 17° et de petits pics autour de 22° et 24° [88; 92 ; 93; 94].

L'allure du spectre de diffraction des rayons X de l'amidon dépend de la teneur en eau des grains au cours de la mesure. Plus l'amidon est hydraté, plus les raies du spectre s'affinent jusqu'à une certaine limite. L'eau fait donc partie intégrante de l'organisation cristalline de l'amidon [88].

4.1.3. Structure physique de l'amidon

L'amidon, après extraction à partir des organes de réserve des végétaux supérieurs et purification, se présente sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau froide. Cette poudre est constituée d'entités microscopiques de 2 à 100 μm de diamètre selon l'origine botanique, nommées grains d'amidon. Les grains d'amidon ont une structure sphéroïdique avec une orientation moyenne radiale de leurs deux constituants macromoléculaires majeurs : l'amylose et l'amylopectine.

Cette structure des grains d'amidon est faite de couches concentriques alternativement claires et sombres entourant un centre plus foncé appelé « hile » qui est le centre initial de croissance du grain (figures 8). Ces stries correspondent à une succession de zones dites « amorphes », peu résistantes à l'hydrolyse, et de zones présentant une structure semi-cristalline comportant une alternance de lamelles cristallines. Ces lamelles cristallines sont composées des chaînes courtes S (Shot) de Degré de Polymérisation (DP) d'environ 15, de l'amylopectine et de lamelles amorphes composées en majorité des points de jonction des macromolécules d'amylopectine et éventuellement d'amylose [95].

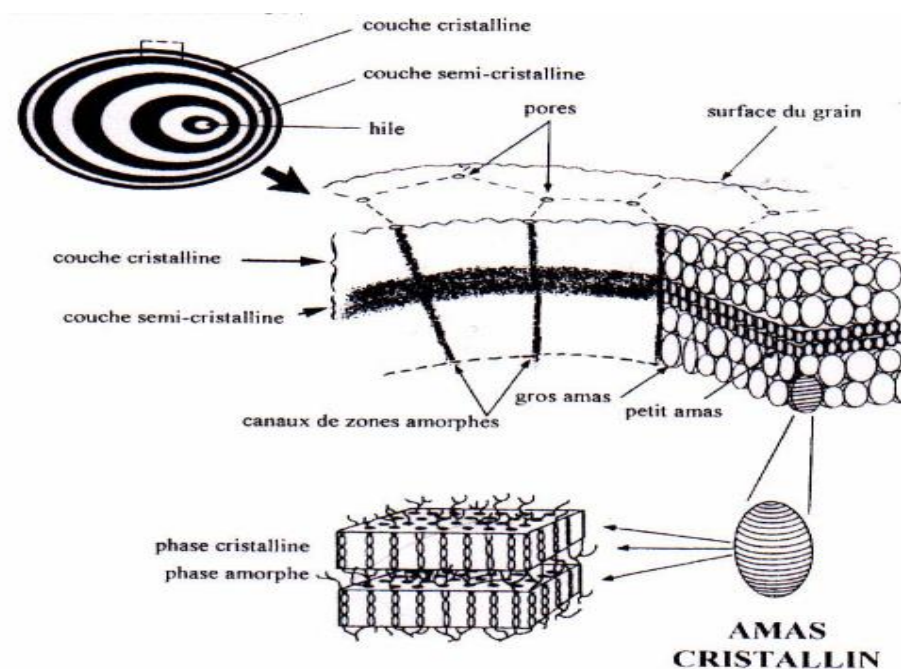


Figure 8: Schéma de la structure du grain d'amidon à différents niveaux d'organisation ; grain entier, alternance de zones cristallines et amorphes, structure des unités cristallines (*blocklet*) [92 ; 95].

L'empilement des lamelles cristallines et amorphes forme des ensembles appelés *blocklet* d'une taille comprise entre 300 et 500 nm qui s'assemblent pour constituer les couches cristallines (figure 8) [96].

La grosseur, la forme et la structure des grains varient selon l'origine botanique de l'amidon [92 ; 95]. En lumière polarisée, les granules d'amidon ont la forme d'une croix noire dite « croix de Malte ». Ce phénomène de biréfringence positive vient confirmer l'organisation semi-cristalline de ces granules. Les zones amorphes pourraient contenir des ensembles cristallins composés d'amylopectine de structure identique mais de taille réduite, de 50 à 70 nm [90 ; 98]. Ces ensembles dispersés dans l'amylose constituent avec les complexes amylose-lipides les parties dites « amorphes » du granule. Le développement limité des *blocklets* pourrait être lié à la présence de l'amylose [88 ; 96].

L'analyse par diffraction des rayons X (DRX) montre que l'amidon est un polymère semi-cristallin [88 ; 97].

4.1.4. Structure chimique de l'amidon natif [88 ; 98]

L'amidon est à 98-99% essentiellement un homopolymère de D-glucose dans sa conformation chaise la plus stable (⁴C₁), les groupements hydroxyles C2, C3, C4 et C6 étant en position équatoriale. Les unités monomériques de D-glucose sont liées majoritairement par des liaisons de type α -(1,4) (95-96%) et dans une moindre mesure par des liaisons de type α -(1,6) (4-5%). Chaque molécule possède en son extrémité C1 une fonction pseudo-aldéhydique réductrice. La fraction glucidique est un mélange de deux polymères aux structures primaires très différentes : l'amylose, macromolécule essentiellement linéaire (figure 6 A et C) et l'amylopectine, macromolécule ramifiée (figure 6 B et D).

Tableau 8 : Teneurs matière sèche (% MS) en amylose et en amylopectine d'amidons naturels [88 ; 99]

Source botanique	Amidon % MS	Amylose	Amylopectine
Pomme de terre	84	23	77
Manioc	80	20	80
Blé	70	28	72
Maïs	75	25	75
Maïs cireux*	75	0	100
Amylomaïs*	75	77	23
Petit pois mature		40	60
Banane	90	17	33

*obtenus par modifications génétiques

4.1.4.1. Amylose

L'amylose est un polymère essentiellement constitué d'unités de D-glucose liées par des liaisons de types α -(1,4), de poids moléculaire variant entre 200 000 et 800 000 Daltons. L'amylose contient en moyenne 500 à 6000 unités glucosyl en plusieurs chaînes (1 à 20) et d'un degré de polymérisation (DP) moyen de 500 [88 ; 100 ; 101]. Les variations dans la morphologie des cristaux de l'amylose dépendent non seulement de l'origine botanique mais aussi des conditions d'extraction. Elles sont responsables de plusieurs propriétés de l'amidon, notamment la synérèse et la rétrogradation [88].

4.1.4.1.1. Amyloses V et complexes d'inclusion

L'amylose est susceptible de complexer des petites molécules hydrophobes mais également les acides gras et les alcools. La gélatinisation de l'amidon en présence d'agents complexants permet à l'amylose de se réorganiser sous la forme de complexes cristallins de type V [102 ; 103].

4.1.4.1.2. Cristaux lamellaires de type allomorphiques V

Le terme générique V, V pour « Verklesterung » (re-précipitation), englobe ces différentes structures complexées. L'amylose se présente le plus souvent dans une conformation hélicoïdale de 6 résidus par tour, l'avancée par résidu étant de 0,13 nm [104]. Une cavité hydrophobe d'un diamètre de 0,45 nm est formée par l'arrangement des groupements (CH) hydrophobes vers l'intérieur et des groupements (OH) hydrophiles vers l'extérieur de l'hélice (figure 9). La structure cristalline la plus connue est le type V6. Elle est caractérisée par une maille orthorhombique ($a=1,365$ nm, $b=2,370$ nm, $c=0,805$ nm).

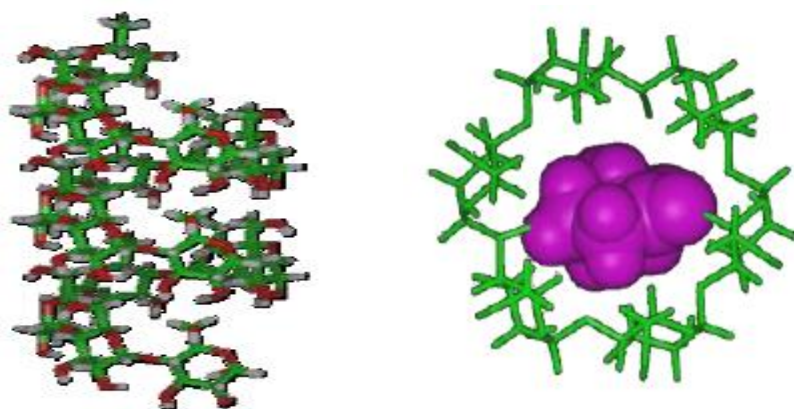


Figure 9 : Représentation schématique de la simple hélice d'amylose [105].

4.1.4.1.3. Complexes V_6

V signifie l'arrangement en simple hélice de l'amylose, 6 le nombre de résidus glucose par tour d'hélice. Les hélices sont séparées par un espace de volume variable où peuvent se loger les molécules complexantes, ce qui permet d'obtenir un classement en fonction de la poche inter-hélice I, II, III (figure 10 A). Trois grands types de structures ont été mis en évidence à partir d'amylose précipitée avec de l'éthanol, V_{6I} [106], du butanol, V_{6II} [107] et de l'isopropanol, V_{6III} [108]. Les complexes de type V_{6I} et V_{6III} ont également été mis en évidence par traitement haute pression (500 MPa) d'amidon de féverole et de manioc avec de l'acide décanoïque et du carvacrol [109]. Ces trois grands types de complexes cristallins V_{6I} , V_{6II} , V_{6III} présentent des spectres de diffraction des rayons X caractéristiques (figure 10 B).

Les complexes amylose-ligands peuvent également être mis en évidence par analyse enthalpique différentielle. Sur les thermogrammes figure un endotherme aux environs de 100°C (en excès d'eau) qui correspond à la fusion des complexes [110]. Ce pic endothermique correspond à l'effondrement de l'arrangement cristallin du complexe, mais aussi à la destruction de la simple hélice constitutive du composé d'inclusion. Ce qui explique la présence de ce même endotherme sur les thermogrammes des complexes amylose-lipides isolés sans arrangement cristallin (complexes amorphes).

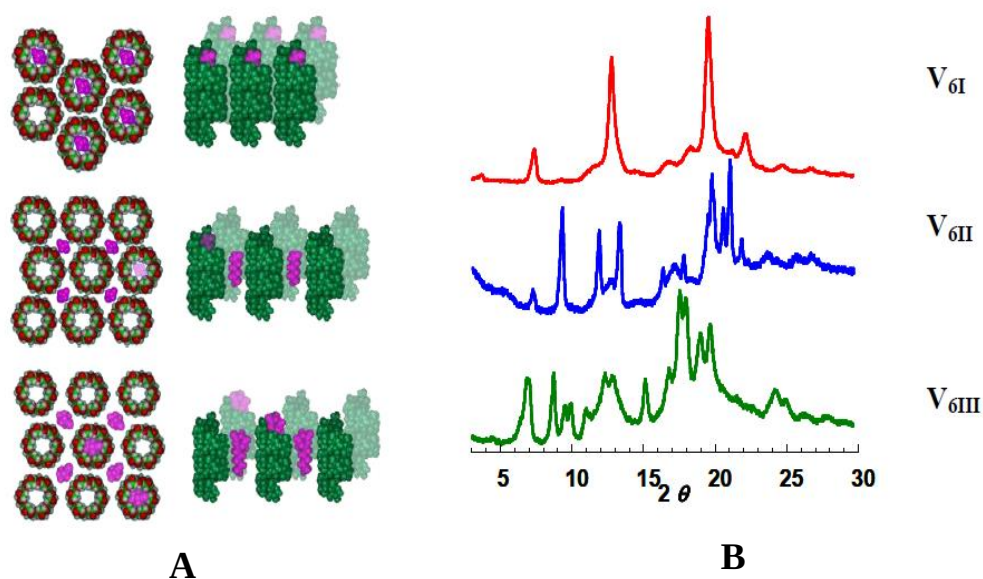


Figure 10 : Représentation schématique des lamelles cristallines des complexes amylose-ligand de type V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} avec les diagrammes de diffraction des rayons X [106].

4.1.4.2. Amylopectine

L'amylopectine est le principal constituant glucidique de l'amidon (70-80%). Il s'agit d'une macromolécule ramifiée où les unités de D-glucose sont principalement liées par des liaisons de types α -(1,4) et quelques liaisons de types α -(1,6) (figure 6 D et E). L'amylopectine est caractérisé par des masses moléculaires très élevées (10^7 à 10^8 Daltons) qui dépendent de l'origine botanique, du cultivar et des conditions physiologiques lors de la biosynthèse [88 ; 111]. Une distribution trimodale, au minimum, des chaînes constitutives d'amylopectine a été mise en évidence avec : des chaînes courtes (S, *short*) de DP moyen 15-20 ; des chaînes longues (L, *long*) de DP moyen 40-45 ; des chaînes de DP moyen supérieur à 60 [88 ; 112].

Les différences structurales dues à l'origine botanique portent essentiellement sur le rapport chaînes L / chaînes S qui est de l'ordre de 5, pour les amylopectines des tubercules, et de 8 à 10 pour les amylopectines des céréales [88 ; 113].

5. Traitement thermique de l'amidon

5.1. Comportement des granules d'amidon hydratés aux faibles températures

Le comportement de l'amidon en milieu hydraté dépend surtout de sa teneur en eau initiale. Les amidons sont traditionnellement commercialisés avec des teneurs en eau de 12 à 13% pour ceux des céréales, du manioc ou du pois, et 18 à 19% pour celui de la pomme de terre. L'amidon contient une quantité d'eau variable en équilibre avec l'humidité relative du milieu [88 ; 114]. Les quantités d'eau absorbées sont de l'ordre de 40 à 54%. Cette absorption s'accompagne d'un gonflement radial des granules. Pour l'amidon de maïs cireux, l'accroissement du diamètre des granules est de 80% et le volume est multiplié par 6. L'eau serait essentiellement absorbée par les parties dites « amorphes » du granule et le gonflement de ces zones provoquerait l'expansion radiale des granules. L'étude de la localisation de l'amylose dans le granule a amené [88 ; 115] Atkin *et al* à proposer le modèle présenté sur la figure 11 où le gonflement de la fraction amorphe est simulé pour des amidons à teneur croissante en amylose, soit 0% pour l'amidon du maïs cireux, 21% pour l'amidon de pomme de terre et 70% pour l'amidon de l'amylomaïs. De la figure 11, il ressort que le gonflement du granule est d'autant plus élevé qu'il contient plus d'amylose, du fait que l'eau est absorbée par la partie amorphe du granule dont la taille est étroitement liée à la teneur en amylose [88 ; 115].

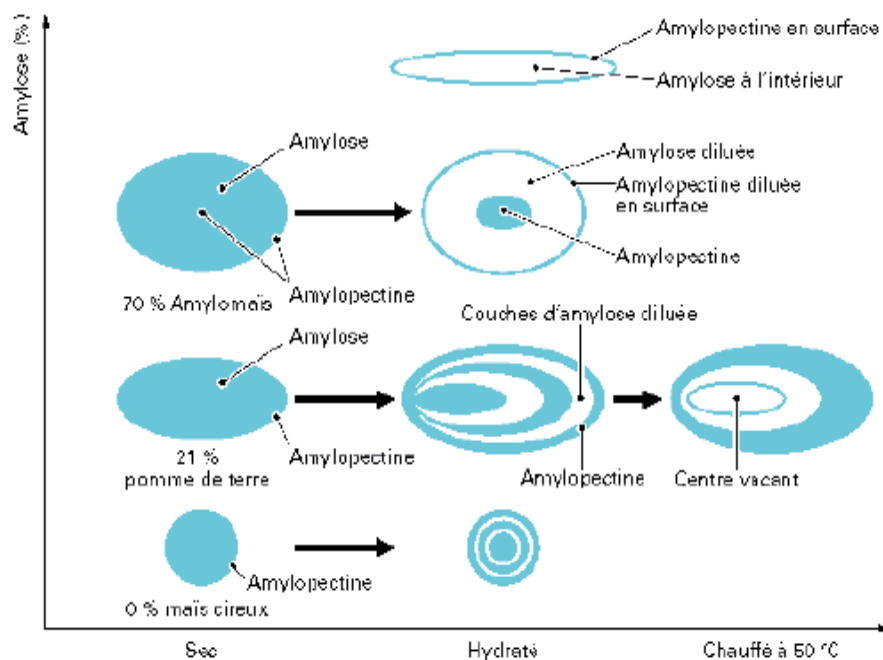


Figure 11 : Comportement des granules d'amidons à teneurs croissantes en amylose sous différents traitements [88 ; 112].

Le comportement des granules d'amidon varie en fonction de la température. A température ambiante, les grains d'amidon sont insolubles dans l'eau (dans la gamme de pH compris entre 3 et 10) et ne présentent qu'un faible intérêt technologique (gants chirurgicaux, coffrage en confiserie...), tandis qu'aux températures plus élevées (température de gélatinisation) l'amidon passe successivement par trois états : gonflé, gélatinisé et solubilisé (ou empois). Au cours du refroidissement l'amidon va donner un gel (figure 13) [116 ; 117].

5.2. La gélatinisation

La gélatinisation est la transformation la plus remarquable que subissent les amidons pendant leurs traitements thermiques en milieu aqueux. Elle est caractérisée par une série de processus de désorganisation structurale accompagnée d'infiltration d'eau [118].

5.2.1. Mécanisme de la gélatinisation

La gélatinisation commence au niveau du hile et se propage rapidement vers la périphérie et le granule gonfle. La gélatinisation se produit d'abord dans les régions amorphes, car les liaisons hydrogène sont affaiblies dans ces domaines [119]. Par ailleurs, il existe une température critique variable avec la structure de l'amidon ; au-dessus, la dispersion est irréversible ; en

dessous, elle est réversible [120]. Copeland et *al.* ont montré que la température de gélatinisation de la plupart des amidons, déterminée par calorimétrie différentielle à balayage, est comprise entre 60 et 80 °C [121]. Le tableau suivant regroupe les températures de gélatinisation de l'amidon selon l'origine botanique.

Tableau 9 : Température de gélatinisation de l'amidon selon l'origine botanique [99]

Origine botanique de l'amidon	Plage de gélatinisation °C
Maïs	60-72
Blé	60-65
Manioc	52-64
Pomme de terre	58-66
Sorgho	68-75

La microstructure des empois d'amidons a été observée par microscopie électronique à balayage. A la même température de cuisson, les amidons de différentes sources botaniques présentent différentes microstructures (figure 12) [122].

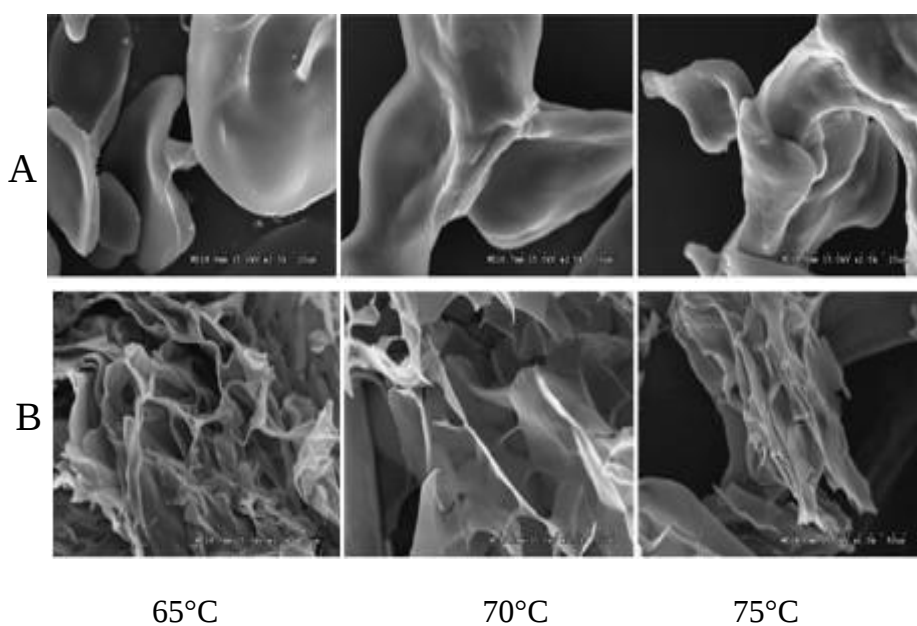


Figure 12 : Images MEB des empois d'amidons de : blé (A), pomme de terre (B) [122].

Du point de vue macroscopique, le chauffage se traduit par la modification de la viscosité et de la texture des empois d'amidon [123 ; 124]. Il est important de noter que la gélatinisation de l'amidon par cuisson le rend plus soluble et beaucoup plus digestible par les enzymes

amylolytiques [99], car une action enzymatique est plus facile en milieu homogène qu'en présence de deux phases [125].

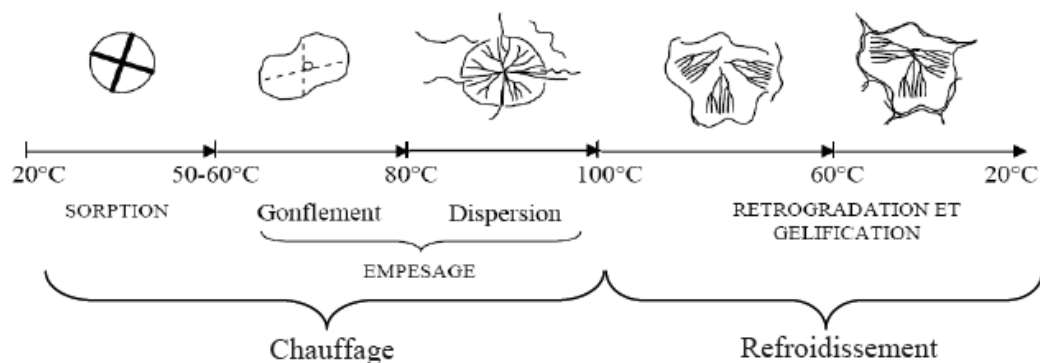


Figure 13 : Différents états du grain d'amidon placé en présence d'un excès d'eau et soumis au chauffage-refroidissement [88 ; 126].

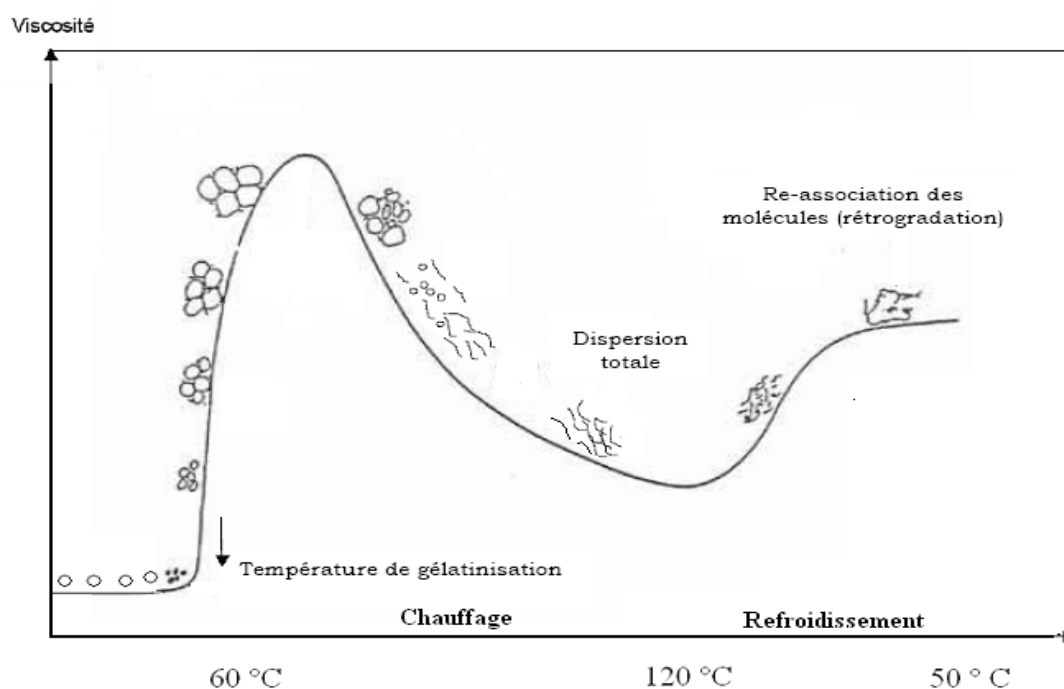


Figure 14 : Courbe de transformation hydrothermique d'un grain d'amidon lors de la cuisson et du refroidissement [112].

5.3. Rétrogradation et gélification

La rétrogradation désigne les réorganisations structurales (ou recristallisation) qui s'opèrent lors du refroidissement d'une dispersion d'amidon déstructuré lorsque la température de

traitement est supérieure à la température de transition vitreuse (T_g). Ces solutions d'amidon obtenues à la suite d'un traitement thermique aux environs de 100°C en présence d'un excès d'eau sont instables à la température ambiante. Au cours du refroidissement, les macromolécules se réorganisent, ce qui donne lieu au phénomène de rétrogradation (figure 13 et 14).

La gélification de l'amidon est un phénomène essentiellement initié par un abaissement de température, induisant elle-même une diminution de solubilité des polymères. Les gels ainsi obtenus sont des structures poreuses [88 ; 127].

5.3.1. Les mécanismes de rétrogradation et de gélification

La formation d'un gel d'amidon s'effectue en deux étapes d'après Miles, Morris et Ring [88 ; 128]. Il y a d'abord une séparation de phases de type polymère-polymère et polymère-eau qui a lieu à des températures inférieures à 90°C. Elle résulte d'une part de l'incompatibilité de l'amylose et de l'amylopectine en solutions très concentrées (concentration $\geq 3\%$ P/V), et d'autre part d'une interaction défavorable des polymères avec l'eau. La deuxième étape consiste en une réorganisation des portions de chaînes linéaires d'amylose ou de grappes de chaînes d'amylopectine. Il s'agit de la recristallisation ou rétrogradation proprement dite.

Cette réorganisation se caractérise d'abord par une transition du type pelote statistique au niveau de la double hélice des segments de chaînes polymères et ensuite par une cristallisation par empilement de chaînes [88 ; 116]. Les gels sont donc formés de deux phases de plus de 70% du même polymère. La composition de chacune des deux phases dépend principalement du degré de gélatinisation et du rapport amylose/amylopectine dans le grain d'amidon [97 ; 115 ; 129].

6. Les amidons modifiés et leurs propriétés

Les amidons modifiés sont des amidons natifs qui ont été modifiés, soit chimiquement, soit physiquement afin d'améliorer leurs propriétés fonctionnelles (viscosité, apparence et morphologie, résistance aux enzymes, etc.) pour un usage spécifique. Les modifications chimiques peuvent se faire avec diminution ou augmentation de la masse molaire, et ce par hydrolyse ou désestérification, par stabilisation en introduisant des groupements chimiques à la place des fonctions hydroxyles et par fonctionalisation en greffant des groupements hydrophobes [97 ; 130]. Les modifications physiques découlent de réarrangements moléculaires ou de la cristallisation de l'amidon dans des conditions d'humidité relative et de température entre les températures de transition vitreuse et de fusion : ce sont l'annealing et le Heat Moisture

Treatment (HMT) [97 ; 130]. Suite à ces traitements thermiques, les amidons présentent des températures de gélatinisation plus élevées (2 à 5 °C par rapport à l'amidon natif) et un gonflement moins important. Des amidons modifiés résistant à l'alpha-amylase sont utilisés dans les formulations alimentaires diététiques telles que les cookies ou les muffins. De plus, les amidons modifiés ont servi de matrice d'encapsulation d'arômes tels que l'oléorésine [130 ; 131], le cumin [130 ; 132] et les arômes de poulet rôti (benzaldéhyde, dimethyltrisulfure, acide 2-mercaptopropionique et benzothiazole) [132 ; 133].

7. Choix de la technique et du matériau d'encapsulation

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé le procédé de lyophilisation pour encapsuler le tyrosol et les composés phénoliques du grignon d'olive. Il s'agit de la technique la plus appropriée pour l'encapsulation des molécules thermosensibles dans une solution aqueuse [47]. Elle permet une conservation à long-terme grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit. La plupart des propriétés initiales de la matière première, telles que la forme, les dimensions, l'apparence, le goût, la couleur, la saveur, la texture et l'activité biologique sont conservées [134]. L'amidon de pomme de terre a été choisi comme matériau de revêtement dans l'encapsulation du tyrosol et des composés phénoliques, parce qu'il est bon marché, non allergène et sans saveur.

Matériels Et Méthodes

1. Matériels

Produits : amidon de pomme de terre (CAS 9005-25-8 ; pH 5.0-7.5), tyrosol (2-(4-hydroxyphenyl) éthanol, 98%), acide gallique (98%), eau distillée, α -amylase de pancréas de porc proviennent de Sigma-Aldrich, eau pour HPLC de VRW CHEMICAL, éthanol absolu anhydre de CARLO ERBA, solution tampon (potassium dihydrogen phosphate, pH 7) de Certipur, poudre de grignon d'olive de GRAP SUD.

2. Méthodes

2.1. Gélatinisation de l'amidon de pomme de terre par chauffage conventionnel (chauffage par conduction) et chauffage sous micro-ondes

2.1.1. Chauffage par conduction

a) Principe

Le processus de transfert de chaleur par conduction s'appuie sur un milieu matériel sans mouvement de matière et est dû à des phénomènes physiques microscopiques (agitation des atomes ou des molécules, flux d'électrons libres...). Il peut être vu comme un transfert d'énergie des particules les plus énergétiques (les particules chaudes qui ont une énergie de vibration élevée) vers les particules les moins énergétiques (les particules froides d'énergie de vibration moins élevée), dû aux collisions entre particules. Dans les solides, le transfert d'énergie peut également se produire sous l'effet du déplacement d'électrons libres dans le réseau cristallin (par exemple pour les métaux). Ainsi les bons conducteurs d'électricité sont en général également de bons conducteurs de la chaleur [135].

b) Protocole

1g d'amidon est introduit dans un ballon de capacité 100 mL avec 10 mL d'eau distillée, équipé d'une sonde de température (figure 15). Le ballon est déposé dans un cristallisateur métallique rempli à moitié de sable bien sec, chauffé sur plaque chauffante (Plaque Chauffante Stuart US152 avec Agitateur et Thermomètre à contact avec sonde, Stuart® SCT1). L'amidon chauffé passe d'un aspect trouble de coloration blanc laiteux entre 20 et 45°C, à transparent entre 40 et 75°C. Lors du chauffage, la température est relevée toutes les 5 min. L'amidon est ainsi chauffé, jusqu'à 100°C.

L'amidon est par la suite refroidi à température ambiante, toujours en relevant la température afin d'observer le phénomène de rétrogradation, qui se manifeste par un aspect trouble et gélatineux de l'amidon. La cinétique correspondant aux phases de gélatinisation et de

rétrogradation de l'amidon de pomme de terre par chauffage conventionnel est représentée en figure 16.



Figure 15 : Système de chauffage par conduction thermique de l'amidon de pomme de terre.

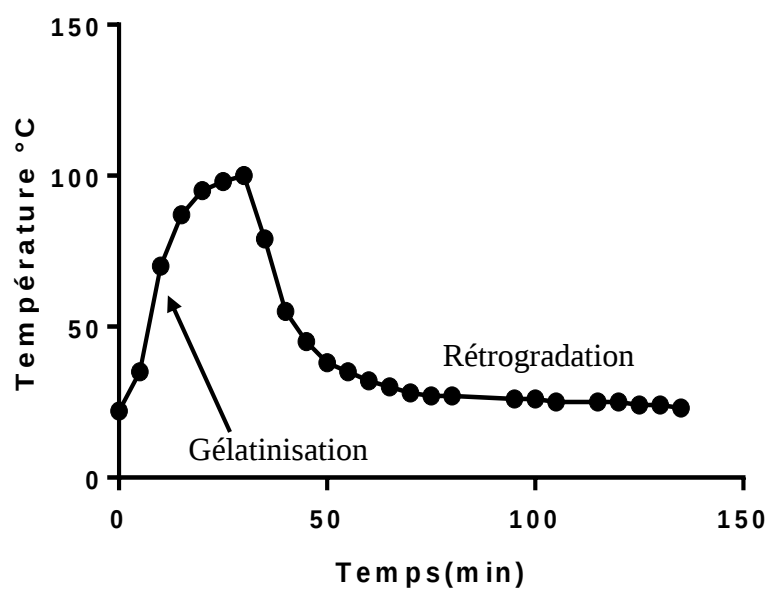


Figure 16 : Cinétique de gélatinisation - rétrogradation de l'amidon de pomme de terre lors d'un chauffage par conduction.

2.1.2. Chauffage sous micro-ondes

a) Principe

Le chauffage par micro-ondes se fait par interactions de la composante électrique de l'onde électromagnétique avec les molécules. Il procède par un mécanisme de polarisation dipolaire des molécules présentant un moment dipolaire différent de zéro (exemple : eau et autres solvants polaires, acides) ou par conduction ionique des ions en phase liquide ou incrustés dans les interstices. Ce phénomène est lié au déplacement des charges positives et négatives sous l'influence du champ électrique. L'ensemble des molécules tend à s'orienter en fonction des lignes de champ et sont de ce fait soumises à des rotations et vibrations. Le dégagement de chaleur à l'intérieur du matériau résulte de la friction ainsi produite. Par rapport au chauffage classique, l'échauffement du milieu se traduit par un dégagement instantané de chaleur au cœur de la masse et la répartition finale de température est plus régulière [136].

b) Protocole

1g d'amidon est introduit dans un ballon de capacité 100 mL avec 10 mL d'eau distillée puis dans le four à micro-ondes (Daewoo-KOG-1N4A), l'amidon est chauffé pendant 1.5 min à une puissance de 800 W. La température est prise à l'aide d'un thermomètre numérique (Hanna InstrumentsTM Thermomètres numériques Checktemp), toutes les 10 s. La température maximale (100°C) est obtenue au bout de 1.5 min de chauffage. La figure 17 représente la courbe de gélatinisation de l'amidon de pomme de terre sous chauffage micro-ondes.

L'intérêt du chauffage sous micro-ondes réside dans la réduction considérable du temps de gélatinisation de l'amidon 1.5 min vs. 45min sous chauffage conventionnel.

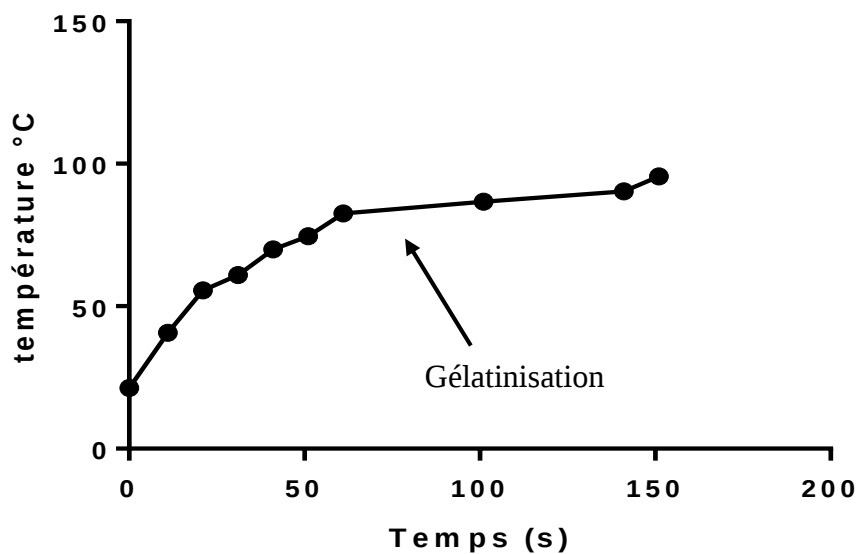


Figure 17 : Cinétique de gélatinisation de l'amidon de pomme de terre lors d'un chauffage sous micro-ondes.

3. Encapsulation du tyrosol dans l'amidon de pomme de terre

3.1. Structure chimique du tyrosol

Le tyrosol, également connu sous le nom de 2-(4-hydroxyphényl) éthanol ou 4-(2-hydroxyéthyl) phénol, est l'un des phénols les plus simples trouvés dans l'huile d'olive, ainsi que dans ses déchets (margines et grignon) [137]. Le tyrosol a été choisi comme phénol modèle dans notre étude, car il est facile à manipuler, soluble dans l'eau, résistant à la chaleur et peu couteux (par rapport à l'hydroxytyrosol).

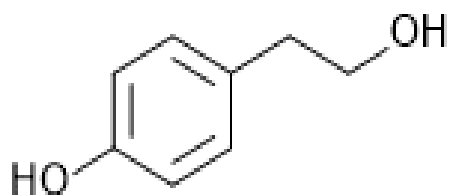


Figure 18 : Structure chimique du tyrosol (2-(4-hydroxyphenyl) éthanol)

3.2. Chauffage par conduction

a) Protocole

1g d'amidon est gélatinisé par chauffage conventionnel, comme précédemment décrit. Après que la température ait atteint sa valeur maximale (100°), elle est rapidement ramenée à 75°C. Parallèlement, 0,1 g de tyrosol est dissous dans 5 mL d'eau distillée puis la solution est ajoutée à l'amidon maintenu sous agitation à 75°C. Le complexe amidon/tyrosol est maintenu sous agitation à 75°C pendant 1h30, puis refroidi à température ambiante.

3.3. Lyophilisation

Le ballon contenant le complexe amidon/tyrosol est d'abord immergé dans de l'azote liquide (-196°C) jusqu'à congélation complète (5 à 10 min), puis mis au lyophilisateur pendant 24h (Cryotec, gamme cosmos) dont la température est préalablement fixée à -80°C et la pression à 40 mtorr. Les lyophilisats obtenus sont broyés à l'aide d'un moulin à café (Bosch Noir série MKM6003) puis conservés dans un dessiccateur jusqu'à leur utilisation. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata.

3.4. Chauffage sous micro-ondes

a) Protocole

1g d'amidon est gélatinisé par chauffage sous micro-ondes pendant 1.5 min. Ensuite le ballon est immédiatement transféré dans un bain de sable dont la température est maintenue à 75°C. La solution de tyrosol (0,1 g dans 5 mL) est ajoutée à l'amidon gélatinisé maintenu sous agitation et à 75°C. Le complexe est agité pendant 1h30 puis refroidi à température ambiante. La lyophilisation est réalisée de la même façon que précédemment. Les expériences ont été réalisées en triplicata. La figure 19 représente le lyophilisat amidon/tyrosol après 24h de lyophilisation.

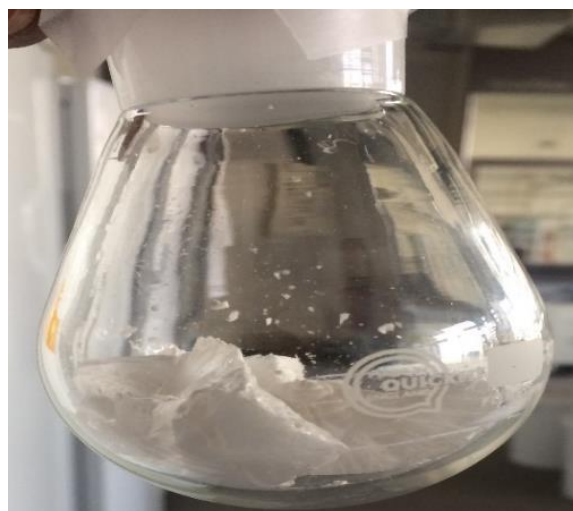


Figure 19 : Complexe amidon/tyrosol obtenu après 24h de lyophilisation

3.5. Rendement brut

Le rendement brut est le rapport entre la masse finale du complexe amidon/tyrosol après lyophilisation et la masse totale de matière (amidon + tyrosol) engagée dans la préparation.

$$Rdt(\%) = \frac{m(\text{amidon/tyrosol})}{m_{\text{initiale}}(\text{amidon/tyrosol})} \times 100$$

3.6. Caractérisation des poudres (chauffage conventionnel et chauffage sous micro-ondes)

La caractérisation des lyophilisats a été effectuée selon le protocole de Robert et al. [55] avec quelques modifications.

3.6.1. Rinçage à l'éthanol

Cette opération a pour but d'éliminer le tyrosol simplement adsorbé (faiblement lié) à la surface de la matrice d'amidon et qui peut donc être considéré comme non-encapsulé. Cinquante mg de lyophilisat sont dispersés dans 2 mL d'éthanol, puis le mélange est centrifugé au vortex (BioCote SA8, Stuart) pendant 2 min et filtré sur PTFE 0,45 μm . La solution obtenue est conservée à 4°C. L'expérience a été reproduite trois fois.

3.6.2. Hydrolyse acide de l'amidon

Cette opération a pour but de libérer la totalité du tyrosol, qu'il soit encapsulé ou non. Vingt-cinq mg de lyophilisat sont dispersés dans 2 mL d'acide chlorhydrique 6M, puis le mélange est centrifugé au vortex (BioCote SA8, Stuart) pendant 2 min et filtré sur un PTFE 0,45 µm. La solution obtenue est conservée à 4°C. L'expérience a été reproduite trois fois.

Les filtrats obtenus dans ces deux étapes (rinçage et hydrolyse) sont analysés par spectroscopie UV-visible (Agilent 8453 UV-Visible spectrophotometer) afin de doser le tyrosol. Auparavant, une courbe d'étalonnage est réalisée à partir du tyrosol. A partir d'une solution de 13,7 mg de tyrosol dans 1,5 mL d'eau distillée, une gamme de concentrations de 1.6×10^{-4} à 8.6×10^{-4} M est préparée. Les spectres UV-visible sont enregistrés et l'absorbance à 275 nm est tracée en fonction de la concentration de tyrosol (Annexe1).

3.7. Détermination de l'efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation est par définition le pourcentage de la masse de substance encapsulée par rapport à la masse de substance introduite initialement.

Elle a été calculée selon la formule suivante :

$$EE (\%) = \frac{m(\text{tyrosol total}) - m(\text{tyrosol surface})}{m(\text{tyrosol total})} \times 100$$

3.8. Analyse au Microscope Electronique à Balayage (MEB) équipé de sondes EDS (Energy Dispersive Spectroscopy)

L'observation des lyophilisats du complexe amidon/tyrosol au microscope électronique à balayage (MEB) a été effectuée au centre de microscopie électronique de la Faculté des Sciences de l'Université Mohamed V, Rabat Agdal.

a) Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais) est une technique basée sur le principe des interactions électrons-matière, capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon pouvant atteindre quelques nanomètres d'épaisseur. La MEB consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser, qui en réponse réémet un spectre de particules : électrons

secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons Auger et rayons X. Ces différentes particules apportent différents types d'information sur la matière dont est constitué l'échantillon :

- ❖ Les électrons secondaires permettent d'obtenir des renseignements sur la topographie de l'échantillon.
- ❖ Les électrons rétrodiffusés sont responsables du contraste de phase et permettent de mesurer l'homogénéité chimique de l'échantillon.
- ❖ Les électrons Auger et les rayons X permettent d'obtenir des informations sur la nature chimique de l'échantillon.

La spectroscopie par dispersion en énergie des rayons X (EDX ou EDS) donne une information qualitative (identification des éléments présents dans le matériau) ou semi-quantitative sur le contenu chimique. Cette technique est basée sur l'analyse du rayonnement émis lors de la désexcitation des molécules. Chaque longueur d'onde des photons émis est caractéristique d'une transition électronique et donc d'une espèce chimique. Il est également possible d'accéder à la localisation des différents éléments au sein du matériau (cartographies). Les résultats sont exprimés sous forme de spectres d'énergie en rayonnement X. Les logiciels informatiques qui gèrent l'acquisition des données permettent également la déconvolution des différentes raies observées.

b) Protocole

Les lyophilisats ont été analysés à l'aide du microscope électronique à balayage JSM-it 100 constitué de trois parties :

- l'unité centrale (figure 20) qui contient la partie électronique, la chambre à échantillon et la colonne électronique.
- la pompe à rotation (figure 21 A) branchée à l'unité centrale pour créer le vide au niveau de la colonne électronique et de la chambre à échantillon.
- la partie informatique (figure 21 B) qui contient un moniteur pour traiter les signaux provenant du détecteur EDS et un ordinateur équipé du logiciel Intouch qui pilote l'appareil.



Figure 20 : Unité centrale du MEB



A



B

Figure 21 : (A) Pompe à rotation ; (B) Partie informatique

Les échantillons ont été fixés sur le porte-échantillon à l'aide d'un autocollant puis placés dans la chambre du MEB. Les paramètres d'analyse sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 10 : Conditions d'analyse MEB

Mode imagerie	Tension d'accélération	Distance e- /surface Ech	Spot size	Pression	grossissement
MEB	20 KV	11 mm	30	HV	25000

❖ EDX ou EDS

A l'aide de l'analyse EDS, on peut déterminer la nature des éléments chimiques de la surface de l'échantillon mais aussi effectuer une analyse quantitative pour déterminer le pourcentage massique et atomique de chaque élément chimique à la surface de l'échantillon.

Ainsi, la composition chimique de surface des différents échantillons est représentée sur les spectres correspondant aux figures (chauffage conventionnel et chauffage sous micro-ondes).

3.9. Relargage du tyrosol par digestion enzymatique

3.9.1. Encapsulation et relargage contrôlé

L'un des aspects les plus importants dans l'encapsulation est le contrôle du relargage des composés encapsulés. Quand les produits encapsulés sont des composés thérapeutiques ou nutraceutiques sensibles, le vecteur ou la matrice doit permettre de les protéger contre la dégradation mais doit pouvoir aussi les transporter et les libérer sur des cibles particulières afin d'optimiser leur biodisponibilité et leur efficacité. La matrice d'encapsulation doit donc fournir une barrière contre la diffusion et la fuite des composés bioactifs vectorisés et doit empêcher l'accès des enzymes digestives à ces composés [130 ; 138].

La libération contrôlée du tyrosol a été réalisée selon le protocole utilisé par Guaquere-Parker et al. [139] avec une légère modification.

3.9.2. Procédure expérimentale

Une solution d'alpha-amylase de pancréas de porc (Sigma-Aldrich), de concentration 13 mg/L, a été préparée dans de l'eau pour analyse HPLC, puis stockée au réfrigérateur avant tout usage.

3.9.3. Expérience de contrôle

Quatre-vingt-dix mg de lyophilisat sont placés dans un bécher de capacité 125 mL puis 90 mL d'eau et 10 mL de tampon phosphate (Certipur®, Supelco®, pH 7) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ensuite placé dans un bain-marie à température contrôlée (24°C ou 37°C). Toutes les 10 min un prélèvement est effectué pendant 1h. La lecture de l'absorbance à 275 nm est effectuée au spectrophotomètre UV-visible.

3.9.4. Hydrolyse enzymatique

Quatre-vingt-dix mg de lyophilisat sont placés dans un bécher de capacité 125 ml, puis 85 mL d'eau, 5 mL de solution d'alpha-amylase (préparée comme décrit ci-dessus) et 10 mL de tampon à pH 7 sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ensuite placé dans un bain-marie à température

contrôlée (24°C ou 37°C) et toutes les 10 min un prélèvement est effectué pendant 1h. La lecture de l'absorbance à 275 nm est effectuée au spectrophotomètre UV-visible (figure 26 A et B).

4. Encapsulation des biophénols du grignon d'olive

4.1. Description du Grignon d'olive [140]

L'extrait d'olive fabriqué par GRAP'SUD et standardisé en composés phénoliques provient d'olives des moulins environnants en plein cœur du département du Gard. Il présente des teneurs garanties en tyrosol et hydroxytyrosol voir fiche technique (Annexe 9).

Les phénols d'olive Olivex® sont principalement utilisés pour les applications suivantes : compléments alimentaires, alimentation fonctionnelle, cosmétique.



Figure 22 : Poudre de grignon utilisé dans l'encapsulation des biophénols par l'amidon de pomme de terre (<http://www.grapsud.com>) [140]

4.2. Caractérisation du grignon d'olive

Avant encapsulation de ses composés phénoliques, le grignon d'olive (GRAP'SUD) a d'abord été caractérisé : 100 mg de poudre de grignon sont dissous dans un mélange eau/éthanol (80/20 v/v) soit 3mL d'eau et 2mL d'éthanol. (Annexe 3-7)

L'analyse chromatographique liquide ultra-performante (UPLC) a été réalisée au sein de l'UMR SQPOV Avignon Université - INRAE. Il s'agit d'un système ACQUITY UPLC® (Waters Corp., Milford, MA, USA) relié simultanément à un détecteur à barrettes de diodes 190–800 nm (UPLC DAD, Waters, Milford, MA, USA) et à spectromètre de masse Bruker Daltonics HCT Ultra Ion Trap MS équipé d'une source d'ions de type electrospray (UPLC DAD / ESI-MSn).

Une colonne *ACQUITY UPLC® BEH C18* (50 mm x 2,1 mm, i.d, 1,7 µm ; Waters Corp., Milford, MA, USA) est utilisée dans la séparation des composés phénoliques. Le piège à ions fonctionne en mode Ultra Scan de m/z 100 à 800. La cible ICC a été fixée à 100 000 avec un temps d'accumulation maximal de 50 ms. De l'azote (99,99%) a été utilisé comme gaz de désolvatation. L'ionisation a été réalisée en utilisant une source ESI en mode négatif. Les paramètres de la source d'ionisation ont été réglés comme suit : température sèche 365°C, pression du nébuliseur 50 psi, débit de gaz sec 9 L min⁻¹, tension capillaire -2 kV. Les pics chromatographiques ont été identifiés à l'aide d'étalons du commerce (standards) préalablement injectés (Annexe 3-8). La quantification a été réalisée par intégration des pics dans le chromatogramme DAD. En l'absence de standard authentique, la concentration du composé est exprimée en équivalent standard.

Les conditions d'injection sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Conditions d'analyse UPLC-DAD

Eluants	% A dans gradient	Durée (min)	Débit (mL/min)	T °C colonne	Volume d'injection (µL)
A : 0,1% HCO ₂ H dans H ₂ O	99 - 80	0 - 10	0,3	35	5
	80 - 70	10 - 12,5			
B : MeCN	70 - 0	12,5 - 13,5			

4.3. Pre-traitement par pétrissage (kneading)

L'insolubilité du grignon d'olive dans l'eau nous a amenés à recourir à la technique de kneading ou pétrissage, qui est aussi une technique d'encapsulation dont le principe consiste à mélanger le matériau d'encapsulation, en occurrence l'amidon et l'extrait, avec de petites quantités d'éthanol ou d'eau à l'aide d'un mélangeur [141 ; 142]. C'est une méthode qui convient aux composés peu solubles dans l'eau puisque les composés se dissolvent lentement en formant des complexes d'inclusion [141 ; 143]. La technique de kneading est couramment utilisée pour l'encapsulation des composés thermosensibles car elle ne nécessite pas de chauffage [141 ; 144 ; 145].

Protocole

1g d'amidon est introduit dans un ballon de capacité 50 mL avec 100 mg de poudre de grignon, un petit volume d'eau est ajouté au mélange sec, de telle sorte à obtenir une pâte avec une texture fluide. L'ensemble est mélangé pendant 2h30 à l'évaporateur rotatif (LABOROTA 4001

Heidolph, 30 trs / min) sans chauffage. A la fin du pétrissage, le volume d'eau est complété à 15 mL et le mélange amidon / poudre de grignon est ensuite chauffé sous micro-ondes pendant 1.5 min sous une puissance de 800 W. Le ballon est ensuite transféré dans un bain de sable préchauffé à 75°C. Le mélange amidon/poudre de grignon est maintenu sous chauffage et sous agitation pendant 1h30.

L'étape de lyophilisation est similaire à celle du complexe amidon/tyrosol. Le dosage des composés phénoliques, ainsi que leur identification dans les fractions rincée et hydrolysée, ont été réalisés par UPLC-DAD-MS selon les conditions décrites précédemment. L'efficacité d'encapsulation a été déterminée selon la formule utilisée dans le cas du complexe amidon/tyrosol. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicatas.

L'analyse morphologique des lyophilisats amidon/phénols, ainsi que la poudre de grignon avant encapsulation (poudre de grignon de départ), a été également réalisée au microscope électronique à balayage équipé de sondes EDS, selon le même protocole d'analyse que les lyophilisats du complexe amidon/tyrosol.

Resultats Et Discussion

1. Gélatinisation de l'amidon de pomme de terre par chauffage conventionnel et par chauffage sous micro-ondes

1.1. Chauffage par conduction

La gélatinisation de l'amidon par chauffage conventionnel a été efficace mais a pris énormément de temps. Environ 45 min de chauffage ont été nécessaires avant l'observation de la phase de gélatinisation de l'amidon.

1.2. Chauffage sous micro-ondes

Ce type de chauffage est très utilisé car la durée du procédé est réduite, ce qui a été observé dans notre étude. Le temps de gélatinisation de l'amidon sous micro-ondes (1.5 min) est environ 30 fois plus court que par chauffage conventionnel.

2. Encapsulation du tyrosol

2.1. Rendement et efficacité d'encapsulation

2.1.1. Rendement brut

Le rendement brut concerne la quantité de poudre qu'il est possible de récupérer par rapport à la matière première initiale utilisée (amidon + tyrosol). Les rendements obtenus lors de la formation des complexes sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12 : Rendement brut de récupération du complexe tyrosol - amidon

Type de chauffage	Masse totale initiale (g) a)	Masse du lyophilisat (g)	Rendement brut (%)
Conventionnel	$1,150 \pm 0,034$	$1,008 \pm 0,033$	$86,96 \pm 0,07$
Micro-ondes	$1,125 \pm 0,151$	$0,854 \pm 0,048$	$75,89 \pm 0,14$

a) Amidon + tyrosol

Ses résultats sont satisfaisants, toutefois on note une différence de rendement d'environ 10% entre le chauffage conventionnel et le chauffage sous micro-ondes qui peut être expliquée par le fait que le protocole sous micro-ondes implique plus de manipulation (voir partie expérimentale).

2.1.2. Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation du tyrosol correspond au pourcentage de tyrosol réellement incorporé dans la matrice d'amidon (et non simplement adsorbé). Les résultats obtenus dans le cas des deux types de chauffage sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Efficacité d'encapsulation (rapport massique tyrosol/amidon = 1:10)

Type de chauffage	tyrosol total a)	tyrosol de surface b)	Tyrosol encapsulé c)	EE (%) d)
Conventionnel	0,83 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,40 ± 0,04	48,2 ± 0,2
Micro-ondes	0,70 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,53 ± 0,05	75,7 ± 0,3

a) quantifié après hydrolyse acide du lyophilisat (en $\mu\text{mol/g}$ lyophilisat), b) quantifié dans la fraction éthanolique de lavage du lyophilisat (en $\mu\text{mol/g}$ lyophilisat), c) tyrosol total – tyrosol de surface (en $\mu\text{mol/g}$ lyophilisat), d) tyrosol encapsulé / tyrosol total (en %).

On note que l'efficacité d'encapsulation dans le cas du chauffage sous micro-ondes est supérieure à celle obtenue sous chauffage conventionnel, ce qui peut être expliqué par une meilleure gélatinisation de l'amidon sous chauffage micro-ondes. En effet, la gélatinisation est la phase qui correspond au « désenroulement » de la double hélice d'amylose, une étape critique dans la formation des complexes d'inclusion (ou complexe de type V) avec les composés bioactifs le plus souvent de petites tailles et hydrophobes.

Ainsi, le chauffage sous micro-ondes est retenu dans la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre pour encapsuler les composés phénoliques du grignon d'olive par la technique de lyophilisation.

Pour comparaison, voici quelques valeurs d'efficacité d'encapsulation de la littérature :

- acide gallique + amidon de pomme de terre (à faible teneur en dextrose, modifié à l'acide) : 65 - 79% par lyophilisation, 70 - 84% par atomisation [146],
- huile de pépins de raisin + mélange de gomme arabique et de maltodextrine : 88% par atomisation [63],
- jus de poire de cactus (figue de Barbarie) + inuline natif : 50 - 81% par atomisation [55],
- extrait de feuilles d'olivier + chitosane : 27% par atomisation [147].

2.2. Analyse au MEB équipé de sonde EDS des lyophilisats du complexe amidon/tyrosol

2.2.1. Analyse MEB

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour évaluer les principales caractéristiques morphologiques des poudres obtenues par lyophilisation.

Les images A, B et C correspondent respectivement à l'amidon de pomme de terre chauffé à 65, 70 et à 75°C (chauffage conventionnel) [123]. L'image D correspond à celle du tyrosol [148]. Quant aux images E et F, elles correspondent respectivement à celles du lyophilisat amidon/tyrosol (chauffage conventionnel et chauffage sous micro-ondes).

En comparant les images A, B, C, E et F, on reconnaît la structure de l'amidon chauffé dans ces expériences. En observant les images E et F, on reconnaît à la surface de l'amidon chauffé des nodules de morphologies plus ou moins sphériques ressemblant au tyrosol observé sur l'image D. Ainsi, il est probable que les nodules observés à la surface de l'amidon chauffé correspondent au tyrosol.

Les différences morphologiques entre les images E et F peuvent s'expliquer par les spécificités de l'interaction du rayonnement micro-ondes avec l'amidon. En effet, il a été rapporté que le chauffage par micro-ondes provoque un réarrangement des structures intramoléculaires de l'amidon pendant la gélatinisation, modifiant ainsi la capacité d'absorption d'eau, la solubilité, l'aptitude au gonflement, les caractéristiques de gélatinisation, le comportement au retrait par déshydratation et les propriétés rhéologiques de l'amidon [149-153]. Le facteur clé qui influence le comportement physicochimique de l'amidon sous irradiation par micro-ondes est l'effet de chauffage rapide. En revanche, d'autres travaux concluent que les propriétés thermophysiques et structurales de l'amidon sont similaires à l'issue d'un chauffage par conduction ou par micro-ondes [154-160].

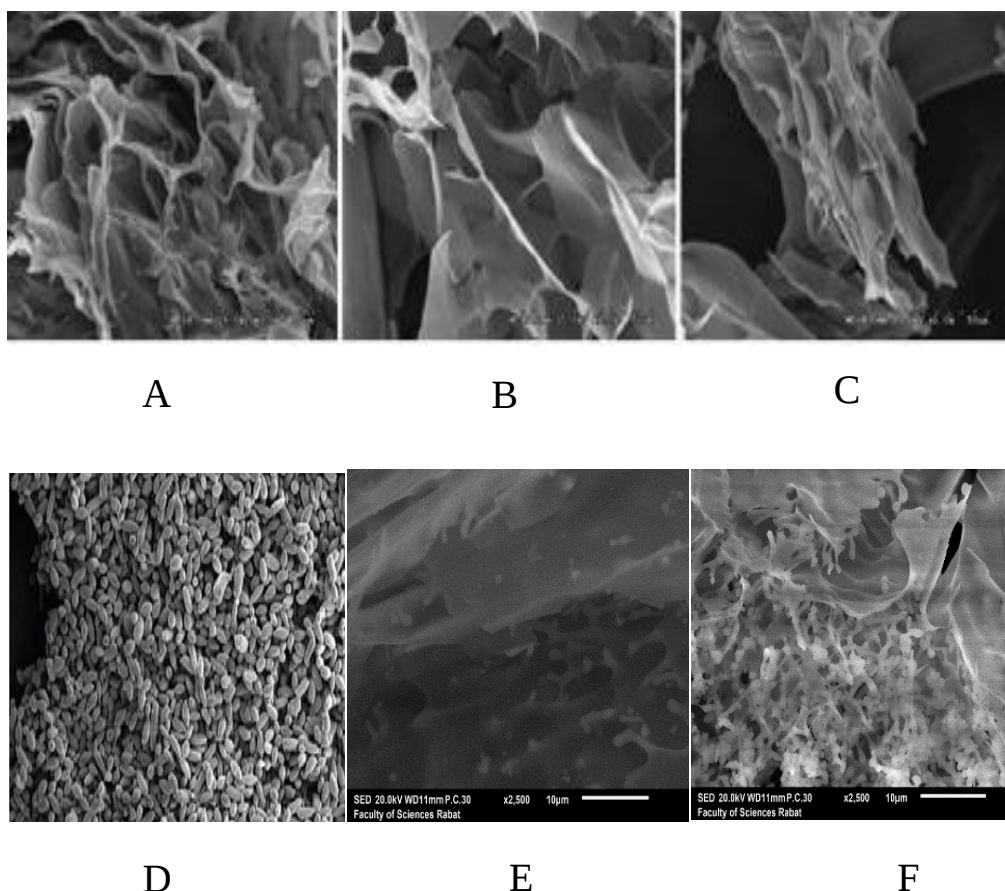


Figure 23: Images MEB d'amidon chauffé à 65, 70 et 75 °C (A, B, C, resp.), de tyrosol (D) et du complexe amidon-tyrosol avec amidon gélatinisé par chauffage conventionnel (E) ou sous micro-ondes (F). Grossissement x2500

2.2.3. Analyse EDS ou EDX

Les interactions entre l'amidon et le tyrosol, qui permettent la formation d'un complexe, sont également analysées par EDS (Energy Dispersive Spectroscopy). Cette étude est réalisée sur le lyophilisat amidon/tyrosol (chauffage conventionnel et chauffage sous micro-ondes). Dans les figures (24 et 25) sont présentés deux spectres obtenus par MEB-EDS. Comme attendu, les éléments quantifiés sont le carbone et l'oxygène (des traces d'azote sont détectées). Le rapport C/O est de 1,06 pour le complexe obtenu sous chauffage micro-ondes (figure 25), ce rapport est égal à celui de l'amidon dont la composition est (6 atomes C + 5 atomes O par unité Glc), ce qui corrobore le pourcentage d'efficacité d'encapsulation, car il existe peu de tyrosol en surface selon le rapport C/O. En revanche, ce rapport est supérieur à 1 dans le complexe obtenu

sous chauffage conventionnel (1,37), ce qui laisse suggérer qu'il est plus riche en tyrosol (8 atomes C + 2 atomes O).

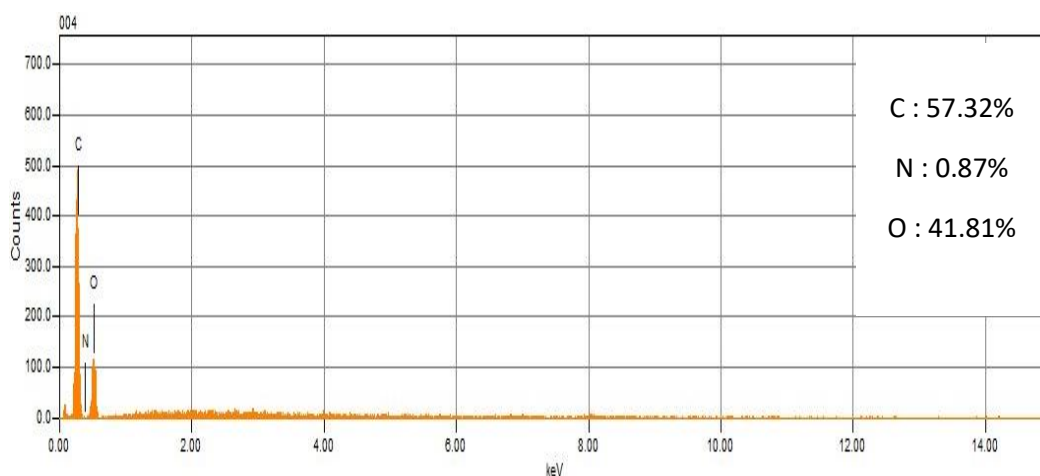


Figure 24 : Spectre MEB-EDS du complexe amidon/tyrosol (chauffage conventionnel).

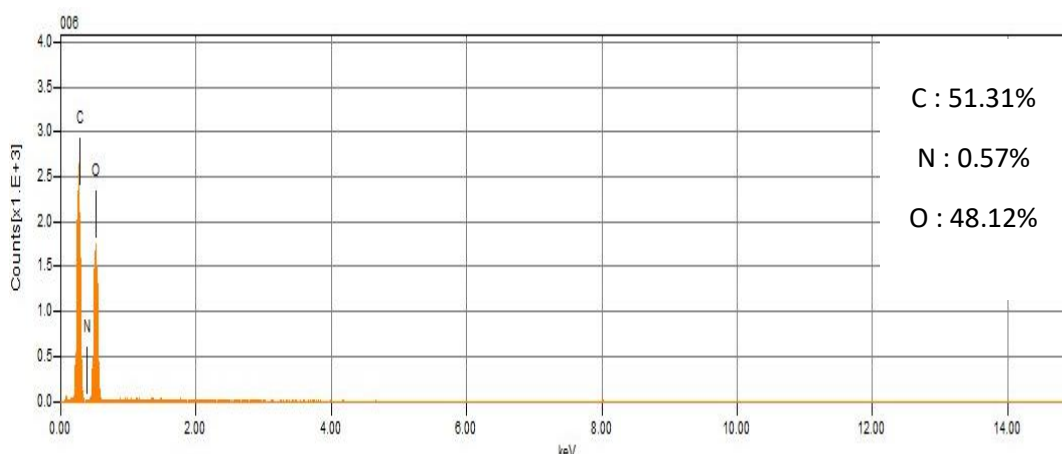


Figure 25 : Spectre MEB-EDS du complexe amidon/tyrosol (chauffage micro-ondes).

2.4. Relargage du tyrosol par digestion enzymatique (*in vitro*)

Afin de contrôler la libération du tyrosol dans le temps, une digestion enzymatique a été réalisée en une heure dans une solution tampon à différente température (24°C et 37°C), mais dès le début de la cinétique la quasi-totalité du tyrosol a été libéré, il n'y a pas de différence entre le contrôle (sans enzyme) et l'échantillon comme illustré par les figures 26 A et B.

Il a été rapporté dans la littérature que plusieurs facteurs peuvent modifier la vitesse de libération des molécules bioactives encapsulées dans une matrice d'amidon [161 ; 162]. Parmi ces facteurs nous pouvons citer la température du milieu de libération [163], la cristallinité plus ou moins élevée du polymère [164 ; 165], la masse molaire du polymère [166 ; 167], ou encore

le pH du milieu extérieur [168, 169]. Ces paramètres modifient les interactions entre la molécule bioactive et la matrice d'amidon et donc la cinétique de libération.

D'un autre côté, nous pouvons aussi supposer qu'il n'y a pas eu formation de complexe d'inclusion de type V mais plutôt un complexe par formation de liaisons hydrogènes. En outre, l'interaction entre l'amidon et les polyphénols se présente principalement sous deux formes : d'une part, les amas fortement formés par une seule hélice d'amylose et les polyphénols par l'interaction hydrophobe, et d'autre part, le complexe faiblement lié par des liaisons hydrogènes, électrostatique et ionique. Le complexe de polyphénols de thé et l'amidon de riz est un exemple, qui est principalement lié par une liaison hydrogène pendant la gélatinisation [15]. Cependant, les techniques telles que la diffractométrie des rayons X et la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) [102 ; 169] sont nécessaires pour observer le complexe d'inclusion de type V. Par ailleurs, il a été rapporté dans l'étude de Fan Zhu et al. que la rutine ainsi que l'acide férulique encapsulés par la méthode de co-précipitation ne forment également pas de complexe d'inclusion de type V avec l'amylose [102]. Les causes probables empêchant la formation du complexe d'inclusion de type V sont la taille trop volumineuse des composés phénoliques (en comparaison de la taille des cavités dans l'hélice d'amylose) et leur caractère insuffisamment hydrophobe. Ainsi, le tyrosol semble interagir faiblement et superficiellement avec l'amylose (peut-être en formant des liaisons hydrogènes), même si une fraction substantielle de tyrosol résiste au lavage à l'éthanol comme le montre le calcul d'EE.

Le but principal de l'encapsulation étant de contrôler la libération du principe actif, il est donc nécessaire de palier à la solubilisation spontanée de l'amidon contenant le tyrosol. D'ailleurs, lorsque le composé bioactif est libéré rapidement, l'effet protecteur du biopolymère n'opère pas.

Des techniques de traitement physique dites « annealing » et « Heat Moisture Treatment » (HMT) pourraient être tentées. Ces deux traitements permettent d'induire des réarrangements moléculaires ou des cristallisations en plaçant les amidons dans les zones comprises entre les températures de transition vitreuse et de fusion.

En outre, dans une étude récente, l'encapsulation par la technique d'évaporation de solvant à double émulsion (eau-dans-huile-dans-eau) apparaît comme une alternative pour la protection et l'incorporation du tyrosol dans les matrices lipophiles. Dans cette étude, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a confirmé l'incorporation efficace du tyrosol dans les matrices polymères sélectionnées [148].

Toutefois, les systèmes d'encapsulation à libération rapide peuvent trouver intérêt dans les mélanges secs ou les préparations instantanées.

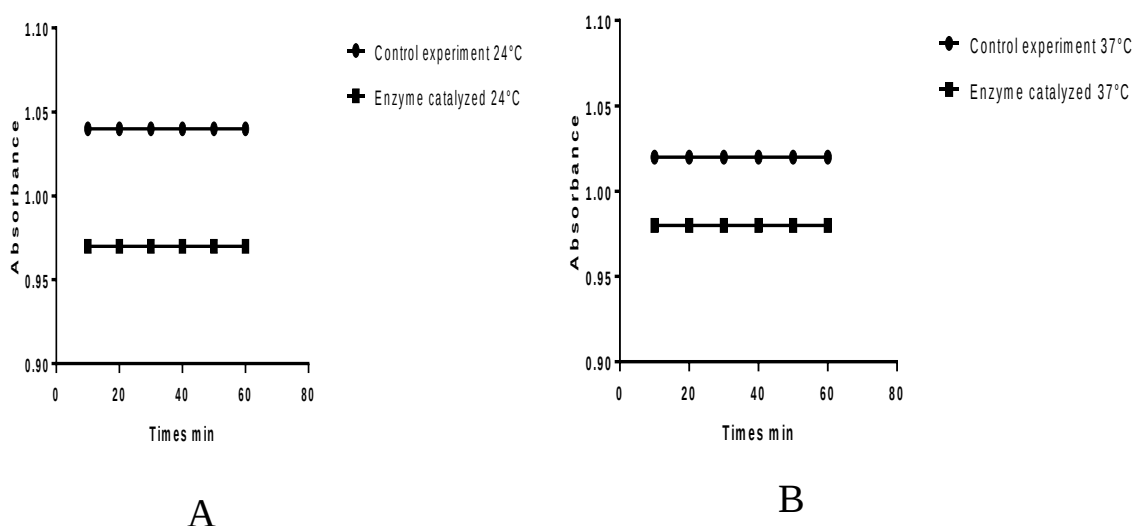


Figure 26 : Cinétique de digestion enzymatique du complexe amidon / tyrosol à 24°C (A) et à 37°C (B)

3. Encapsulation des biophénols du grignon d'olive

3.1. Caractérisation du grignon de départ par UPLC-DAD-MS

L'analyse chromatographique de la solution de grignon d'olive de départ, préparée dans un mélange de solvant (eau/éthanol 80/20 v/v), a été effectuée par UPLC-DAD-MS. Les composés phénoliques ont été identifiés grâce aux spectres de masse et d'absorption des différents standards (Annexe 2-7), excepté le tyrosol dont le spectre de masse n'a pu être enregistré. La quantification a été effectuée grâce aux équations déduites des courbes d'étalonnage des différents standards (Annexe 8), excepté le glucoside d'hydroxytyrosol qui a été quantifié en équivalent du standard hydroxytyrosol. Le profil chromatographique du grignon de départ obtenu à 280 nm et 330 nm est représenté par la figure 27. Les quatre composés phénoliques identifiés et quantifiés sont présentés dans le tableau 13. Le traitement des données a été effectué à l'aide du logiciel *Data Analysis* de Bruker.

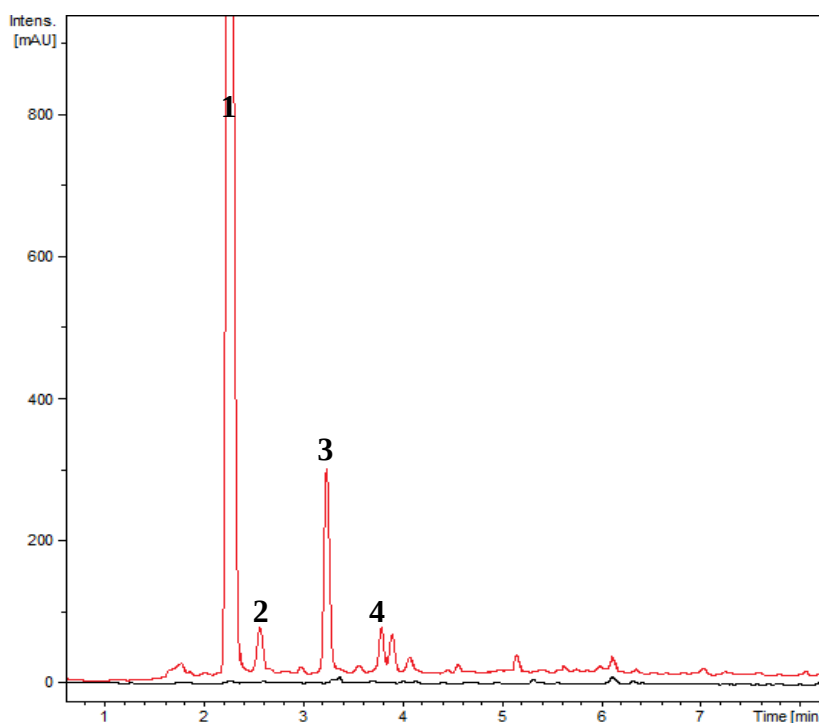


Figure 27 : Profil chromatographique du grignon d'olive de départ (100 mg grignon dans 3 mL eau + 2 mL éthanol) à 280 nm (rouge) et à 330 nm (noir).

Les composés phénoliques absorbent tous à 280 nm, ce qui permet la quantification du pool total. En revanche, une forte absorption à 330 nm est caractéristique des acides hydroxycinamiques. La faible absorption à cette longueur d'onde permet de conclure que notre grignon n'est pas riche en acides hydroxycinamiques.

Les différents composés identifiés, ainsi que leur temps de rétention, λ_{max} et concentrations sont rassemblés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Quantification et identification des composés phénoliques du grignon d'olive de départ (temps de rétention, longueur d'onde d'absorbance maximale, m/z du pic moléculaire, équation des courbes d'étalonnage des différents standards)

Composé phénolique	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	m/z [M-H]	Equation droite	R ²	Concentration ($\mu\text{mol/g}$ grignon)
(1) Hydroxytyrosol	2,4	275	153	$y = 15280x + 1,724$	0,9998	795,8
(2) Glucoside d'hydroxytyrosol	2,6	277	315	$y = 15280x + 1,724$	0,9998	21,7
(3) Tyrosol	3,3	227, 276		$y = 358x - 0,335$	1	44,8
(4) Acide dihydrocaféique	3,8	227, 279	181	$y = 475x - 0,616$	1	5,2

❖ Représentations de la structure chimique des composés identifiés dans le grignon d'olive de départ

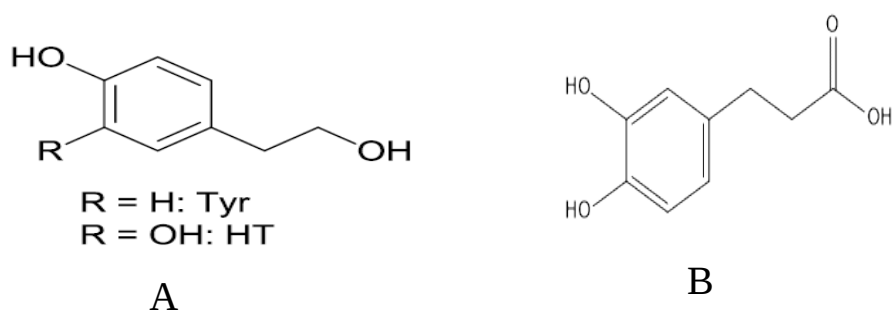


Figure 28 : Structure chimique des composés phénoliques identifiés dans le grignon d'olive. Dans le cas du glucoside de l'hydroxytyrosol, l'unité Glc peut être attachée à l'un quelconque des trois groupes OH de l'hydroxytyrosol (A). Acide dihydrocaféique (B).

3.2. Quantification et identification des composés phénoliques des fractions éthanolique et aqueuse

L'analyse chromatographique des fractions éthanolique et aqueuse des lyophilisats du complexe amidon/phénols a été effectuée selon le même protocole que celle du grignon d'olive de départ. Les composés identifiés dans le grignon d'olive de départ ont été également identifiés dans les deux fractions à des concentrations différentes. Le profil chromatographique à 280 nm des deux fractions ainsi que celui du grignon de départ sont représentés sur la figure 29.

3.3. Détermination du rendement brut et de l'efficacité d'encapsulation

Le rendement brut obtenu avec le grignon est légèrement plus élevé (tableau 15) que dans le cas du complexe amidon/tyrosol. L'efficacité d'encapsulation de chaque composé identifié a été déterminée sur la base des courbes d'étalonnage des différents standards réalisées par UPLC-DAD (voir annexe 2-7).

Tableau 15 : Rendement brut de récupération des complexes phénols de grignon – amidon (1 :10)

Type de chauffage	Masse totale initiale (g)	Masse lyophilisat (g)	Rendement (%)
Micro-ondes	1,115 ± 0,011	0,967 ± 0,120	86,6 ± 0,07

a) Grignon + amidon

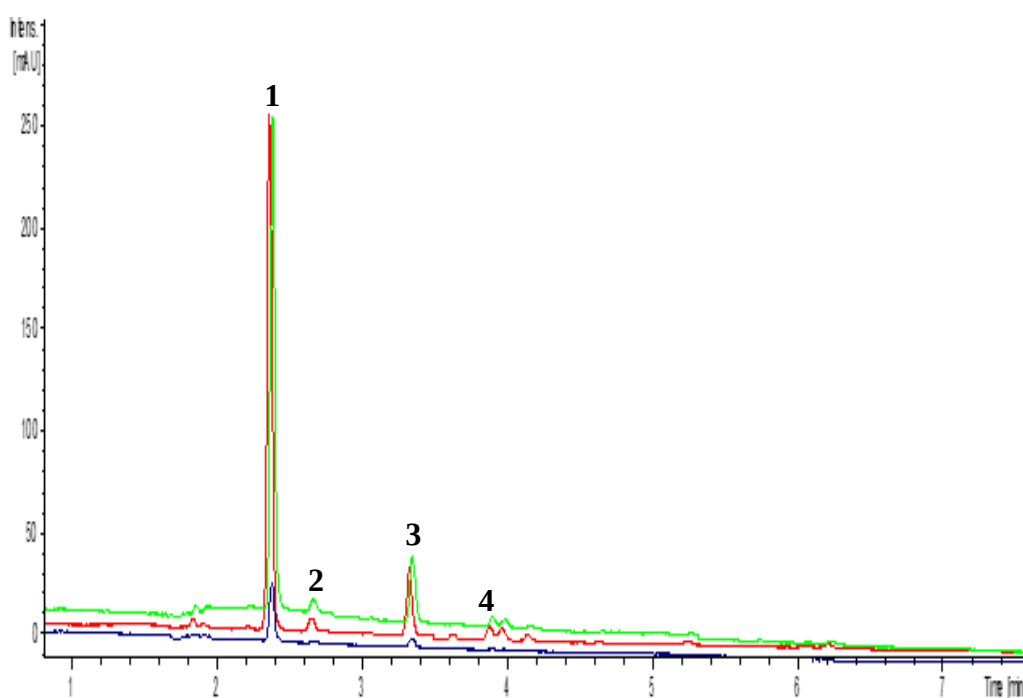


Figure 29 : Profil chromatographique à 280 nm du grignon de départ (rouge), de la fraction aqueuse : 25 mg de lyophilisat dans 2 mL d'eau distillée (vert) et de la fraction éthanolique : 50 mg de lyophilisat dans 2 mL d'éthanol (bleu).

Tableau 146 : Encapsulation des composés phénoliques

Phénol	Phénol total a)	Phénol de surface b)	Phénol encapsulé c)	EE (%) d)
Hydroxytyrosol	73,76 ± 0,03	2,20 ± 0,31	71,56 ± 0,34	97,0 ± 0,5
Glucoside d'hydroxytyrosol	0,81 ± 0,01	non détecté	0,81 ± 0,01	100
Tyrosol	4,73 ± 0,14	0,23 ± 0,01	4,50 ± 0,15	95,1 ± 6,0
Acide dihydrocaféique	0,59 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,55 ± 0,02	93,2 ± 5,0

a) quantifié après hydrolyse acide du lyophilisat (en $\mu\text{mol/g}$ lyophilisat), b) quantifié dans la fraction éthanolique de lavage du lyophilisat (en $\mu\text{mol/g}$ lyophilisat), c) phénol total – phénol de surface (en $\mu\text{mol/g}$ lyophilisat), d) phénol encapsulé / phénol total (en %).

Les valeurs de l'efficacité d'encapsulation des composés phénoliques du grignon d'olive dans l'amidon sont toutes très élevées (Tableau 16). Ce résultat pourra être attribué au prétraitement par la technique du kneading, qui est également une technique d'encapsulation.

Par ailleurs, on ne constate aucune différence significative dans les valeurs de l'efficacité d'encapsulation, ce qui indique que tous les composés phénoliques étudiés ont la même affinité pour l'amidon.

3.4. Analyse au MEB équipé de sonde EDS des lyophilisats

3.4.1. MEB

Selon le même protocole que l'analyse microscopique de la surface des microparticules du complexe amidon/tyrosol, les lyophilisats d'amidon/pp ainsi que la poudre de grignon de départ ont également été observés au microscope électronique à balayage. Les différentes images obtenues sont représentées par les (figures 30 A et B).

La même structure en feuillet de l'amidon chauffé (figure 30 A) déjà identifié dans l'analyse du lyophilisat amidon/tyrosol est observée, ainsi que des nodules qui sont par contre moins nombreux que dans le cas du complexe amidon/tyrosol (chauffage sous μ -ondes).

Ses nodules correspondent fort probablement aux composés phénoliques, car leur morphologie rappelle celle de la structure du grignon de départ (figure 30 B).

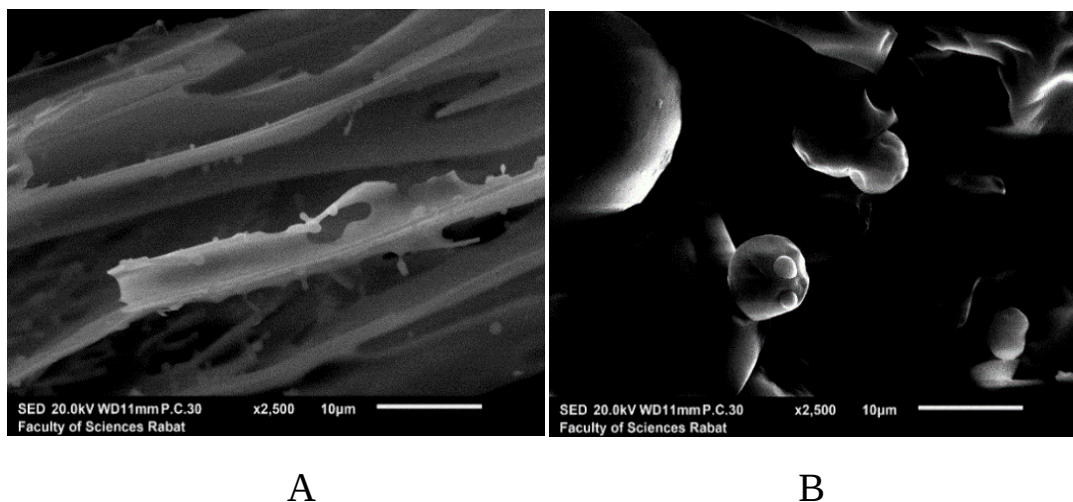


Figure 30 : Image MEB complexe amidon/polyphénols de grignon d'olive (A) et du grignon d'olive de départ (B), grossissement * 2500

3.4.2. MEB-EDS

Les spectres représentés par les (figures 31 et 32) correspondent respectivement au grignon de départ et au complexe amidon/pp. Nous observons les mêmes éléments chimiques au niveau des

deux échantillons (lyophilisat amidon/pp et poudre de grignon de départ). Le carbone est toujours majoritaire dans les deux échantillons, ensuite l'oxygène et enfin l'azote.

Le rapport C/O (1,12) dans le complexe amidon – polyphénols obtenu sous chauffage micro-ondes, est légèrement supérieur au rapport C/O de l'amidon dont la composition est (6 atomes C + 5 atomes O par unité Glc), également ce rapport est en phase avec les efficacités d'encapsulation obtenues pour ce complexe. Par contre, ce rapport est élevé (proche de 2) dans l'échantillon du grignon de départ, ce qui est normal car il est riche en tyrosol (8 atomes C + 2 atomes O) mais également en hydroxytyrosol (8 atomes C + 3 atomes O).

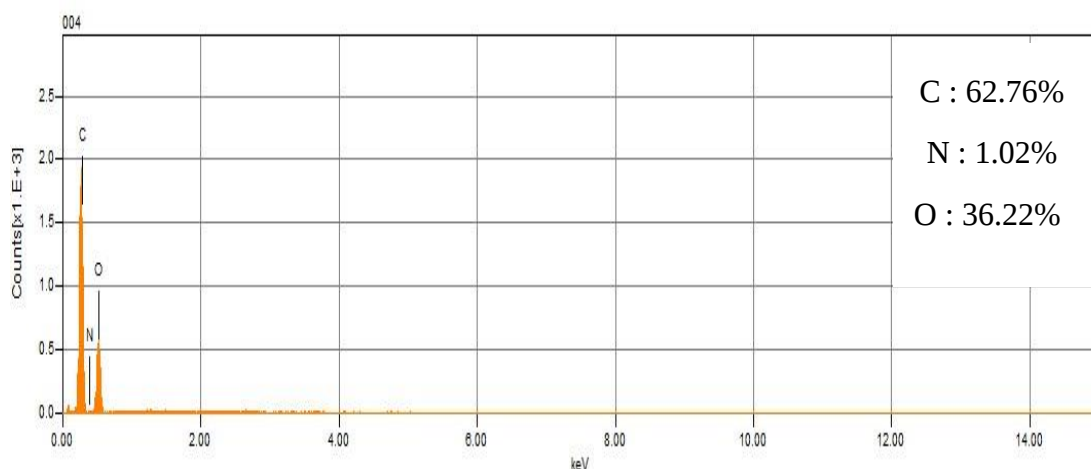


Figure 31 : Spectre MEB-EDS du grignon de départ.

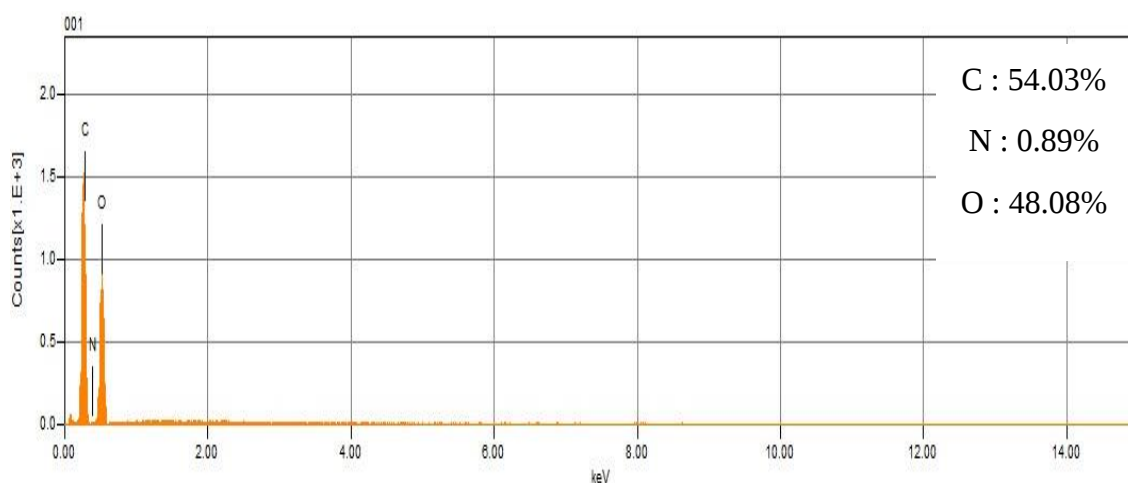


Figure 32 : Spectre MEB-EDS du complexe amidon/grignon (chauffage micro-ondes).

Conclusion

Cette étude dont l'objectif principal est l'encapsulation des composés phénoliques du grignon d'olive dans la matrice d'amidon de pomme de terre par la technique de lyophilisation, a tout d'abord consisté en l'optimisation du système d'encapsulation dans le cas simple d'un composé phénolique modèle (tyrosol), soluble dans l'eau, résistant à la chaleur, peu coûteux et plus stable que l'hydroxytyrosol.

L'efficacité d'encapsulation a été plus élevée quand l'amidon de pomme de terre est gélatinisé sous micro-ondes plutôt que par chauffage conventionnel. En outre la gélatinisation sous micro-ondes nous a également permis de réduire la durée du procédé. Ainsi, le chauffage sous micro-ondes a été retenu comme système de gélatinisation de l'amidon de pomme de terre pour l'encapsulation des composés phénoliques du grignon d'olive.

La libération du tyrosol est instantanée car la matrice d'amidon après lyophilisation est devenue soluble dans l'eau à température ambiante, ce qui empêche toute libération contrôlée. Ce phénomène pourrait être expliqué par une trop forte diminution de la cristallinité de l'amidon lors du protocole d'encapsulation. Pour remédier à cela, un traitement physique préalable de l'amidon (annealing ou HMT) pourrait être tenté.

Cependant, les complexes obtenus dans ce travail peuvent trouver usage dans l'industrie alimentaire, par exemple dans les mélanges secs (pâté de bœuf) ou dans les préparations instantanées.

L'analyse chromatographique par UPLC-DAD-MS a permis d'identifier et de quantifier les principaux composés phénoliques du grignon d'olive de départ, ainsi que des fractions de rinçage et d'hydrolyse des lyophilisats amidon + phénols de grignon. Ainsi, l'affinité relative des composés phénoliques pour l'amidon a été quantifiée. On note une forte efficacité d'encapsulation pour l'ensemble des composés phénoliques, qui peut être liée à la combinaison des deux techniques d'encapsulation (kneading et lyophilisation).

Ces résultats, bien qu'encourageants, nécessitent néanmoins d'être confirmés par une panoplie d'analyses avant d'être étendus à une plus grande échelle.

Références

1. ECONOMIE : 1,5 milliards d'oliviers dans le monde. Available online: http://www.olive-info.eu/news/economie-1-5-milliards-d-oliviers-dans-le-monde_1 (accessed on 3 November 2014).
2. Ollivier D., Pinatel C, Ollivier V and Artaud J. Composition en acides gras et en triglycérides d'huiles d'olive vierges de 34 variétés et 8 Appellations d'Origine Françaises et de 2 variétés étrangères implantées en France : Constitution d'une banque de données (1ère partie). *Olivae* 2014. 119, 36–48.
3. Malapert A., Tomao V., Margier M., Nowicki M., Gleize B, Dangles O. and Reboul E. β -Cyclodextrin Does not Alter the Bioaccessibility and the Uptake by Caco-2 Cells of Olive By-Product Phenolic Compounds. *Nutrients*. 2018. 10(11), 1653.
4. Niaounakis M. and Halvadakis C.P. Olive processing waste management: Literature review and patent survey. In *Waste Management Series*; Elsevier: Amsterdam, The Netherland; London, UK. 2006. Vol.5.
5. Dermeche S., Nadour M., Larroche C., Moulti-Mati F. and Michaud P. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem*. 2013. 48, 1532–1552.
6. Milanese M., Arturo D. and Andrea R., DomenicoL. Numerical study of anaerobic digestion system for olive pomace and mill wastewater. *Energ. Proce*. 2014. 45, 141-149.
7. Leouifoudi, I., Ziad, A., Amechrouq A., Oukerrou M.A., Mouse H.A. and Mbarki, M. Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater. *Food Sci. Technol*. 2014. 34, 249–257.
8. Ghanbari R., Anwar F., Alkharfy K.M., Gilani, A.H. and Saari, N. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—A review. *Int. J. Mol. Sci*. 2012. 13, 3291–3340.
9. Visioli F. and Bernardini E. Extra virgin olive oil's polyphenols: Biological activities. *Curr. Pharm. Des*. 2011. 17, 786–804.
10. Aude Munin and Florence Edwards-Lévy, Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds, *Pharmaceutics*. 2011. 3, 793-829.
11. Thi ThuNguyen, thèse de doctorat « Éco-extraction et encapsulation de pigments caroténoïdes et anthocyanes à partir de plantes tropicales ». Université Bourgogne Franche-Comté. 2018. p35.
12. Mishra M. *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*: Taylor & Francis. 2015.
13. Zhu F. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food Chemistry*. 2017. S0308-8146(17)30302-3.
14. Mun S., Kim Y. R. and McClements D. J. Control of β -carotene bioaccessibility using starch-based filled hydrogels. *Food Chemistry*, 2015. 173, 454–461.

15. Li B. Z., Wang L. J., Li D., Chiu Y. L., Zhang Z. J., Shi J. and al. Physical properties and loading capacity of starch-based microparticles crosslinked with trisodium trimetaphosphate. *Journal of Food Engineering*. 2009. 92, 255–260.
16. Wang Z., Li Y., Chen L., Xin X. and Yuan Q. A study of controlled uptake and release of anthocyanins by oxidized starch microgels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61, 5880–5887.
17. Chin S. F., Yazid S. N. A. M. and Pang S. C. Preparation and characterization of starch nanoparticles for controlled release of curcumin. *International Journal of Polymer Science*. 2014.
18. McClements D. J. and Li Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2010. 159, 213–228.
19. Joye I. J. and McClements D. J. Biopolymer-based delivery systems: challenges and opportunities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2016. 16, 1026–1039.
20. Fathi M., Martín Á. and McClements D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*. 2014. 39, 18–39.
21. Tonon R. V., Pedro R. B., Grosso C. R. F. and Hubinger M. D. Microencapsulation of flaxseed oil by spray drying: effect of oil load and type of wall material. *Drying Technology*. 2012. 30, 1491–1501.
22. Charve J. and Reineccius G. A. Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. 57, 2486–2492.
- 23.23 Pérez S. and Bertoft E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: a comprehensive review. *Starch/Stärke*. 2010. 62, 389–420.
24. Wurzburg O. B. *Modified starches: Properties and uses*. Boca Raton, FL: CRC Press. 1986.
25. Murugesan R. and Orsat V. Spray drying for the production of nutraceutical ingredients-a review. *Food Bioprocess Technol*. 2012. 5(1):3–14.
26. Mourtzinou I. and Goula A. *Polyphenols in Plants (Second Edition)*. Chap2: Polyphenols in Agricultural Byproducts and Food Waste. 2019. 23-44
27. Saponjac V.T, Cetkovic G., Canadanovic-Brunet J., Pajin B., Djilas S., Petrovic I., Loncarevic I., Stajcic S. and Vulic J. Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: incorporation in cookies. *Food Chem*. 2016. 207:27–33.
28. Turan F.T, Cengiz A. and Kahyaoglu T. Evaluation of ultrasonic nozzle with spray-drying as a novel method for the microencapsulation of blueberry's bioactive compounds. *Innovative Food Sci Emerg Technol*. 2015.32:136–45.
29. La Rubia-García M., Yebra-Rodríguez Á., Eliche-Quesada D., Corpas-Iglesias F.A. and López-Galindo A. Assessment of olive mill solid residue (pomace) as an additive in lightweight brick production. *Constr.Build. Mater*. 2012. 36: 495–500.

30. Meziane S. Modélisation de la cinétique du séchage convectif du grignon d'olive. *Energies Renouvelables*. 2013. 16: 379 – 387.
31. Ferhat R., Laroui S., Zitouni B., Lekbir A., Abdeddaim M., Smaili N. and Mohammedi Y. Experimental study of solid waste olive's mill: extraction modes optimization and physicochemical characterization. *J. Nat. Prod. Plant Resour*. 2014. 4: 16-23.
32. El hachemi C. Thèse de Doctorat « Effet de différents modes de séchage sur la stabilité des qualités nutritionnelles et microbiologiques du grignon d'olive Durant 3 mois de stockage ». Université d'Oran Es-Senia . 2010. p118.
33. D.P.V. : direction de la production végétale. Département lié au ministère de l'agriculture, Rabat, Maroc. 2009.
34. Vasquez-Roncero A., Maestro-Duran R. and Graciani-Constante E. Componentes fenolicos de la aceituna. II-Polifenoles tel alpechin. *Grasas y Aceites*. 1974. 25: 341-345.
35. Malapert A., Reboul E., Loonis M., Dangles O. and Tomao V., Direct and rapid profiling of biophenols in two-phase olive pomace by UHPLC-DAD-MS, *Food Analytical Methods*. 2018. 11, 1001-1010. (doi.org/10.1007/s12161-017-1064-2).
36. Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. Tec & Doc Lavoisier: Paris, France. 2009.
37. Macheix J-J., Fleuriet A. and Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses Polytechniques : Lausanne, Switzerland. 2005.
38. Sarni-Manchado P. and Cheynier V. Les polyphénols en agroalimentaire ; Tec & Doc Lavoisier : Paris, France.2005.
39. Mertens-Talcott S. U., Zadezensky I., De Castro W. V., Derendorf H. and Butterweck, V. Grape-fruit-drug interactions: Can interactions with drugs be avoided? *Journal of Clinical Pharmacology*. 2006. 46, 1390–1416.
40. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products*. 1996. 59, 205–215.
41. Manach, C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004. 79, 727–747.
42. Fang Z. and Bhandaria B. Encapsulation of polyphenols a review, *Trends in Food Science & Technology*. 2010. 21, 512.
43. Khanji A. N., thèse de doctorat «Stabilisation de la curcumine par la micelle de caséine: approches structurale et technofonctionnelle ». 2017. p31.
44. Augustin M. A. and Hemar Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem Soc Rev*. 2009. 38, 902–912.
45. Abdallaoui R., thèse de doctorat «La Microencapsulation Des Huiles : Meilleure Approche Pour La Valorisation Des Produits Alimentaires ?». 2018. p7.

46. Vandamme T., Poncelet D. and Subra-Paternault, Microencapsulation : des sciences aux technologies, Tech et Doc, Paris. 2007.
47. Chenni M. thèse de doctorat « Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic '*Ocimum basilicum* L.' extrait par hydro-distillation et par micro-ondes ». 2016.
48. Benoit J.P., Richard J., Fournier E. & Liu S.; Brevet International, WO. 2001/015799 A1. 2001.
49. Shahidi F. and Han X. Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1993. 33, 501-547.
50. Giunchedi P. and Conte U. Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: An overview. *S.T.P. Pharma Pratiques*. 1995. 5:276–290.
51. Madene A., Jacquot M., Scher J. and Desobry S. Flavour encapsulation and controlled release - A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2006. 41:1–21.
52. Patel R.P., Patel M.P. and Suthar A.M. Spray drying technology: an overview. *Ind. J. Sci. Technol.* 1999. 2:44–47.
53. Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm. Res.* 2008. 25:999–1022.
54. Gaubert Q. thèse de doctorat « Caractérisation et modélisation des phénomènes gouvernant le séchage par atomisation de suspensions colloïdales ». Aix-Marseille Université, IUSTI, UMR 7343 CNRS. 2017. p26.
55. Paz R., García P., Reyesa N., Chávez J. and Santos J. Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry*. 2012. 134, 1-8.
56. Stevens C., Meriggi A. and Booten C. Chemical modification of inulin a valuable renewable resource and its industrial applications. *Biomacromolecules*. 2001. 2, 1–16.
57. Singh J., Kaur L. and McCarthy O. J. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications. A review. *Food Hydrocolloids*. 2007. 21, 1–22.
58. Georgetti S. R., Casagrande R., Fernandes C. R., Pereira W. & Vieira M. J. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*. 2008. 41, 1521–1527.
59. Ersus S., and Yurdagel U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*. 2007. 80, 805–812.
60. kosaraju S.L., d'ath L. and lawrence A. 'Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery', *Carbohydr Polym.* 2006. 64, 163–167.
61. Cilek B., Luca A., Hasirci V., Sahin S. and Sumnu G. Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *Eur Food Res Technol.* 2012. 235(4):587–96.

62. Zhang L., Mou D. and Du Y. Procyanidins: Extraction and micro-encapsulation. *J. Sci. Food Agric.* 2007. 87:2192–2197.
63. kosaraju S.L., labbett D., emin M., konczak I. and lundin L. ‘Delivering polyphenols for healthy ageing’. *Nutr Diet.* 2008. 65, S48–S52.
64. Fang Z. and Bhandari B. Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation. Woodhead Publishing Limited. 2012.
65. Manojlovic´ V., Nedovic´ V.A., Kailasapathy K. and Zuidam N.J. Encapsulation of probiotics for use in food products. in *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, NJ Zuidam and E Shimoni (eds) Springer, New York.2010.
66. Fang Z. and Bhandaria B., Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry.* 2011. 129, (3, 1)1139-1147.
67. Madene. A, thèse de doctorat « Etude des Transferts d’Arômes Encapsulés dans une Matrice Alimentaire type Génoise, Alimentation et Nutrition ». Institut National Polytechnique de Lorraine. 2006. p41-42.
68. Turan F.T., Cengiz A. and Kahyaoglu T. Evaluation of ultrasonic nozzle with spray-drying as a novel method for the microencapsulation of blueberry’s bioactive compounds. *Innovative Food Sci Emerg Technol.* 2015. 32:136–45.
69. Bogdani E., thèse de doctorat «Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l’ibuprofène en milieu organique, Médecine humaine et pathologie ». Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10225.
70. Koyama Y., Kamat M., De Angelis R.J., Srinivasan R. and DeLuca P.P. Effect of solvent addition and thermal treatment on freeze drying of cefazolin sodium. *J Parenter Sci Technol* 42(2):47-52 (1988).
71. Cise M.D. and Roy M.L. Improvements in or relating to freeze-drying cephalothin sodium. British Patent. 1981, 1,589-317.
72. Desai U.R. and Klibanov A.M. Assessing the structural integrity of lyophilized protein inorganic solvents. *J Am Chem Soc.* 1995. 117, 3940-3945.
73. Minemoto Y., Adachi, S. and Matsuno, R. Autoxidation of linoleic acid encapsulated with polysaccharides of differing weight ratio. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 1999. 63, 866–869.
74. Delgado-Vargas F., Jimenez A. R., and Pardes-Lopez O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2000. 40, 173-289.
75. Laine P., Kylli P., Heinonen M. and Jouppila K. Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 2008. 56:11251–11261.
76. Cano-Higuaita, D. m., Malacrida, C. r. and Telis, V. r. n. Stability of Curcumin Microencapsulated by Spray and Freeze Drying in Binary and Ternary Matrices of Maltodextrin, Gum Arabic and Modified Starch. *J. Food Process. Preserv.* 2015. 39, 2049–2060.

77. Xue F., Li C., Liu Y., Zhu X., Pan S. and Wang L. Encapsulation of tomato oleoresin with zein prepared from corn gluten meal. *J. Food Eng.* 2013. 119, 439–445
78. Mun S., Cho Y., Decker E. A. and McClements D. J. Utilization of polysaccharide coatings to improve freeze–thaw and freeze–dry stability of protein-coated lipid droplets. *J. Food Eng.* 2008.86, 508–518
79. Shahidi, F., & Han, X. Q., Encapsulation of food ingredients, 1993. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547.
80. Gökmen V., Mogol B. A., Lumaga R. B., Fogliano V., Kaplun Z. and Shimoni E. Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*. 2011.105, 585–591.
81. Hasanvand E., Fathi M., Bassiri A., Javanmard M. and Abbaszadeh R. Novel starch based nanocarrier for vitamin D fortification of milk: Production and characterization. *Food and Bioproducts Processing*. 2015. 96, 264–277.
82. Joye I. J. and McClements D. J. Biopolymer-based delivery systems: challenges and opportunities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2016. 16, 1026–1039.
83. Li Y., De Vries R., Slaghek T., Timmermans J., Stuart M. A. C. and Norde, W. Preparation and characterization of oxidized starch polymer microgels for encapsulation and controlled release of functional ingredients. *Biomacromolecules*. 2009. 10, 1931–1938.
84. Nielsen C. K., Kjems J., Mygind T., Snabe T., Schwarz K., Serfert Y. and Meyer R. L. Enhancing the antibacterial efficacy of isoeugenol by emulsion encapsulation. *International Journal of Food Microbiology*. 2016. 229, 7–14.
85. Charve J. and Reineccius G. A. Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. 57, 2486–2492.
86. Lévêque E., Haye B. and Belarbi A., « L'amidon & ses dérivés, Applications industriels », Elsevier Ltd., Paris. 2000. 1-14.
87. <https://futurefoodchemist.weebly.com/amylose-or-amylopectin.html>
88. Mbougung P. D. thèse de doctorat « Influence Des Amidons Natifs Ou Acetyles De Manioc Et De Pomme De Terre Sur Les Propriétés Physico-Chimiques Et Texturales Du Pâte De Boeuf (Bos indicus) ». 2009. p10-12.
89. Buleon A. Caractéristiques structurales des amidons. Formation Adria des 21 et 22 mars 2001 à Nantes (France).
90. Katz J. R. and Derksen J.C. Über die Umwandlung von Stärkepräparaten mit Kartoffelstärkespektrum (b-spektrum) in solche mit Weizenstärkespektrum (Ä-Spektrum) und umgekehrt. *Z. Phys. Chem.* 1933. 165: 228-233.
91. Zobel H.F. Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch/Stärke*. 1988. 40(1), 1-7.
92. Hizukuri S. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Polymers*. 1985. 141: 295–306.

93. Elsenhaber F. and Schulz W. Monte Carlo simulation of the hydration shell of double-helical amylose: a left-handed antiparallel double helix fits best into liquid water structure. *Biopolymers*.1992. 32: 1643–1664.
94. Cheetham N. W. H. and Tao L. P. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*, .1998. 36: 277–284.
95. Boursier B. Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires. *Technique de l'ingénieur Dossier F4690*.2005. p22.
96. Gallant D. J., Bouchet B. and Baldwin P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate polymers*. 1997. 32, 177–191.
97. Waliszewski K. N., Aparicio M. A., Bello L. A. and Monroy J. A., Changes of banana starch by chemical and physical modification. *Carbohydrate Polymers*. 2003. 52: 237–242.
98. Duprat F., Gallant D., Guilbot A., Mercuer C. and Robin J.P. L'amylose dans les polymères végétaux. Ed. B. Monties, Gauthier-Villars. 1980.176-231.
99. Cheftel J.C. et Cheftel H. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. *Technique et Documentation-Lavoisier*.1977. Vol.1, 130-141.
100. Banks W., Greenwood C. T. and Khan, K. M. The interaction of linear, amylose oligomers with iodine. *Carbohydrate Research*.1971. 17: 25–33.
101. Colonna P. and Mercier C. Macromolecular structure of wrinkled –and smooth-pea starch components. *Carbohydrate Res*.1984. 126: 233-247.
102. Zhu F. Interactions between starch and phenolic compound, *Trends in Food Science & Technology*. 2015. Vol.43, 2, 129-143
103. Obiro W. C., Ray S. S. and Emmambux M. N. V-amylose structural characteristics, methods of preparation, significance, and potential applications. *Food Reviews International*, 2012. 28, 412-438.
104. Buleon A., Colonna P., Planchot V. and Ball, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1998. 23: 85-112.
105. Biais B., Le Bail P., Robert P., Pontoire B. and Buleon A. Structural and stoichiometric studies of complexes between aroma compounds and amylose. Polymorphic transitions and quantification in amorphous and crystalline areas. *Carbohydrate Polymers*. 2006. 66: 306–315
106. Rappenecker G. and Zugenmaier P., Detailed refinement of the crystal structure of Vh-amylose. *Carbohydrate Research*. 1981.89: 11-19.
107. Helbert W., Chanzy H., Single crystals of V amylose complexed with n-butanol or n-pentanol: structural features and properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994.16(4): 207-213.
108. Buleon A., Delage M., Brisson J. and Chanzy H., Single crystals of V amylose complexed with isopropanol and acetone. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1990. 12(2): 25-33.

109. Le Bail P., Chauvet B., Simonin H., Rondeau C., Pontoire B., De Carvalho M. and Le Bail A. Formation and stability of amylose ligand complexes formed by high pressure treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2013, 18: 1-6.
110. Biliaderis C. G., Page C. M., Slade L. and Sirett R. R. *Carbohydrate Polymers*. 1985. 5, 367.
111. Banks W. and Greenwood C.T. *Starch and its components*. Ed. W. Banks and C.T. Greenwood, Edinburgh University Press. 1975.
112. Atkin N.J., Cheng S.L., Abeysekera R.M. and Robards A.W. Localisation of amylose and amylopectin in starch granules using enzyme-gold labelling. *Starch/Stärke*. 1999. 51: 163-172.
113. Thurn A. and Burchard W. Heterogeneity in branching of amylopectine, *Carbohydrate Polymer*. 1985. 5: 441-460.
114. Colonna P. Propriétés fonctionnelles des amidons. Formation Adria des 3 et 4 juin 1998 à Paris (France).
115. Al-Muhtaseb A.H., MCMINN W.A.M. & MAGEE T.R.A. Water sorption isotherms of starch powders Part 1: mathematical description of experimental data. *Journal of Food Engineering*. 2004. 61: 297–307.
116. Buleon A., Colonna P. and Leloup V. Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *Actualités des industries alimentaires et agro-industrielles*; Institut National de la Recherche Agronomique, Nante – France. 1990. 6 : 515-532.
117. Lu T.J., Jane J.L., Keeling P.L. and Singletary G. Maize starch fine structures affected by ear developmental temperature. *Carbohydrate Research*. 1996. 282: 157-170.
118. Debet M.R. and Gidley M.J. Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. *Carbohydrate Polymers*. 2006. 64, 452-465.
119. Singh S., Isono N., Srichuwong S., Noda T. and Nishinari K. Structural, thermal and viscoelastic properties of potato starches. *Food Hydrocolloids*. 2008. 22, 979–988.
120. Alais C., Linden G. and Miclo L. *Biochimie alimentaire*. 5ème édition de l'abrégé. Dunod. 2003. 34-38.
121. Copeland L, Blazek J, Salman H and Tang M.C, Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*. 2009. 23, 1527-1534.
122. Frénot M. and Vierling E. *Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant*. Doin éditeurs. Cndp. 2ème édition. 2001. 57-65,.
123. Ratnayake W.S. and Jackson D.S. A new insight into the gelatinization process of native starches. *Carbohydrate Polymers*. 2007. 67, 511–529.
124. Doublier, J- L., Llamas G. and Meur M. A rheological investigation of cereal starch pastes and gels. Effect of pasting procedures. *Carbohydr. Polym.* 1987. 7, 251–275.
125. Liu X., Ogawa H., Ando R. Nakakuti T., Kishida T. and Ebihara K. Heat moisture treatment of high amylos corn starch increases dietary fiber content and lowers plasma cholesterol in ovariectomized rats. *Journal of Food Science*. 2007. 72, 652-658.

126. Angellier H. Nanocristaux d'amidon de maïs cireux pour applications composites. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier – Grenoble 1 (France). 2005. 298p.
127. Leloup V., Colonna V. and Buleon A. Studies on probe diffusion and accessibility in amylase gels. *Macromolecules*. 1990. 23: 862-866.
128. Miles M.J., Morris C.F. and Ring S.G. Some recent observations on the retrogradation of amylose. *Carbohydrate Polymers*. 1984. 4: 73-77.
129. Leloup V., Colonna P. and Buleon A. Influence of amylose-amylopectin ratio on gel properties. *J. Cereal Sci.* 1991. 13: 1-13.
130. Khanji A. N. thèse doctorat «Stabilisation de la curcumine par la micelle de caséine: approches structurale et technofonctionnelle», Université Saint-Joseph, 2017.
131. Krishnan S., Bhosale R. and Singhal R. S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydr. Polym.* 2005.61, 95–102.
132. Kanakdande D., Bhosale R. and Singhal R. S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydr. Polym.* 2007. 67, 536–541.
133. Jeon Y.-J., Vasanthan T., Temelli F. and Song B.-K. The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. *Food Res. Int.* 2003. 36, 349–355
134. Ceballos A. M., Giraldo G. I. and Orrego, C. E. Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *Journal of Food Engineering*. 2012. 111 (2), 360-365.
135. http://www.fast.u-psud.fr/~mergui/2A101/cours_thermique_L2.pdf
136. Frédéric E., Rayonnements micro-ondes: temps de relaxation de Debye et deux expériences avec un four micro-onde domestique. Researchgate.2016.
137. Napolitano A., De Lucia M., Panzella L. and d'Ischia M. The Chemistry of Tyrosol and Hydroxytyrosol: Implications for Oxidative Stress. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. 2010. 1225–1232. doi:10.1016/b978-0-12-374420-3.00134-0.
138. Livney, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2010.15, 73–83.
139. Gaquere-Parker A., Taylor T., Hutson R., Rizzo A., Folds A., Crittenden S., Zahoor N., Hussein B. and Arruda A. Low frequency ultrasonic-assisted hydrolysis of starch in the presence of α -amylase. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2018. Vol. 41, 404-409.
140. <http://www.grapsud.com>
141. Ozdemir N., Pola C. C., Teixeira B.N., Hill L. E. , Bayrak A., Gomes C. L. Preparation of black pepper oleoresin inclusion complexes based on betacyclodextrin for antioxidant and antimicrobial delivery applications using kneading and freeze drying methods: A comparative study. *LWT*. 2018. 91, 439–445. doi:10.1016/j.lwt.2018.01.046.

142. Del Valle E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004. 39(9), 1033-1046. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9).
143. Marques H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*. 2010. 25(5), 313-326. doi: 10.1002/ffj.
144. Santos E. H., Kamimura J. A., Hill L. E. and Gomes C. L. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LWT - Food Science and Technology*. 2015. 60(1), 583-592. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.046>.
145. Tao F., Hill L. E., Peng Y. and Gomes C. L. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*. 2014. 59(1), 247-255. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.037>.
146. Sepelevs I., Stepanova V. and Galoburda R. Encapsulation of Gallic Acid with Acid-Modified Low Dextrose Equivalent Potato Starch Using Spray- and Freeze-Drying Techniques. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2018, Vol. 68, 3, 273–280.
147. Karunaratne R, Zhu F, Physicochemical interactions of maize starch with ferulic acid. *Food Chemistry*. 2016. 199, 372–379.
148. Paulo F. and Santos L. Encapsulation of the Antioxidant Tyrosol and Characterization of Loaded Microparticles: an Integrative Approach on the Study of the Polymer-Carriers and Loading Contents; *Food Bioprocess Technol*. 2020.13,764–785.
149. Muzimbaranda C. and Tomasik P. Microwaves in physical and chemical modifications of starch. *Starch-Stärke*. 1994. 46 , 469–474.
150. Lewandowicz G., Fornal J. and Walkowski A. Effect of microwave radiation on physico-chemical properties and structure of potato and tapioca starches. *Carbohydr. Polym.* 1997.34, 213–220.
151. Luo Z., He X., Fu X., Luo F. and Gao Q. Effect of microwave radiation on the physicochemical properties of normal maize, waxy maize and amylomaize V starches. *Starch-Stärke*. 2006. 58, 468–474.
152. Lewandowicz G., Jankowski T. and Fornal J. Effect of microwave radiation on physico-chemical properties and structure of cereal starches. *Carbohydr. Polym.* 2000. 42, 193–199
153. Palav T. and Seetharaman K. Impact of microwave heating on the physico-chemical properties of a starch–water model system. *Carbohydr. Polym.* 2007. 67, 596–604.
154. Daming F., Liyun W., Nana Z., Lei X., Luelue H., Jianxin Z., Mingfu W. and Hao Z. Effect of microwave heating on optical and thermal properties of rice starch. *Starch-Stärke*. 2012. 64, 740–744
155. Daming F., Liyun W., Nana Z., Lei X., Luelue H., Jianxin Z., Mingfu W. and Hao Z. Determination of structural changes in microwaved rice starch using Fourier transform infrared and Raman spectroscopy. *Starch-Stärke*. 2012. 64, 598–606.

156. Daming F., Liyun W., Nana Z., Lei X., Luelue H., Jianxin Z., Mingfu W. and Hao Z. Effect of Microwave on Lamellar Parameters of Rice Starch through Small-angle X-ray Scattering. *Food Hydrocolloids*.2014. 35, 620–626.
157. Daming F., Liyun W., Nana Z., Lei X., Luelue H., Jianxin Z., Mingfu W. and Hao Z. ¹H NMR studies of starch-water interactions during microwave heating. *Carbohydr. Polym.* 2013.97, 406–412.
158. Daming F., Liyun W., Nana Z., Lei X., Luelue H., Jianxin Z., Mingfu W. and Hao Z. Structural variation of rice starch in response to temperature during microwave heating before gelatinization. *Carbohydr. Polym.* 2013. 92, 1395–1401.
159. Daming F., Liyun W., Nana Z., Lei X., Luelue H., Jianxin Z., Mingfu W. and Hao Z. Determining the Effects of Microwave Heating on the Ordered Structures of Rice Starch by ¹³C CP/MAS NMR. *Carbohydr. Polym.* 2013.92, 1249–1255.
160. Alexis F., Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly (lactic acid)-co-(glycolic acid). *Polymer International*, 2005. 54(1): p. 36-46.
161. Witt C. and T. Kissel, Morphological characterization of microspheres, films and implants prepared from poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: is the erosion controlled by degradation, swelling or diffusion? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2001. 51(3): 171-181.
162. Zolnik B.S., Leary P.E., and D.J. Burgess, Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*. 2006. 112(3): p. 293-300.
163. Tsuji H. and Y. Ikada Properties and morphology of poly(L-lactide) 4. Effects of structural parameters on long-term hydrolysis of poly(L-lactide) in phosphate-buffered solution. *Polymer Degradation and Stability*. 2000. 67(1): p. 179-189.
164. Tsuji H. and Del Carpio C.A., In Vitro Hydrolysis of Blends from Enantiomeric Poly(lactide)s. 3. Homocrystallized and Amorphous Blend Films. *Biomacromolecules*. 2003. 4(1): p. 7-11.
165. Liggins, R.T. and Burt H.A., Paclitaxel-loaded poly(L-lactic acid) microspheres 3: blending low and high molecular weight polymers to control morphology and drug release. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004. 282(1-2): 61-71.
166. Liggins R.T. and Burt H.M., Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001. 222(1): 19-33.
167. Zolnik, B.S. and Burgess D.J., Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *Journal of Controlled Release*. 2007. 122(3): 338-344.
168. Makino K., H. Ohshima and T. Kondo, Mechanism of hydrolytic degradation of poly(L-lactide) microcapsules: effects of pH, ionic strength and buffer concentration. *Journal of microencapsulation*. 1986. 3(3): 203-12.
169. Chai Y., Wang M. and Zhang G. Interaction between amylose and tea polyphenols modulates the postprandial glycemic response to high-amylose maize starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013. 61, 8608-8615.

*Deuxieme Partie : Activité Antioxydante
Et Antidiabétique Des Composés
Phénoliques Libres Et Encapsulés De
Grignon D'olive*

Introduction

Le diabète est une maladie métabolique chronique caractérisée par une hyperglycémie persistante résultant soit du fait que le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline (type 1), soit lorsque l'organisme ne peut plus utiliser efficacement l'insuline qu'il produit (type 2) [1] ; le type 2 est le plus répandu (90 à 95%) de tous les cas de diabète [2]. En effet, l'augmentation du taux de glucose dans le sang postprandialement (après repas), est le résultat de l'hydrolyse des glucides, un processus principalement catalysé par les enzymes α -glucosidase et α -amylase [3]. Au cours du processus, l'enzyme α -amylase salivaire hydrolyse les glucides en oligosaccharides et disaccharides, qui sont ensuite hydrolysés par l'enzyme α -glycosidase en monosaccharides tel que le glucose, qui est absorbé par l'intestin grêle dans le sang. Les oligosaccharides restants sont hydrolysés par l' α -amylase pancréatique en glucose et en maltose [4]. Par conséquent, des inhibiteurs thérapeutiques de l' α -glucosidase et de l' α -amylase tels que l'acarbose, voglibose, miglitol et la metformine ont été développés pour la prise en charge du diabète de type 2. Cependant, tous les médicaments utilisés pour inhiber l'activité des enzymes hydrolysant les glucides, sont synthétiques et leurs inconvénients majeurs sont des effets indésirables tels que des troubles gastro-intestinaux (flatulences, douleurs abdominales et diarrhée), un effet métabolique tel que la prise de poids, un coût élevé, et une résistance aux médicaments [5]. Par conséquent, il est urgent de rechercher de nouveaux antidiabétiques efficaces, moins onéreux et peu toxiques. Ainsi, des travaux sur des antidiabétiques de sources naturelles ont attirés beaucoup d'attention car ils peuvent offrir tous les avantages recherchés [6]. Ces antidiabétiques constituent des métabolites secondaires avec une grande diversité structurale possédant un large spectre de bioactivités, y compris l'activité antidiabétique. Des chercheurs ont démontré que certaines plantes médicinales ou la consommation d'aliments fonctionnels inhibe efficacement les enzymes α -glycosidase et α -amylase et par conséquent empêchent le développement du diabète [7].

L'utilisation de biophénols des sous-produits d'olive pour synthétiser des antioxydants s'est considérablement développée en raison de leur capacité à résoudre des problèmes environnementaux, des raisons économiques et leur capacité de renouvellement.

Ainsi, ce travail de thèse qui s'insère dans un contexte de valorisation des déchets de l'industrie oléicole, en l'occurrence le grignon d'olive (déchet solide issu de l'extraction d'huile d'olive) riche en biophénols qui nous a servi dans un premier temps, à l'encapsulation des biophénols, qui est une technique permettant de préserver la stabilité, mais aussi de camoufler les caractéristiques organoleptiques indésirables des composés phénoliques, en utilisant un

matériau de paroi (amidon de pomme de terre) garantissant leur protection contre les conditions défavorables du milieu environnant [40, 41]. Cette technique améliore la biodisponibilité des composés phénoliques pour un relargage contrôlé du principe actif (en occurrences les composés phénoliques), ainsi les activités antioxydante et antidiabétique des composés phénoliques encapsulés et les composés phénoliques libres vont être étudiées.

L'objectif de cette étude s'articule autour de trois points :

- Déterminer le contenu total en biophénols des différents échantillons : grignon d'olive avant encapsulation ou grignon de départ (GG départ), encapsula de biophénols de grignon d'olive (PP/A μ -ondes), encapsula de tyrosol sous microonde (Tyr/A μ -ondes) et sous chauffage conventionnel (Tyr/A conv) ;
- Déterminer l'activité antioxydante de chaque échantillon, par la méthode de DPPH et celle d'ABTS ;
- Déterminer l'activité antidiabétique *in vitro* de chaque échantillon, par la méthode d'inhibition des alphas glucosidase en occurrence l'alpha amylase.

Ceci dans le but d'effectuer une étude comparative entre les activités antioxydantes et antidiabétiques des différents échantillons sus mentionnés.

Les différentes analyses de cette partie ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines de la Faculté des Sciences de l'Université MOHAMED V.

Synthèse Bibliographique

1. Généralité sur le diabète

1.1. Homéostasie glycémique [8]

La régulation de la glycémie est l'une des fonctions les plus importantes de notre organisme. En effet, le taux de glucose dans notre sang, que l'on appelle glycémie, doit être maintenu à une concentration dite « normoglycémique » qui est environ de 1,26 g/L de glucose dans le sang. Lorsque la glycémie est supérieure à 1,26 g/L (hyperglycémie) après la prise d'un repas, une hormone hypoglycémiante, connue sous le nom d'insuline, va faciliter le piégeage du glucose par les cellules du foie et des muscles en particulier. A l'inverse, lorsque la glycémie est trop basse, souvent après un effort physique, une hormone hyperglycémiante, le glucagon, va permettre de libérer du glucose dans la circulation sanguine.

Ces deux hormones (l'insuline et le glucagon) synthétisées uniquement par le pancréas, sont produites au niveau des îlots de Langerhans. Ces îlots contiennent quatre types de cellules sécrétant chacune une hormone polypeptidique caractéristique :

- l'insuline (hormone hypoglycémiante), synthétisée par les cellules β .
- le glucagon (hormone hyperglycémiante), sécrété par les cellules α .
- la somatostatine, produite dans les cellules δ , exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de l'insuline et du glucagon.
- le polypeptide pancréatique synthétisé dans les cellules PP (polypeptide pancréatique).

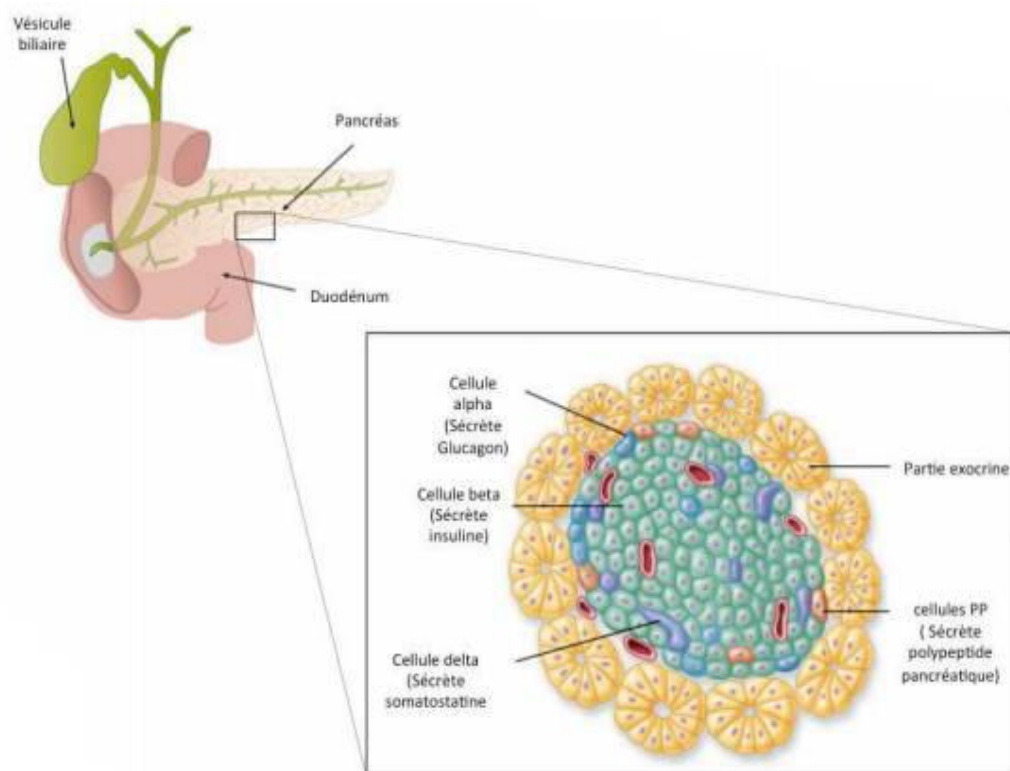


Figure 1 : Le pancréas et la distribution des différents types cellulaires dans un ilot de Langerhans [9]

1.2. Les hormones régulatrices de la glycémie

1.2.1. Insuline

L'insuline est un peptide de 51 acides aminés et se compose de deux chaînes polypeptidiques : une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés, qui sont unies par deux ponts disulfures et un pont disulfure intra-chaîne dans la chaîne A. La prépro-insuline, le précurseur de l'insuline, est synthétisé au niveau des ribosomes, puis clivée en pro-insuline dans le réticulum endoplasmique des cellules β . Celle-ci est ensuite transportée dans les appareils de golgi où elle est stockée dans des vésicules de sécrétion. La pro-insuline subit un dernier clivage au niveau de ces vésicules pour donner naissance à un effluent pancréatique équimolaire de l'insuline et du peptide C [9, 10, 11]. En contact de deux atomes de zinc, trois dimères peuvent s'associer pour former des hexamères. Les hexamères d'insuline forment des cristaux et sont stockés dans les granules de sécrétion hormonaux. Cette capacité de polymérisation a été largement utilisée pour produire l'insuline [12]. La pro-insuline, l'insuline et le peptide C

circulent pratiquement sous forme libre dans le plasma sanguin. Dès le premier passage hépatique, plus de la moitié de l'insuline sera dégradée sous l'action d'une insulinasé qui entraîne la rupture des ponts disulfures et la dégradation peptidique. Secondairement, l'insuline est captée par le muscle et dégradée par le rein, sa demi-vie est brève (5 minutes). La pro-insuline a une longue demi-vie et sa dégradation ne conduit à aucune production extra hépatique d'insuline. Le peptide C est métabolisé par le rein. Vu qu'il possède une demi-vie plus longue (10 à 12 minutes), le peptide C reflète mieux que l'insuline le pouvoir de l'insulino-sécrétion [10,13]. A un taux anormalement bas de peptide C, l'insuline commence à faire défaut comme c'est le cas chez les diabétiques de type 1. Par conséquent, le diabétique de type 1 devrait être soumis à l'insulinothérapie. Cette hormone assure l'assimilation des sucres alimentaires par les cellules et permet ainsi la régulation de la glycémie.

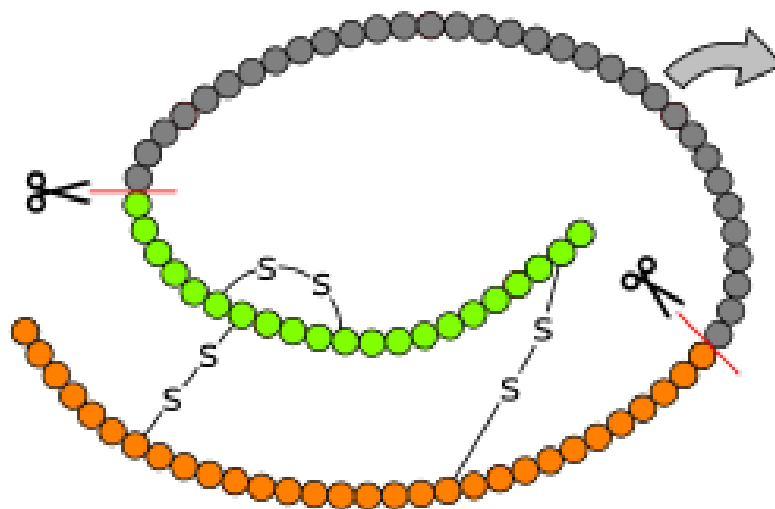


Figure 2 : Formation de l'insuline à partir de la proinsuline [14]

1.2.2. Mode d'action de l'insuline

Lorsque la concentration en glucose sanguin augmente, suite à une prise alimentaire, celle-ci entraîne la libération de l'insuline dans la circulation sanguine. L'insuline libérée va se lier à un récepteur spécifique constitué de 4 peptides glycosylés reliés par des ponts disulfures. Ce récepteur à activité tyrosine kinase permet au glucose de pénétrer dans les cellules afin d'être stocké et converti en énergie [15]. En effet, dans le foie et le muscle, le glucose est stocké sous forme de glycogène par le processus de glycogénogenèse et est utilisé dans le cycle de la glycolyse dans les myocytes pour produire de l'énergie. Au niveau du tissu adipeux, l'insuline induit aussi un stockage des acides gras en favorisant la lipogenèse [8].

1.2.3. Glucagon

Le glucagon, polypeptide de faible poids moléculaire (3,5 kDa), est composé de 29 acides aminés. Il est synthétisé au niveau des cellules alpha, à partir d'un précurseur ; le proglucagon [10,16]. Il est métabolisé par le foie et par le rein. Toutefois, à la différence de l'insuline, le foie ne dégrade que 15 à 20 % du glucagon lors de son premier passage [17]. Son dosage est réputé délicat car cette hormone circule dans le sang sous plusieurs formes de polypeptides et ne persiste que très peu de temps (demi-vie d'environ 5 mn) [7,16].

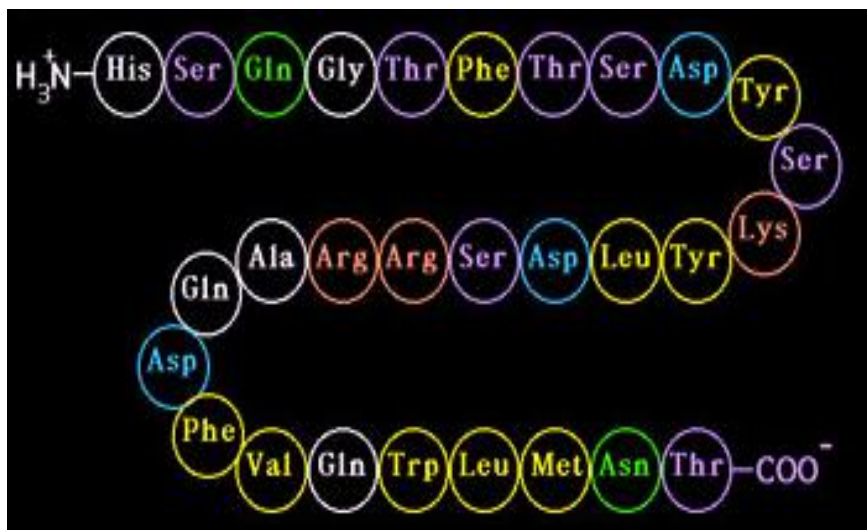


Figure 3 : Structure du glucagon <http://www.chups.jussieu.fr> [18]

1.2.4. Mode d'action du glucagon

Dans un état de normoglycémie ou d'hyperglycémie, le glucose empêche les cellules α de sécréter du glucagon dans le sang. Lorsqu'il y a une hypoglycémie, la sécrétion d'insuline est bloquée et l'inhibition de la sécrétion du glucagon par des cellules α est levée. On a donc une libération massive du glucagon par les cellules α dans la circulation sanguine. L'hormone atteint les cellules cibles et se fixe sur son récepteur couplé aux protéines G. La sous-unité α de la protéine G va stimuler la glycogénolyse, via une chaîne d'activation, et entraîner une augmentation de la concentration en glucose-6-phosphate (G6P) intracellulaire. Le G6P sera hydrolysé en glucose grâce à la glucose-6-phosphatase. Le mécanisme conduit ainsi à une libération du glucose dans le sang. Le glucagon favorise aussi la néoglucogenèse à partir des acides aminés dans les hépatocytes. La glycémie est ainsi rétablie à un taux normal [15].

1.3. Pathologie diabétique

1.3.1. Définition

Le diabète est une maladie chronique due à une concentration anormalement élevée de sucre dans le sang. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le diabète comme étant un trouble métabolique à l'étiologie multiple, caractérisé par une hyperglycémie chronique accompagnée de perturbations du métabolisme des hydrates de carbone, des lipides et des protéines dues à des désordres dans la sécrétion et/ou l'action de l'insuline (insulino-résistance) [19,20]. De point de vue biologique, les critères proposés par la Société Américaine de Diabétologie (ADA) et reconnus par l'OMS pour diagnostiquer le diabète sont [21] :

- une glycémie $> 1,26$ g/l (7,0 mmol/L) après un jeûne de 8 heures et vérifiée à deux reprises ;
- ou la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) associée à une glycémie (sur plasma veineux) > 2 g/l (11,1 mmol/L) ;
- ou une glycémie (sur plasma veineux) > 2 g/l (11,1 mmol/L) 2 heures après une charge orale de 75 g de glucose (HGPO).
- ou un taux d'HbA1c ("hémoglobine glyquée") $\geq 6,5\%$ (11,1 mmol/L) quantifié selon des méthodes étalonnées sur des références internationales. Ce paramètre traduit la glycémie moyenne des trois derniers mois.

1.3.2. Classification

Il existe 4 types de diabètes définis par l'OMS. Les deux principaux sont le diabète de type 1 et 2, les diabètes dits « secondaires », et enfin le diabète gestationnel.

1.3.2.1. Diabète de type 1

Autrefois appelé diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète juvénile. Il touche environ 6 % des patients diabétiques, Cette forme de la pathologie se déclare généralement à l'enfance ou l'adolescence. Sa découverte est en général brutale et accompagnée de cétose. En effet, ce type de diabète est la conséquence de la destruction des cellules β due entre autres à une maladie auto-immune [20]. Ces cellules pancréatiques sont détruites partiellement ou entièrement par le système immunitaire, qui se caractérise par la présence importante dans le sang d'au moins un des quatre auto-anticorps du diabète : anti-îlot (ICA), anti-insuline (IAA), anti-décarboxylase de l'acide glutamique (GAD) ou anti-tyrosine phosphatase membranaire (IA2) [15]. L'insuline est alors produite en quantité insuffisante, avec pour conséquence une faible assimilation du glucose par l'organisme. La glycémie n'est alors plus ou peu régulée et reste

donc élevée. Les patients atteints n'ayant pas d'autres choix thérapeutiques que l'insulinothérapie. L'hyperglycémie causée par le diabète de type 1 peut donc être maîtrisée par le patient grâce à des prises d'insuline et un régime alimentaire adapté. Cependant, le traitement à base d'insuline n'est pas simple car il doit être adapté aux patients et à la prise alimentaire, pouvant entraîner des complications lors d'un mauvais dosage [22]. Les effets délétères du système immunitaire contre les cellules β dans ce type de diabète résulteraient probablement d'un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux [23].

1.3.2.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 appelé aussi « diabète gras » ou « diabète de la maturité » survient généralement chez les adultes de plus de 40 ans et touche davantage les personnes obèses ou en surpoids. Environ 75 % des diabétiques de type 2 souffrent d'obésité [20]. Ce type de diabète est dit insulino-résistant ou non-insulinodépendant (DNID) car il se caractérise par la résistance de l'organisme à l'action de l'insuline. Chez les individus atteints de ce type de diabète, les récepteurs cellulaires deviennent moins sensibles à l'insuline qui est produite normalement et en quantité non négligeable par les cellules β du pancréas. Le glucose est faiblement absorbé par les cellules et reste sous forme circulante contribuant ainsi à une hyperglycémie. Ce diabète dit « insulino-résistant » peut évoluer vers un diabète de type 1 par épuisement des cellules β . En effet, face à l'hyperglycémie persistante, le pancréas va solliciter ses cellules β jusqu'à s'épuiser et devenir inefficace.

Le diabète de type 2 résulte de la combinaison de facteurs génétiques, environnementaux, ainsi que de facteurs liés au mode de vie. En général, chaque personne porte un bagage génétique héréditaire qui la prédispose ou non au diabète. Chez les personnes génétiquement prédisposées à la maladie, c'est généralement le surpoids et particulièrement l'accumulation de gras dans les organes de l'abdomen qui entraînent une résistance à l'insuline [23,24]. En effet, de nombreuses études ont relevé le lien entre l'obésité, ainsi que l'accumulation de masse grasse abdominale, et le diabète de type 2 [25,26]. Ce type de diabète est traité par des mesures hygiéno-diététiques mais aussi parfois par des mesures thérapeutiques, par le biais d'antidiabétiques oraux, voire éventuellement une insulinothérapie. Cette forme de diabète représente près de 90 % des diabétiques [27].

Le diabète de type 2 entraîne à bas bruit (sans signe avant-coureur) des complications dégénératives micro-angiopathiques et macro-angiopathiques. Ces complications sont le résultat naturel de l'évolution d'une maladie réputée chronique non guérissable mais traitable.

Un mauvais pronostic et/ou une négligence préventive de la part du patient accélèrent l'altération de son système vasculaire, neurologique et musculaire et perturbent les processus physiologiques de son corps. Ces complications et plus particulièrement dans les pays pauvres sont responsables de l'augmentation de la morbidité et la mortalité [28]. Symptomatiquement, l'évolution dégénérative du diabète de type 2 se manifeste en plusieurs endroits du corps humains (figure 4). Du point de vue clinique, l'évolution finit par générer une multitude de pathologies qui selon leurs degrés de gravité vont conditionner le mode de vie du malade, handicaper son quotidien voire épuiser ses moyens financiers [8].

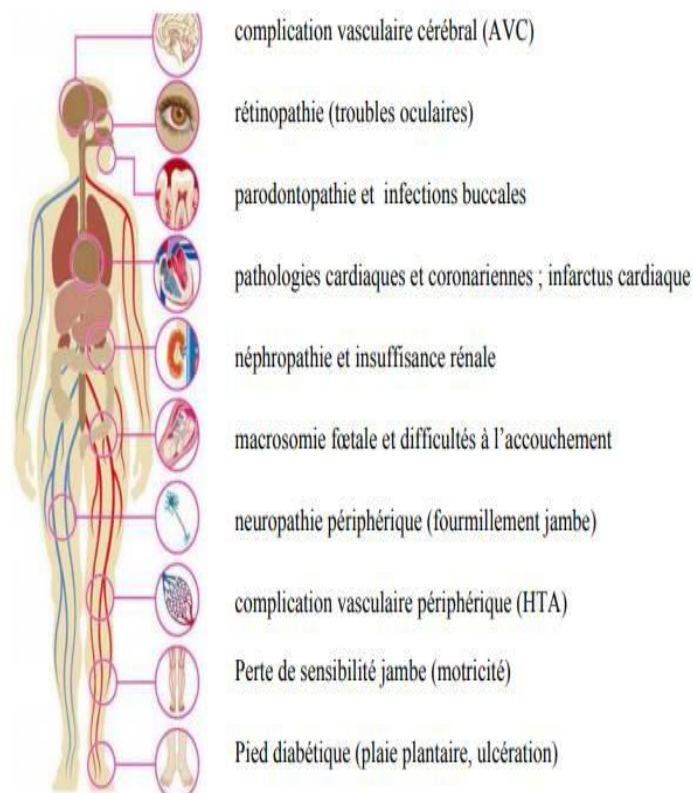


Figure 4 : Localisation des différentes complications micro et macroangiopathiques associées au diabète de type 2 [29].

1.3.2.3. Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel ou diabète gravidique touche 4 à 7 % des femmes enceintes, il disparaît après l'accouchement. Le traitement repose sur l'administration d'insuline à la femme enceinte lorsque la mise en place des mesures hygiéno-diététiques ne suffit pas à contrôler la glycémie. Une macrosomie est très souvent retrouvée dans ce type de diabète. Les risques d'éclampsie ou de pré-éclampsie et la mortalité néonatale sont augmentés. A plus long terme, les patientes ayant présentées un diabète gravidique au cours de leur(s) grossesse(s) déclarent plus

fréquemment un diabète de type 2. Le nouveau-né, né de mère atteinte de diabète gestationnel, présente un risque plus élevé d'obésité et/ou de diabète de type 2 [26].

1.3.2.4. Autres types de diabètes sucrés

Ils sont secondaires à une autre maladie : maladies pancréatiques (pancréatites chroniques, carcinomes...), endocrinopathies (hyperthyroïdie, syndrome de Cushing, hyperaldostérionisme primaire, phéochromocytome...), ou peuvent être secondaires à la prise de médicaments : thiazidiques, antihypertenseurs, pilules contraceptives, corticoïdes... [20].

1.4. Epidémiologie

Le diabète est l'une des principales urgences mondiales en matière de santé. Il figure parmi les 10 premières causes de décès au monde et représente, avec les trois autres grandes maladies non transmissibles (MNT) (maladies cardiovasculaires, cancers et maladies respiratoires chroniques), Plus de 80% de tous les décès prématurés dus à des MNT. Le fait que 30-80 % des personnes atteintes de diabète ne soient pas diagnostiquées contribue dans une large mesure à la problématique du diabète [30].

Dans son rapport intitulé Diabètes Atlas 2019 Edition 9, la Fédération Internationale du Diabète (FID) a estimé que 463 millions d'individus vivent avec le diabète dans le monde ce qui correspond à 8,3% de la population adulte âgée de 20 à 79 ans. Environ 79 % vivent dans des pays à faible et moyen revenu. Selon la même source, ces chiffres atteindraient 578 millions en 2030 et 700 millions en 2045. Ce sont les régions dont l'économie évolue d'un faible revenu à un revenu moyen qui connaîtront la hausse la plus importante. Les estimations du diabète sont en hausse depuis plusieurs décennies. Plus d'un tiers des cas de diabète seraient le résultat de la croissance et du vieillissement de la population, 28 % d'une hausse de la prévalence selon l'âge et 32 % de l'interaction de ces trois facteurs.

La prévalence du diabète chez les femmes de 20-79 ans est estimée à 8,4 %, un pourcentage légèrement inférieur aux hommes (9,1 %). La prévalence du diabète devrait augmenter à 9,7 % chez les femmes et 10,0 % chez les hommes. C'est le groupe d'âge des 65-79 ans qui affiche la prévalence du diabète la plus élevée tant chez les femmes que chez les hommes. Cependant que 90 % des cas de diabète sont de type 2. L'incidence de ce type de diabète augmente notamment avec l'urbanisation, le vieillissement des populations et la précarité.

En 2019, 7,5 % de la population adulte mondiale (374 millions) présentait un pré-diabète (intolérance au glucose), ces individus ont un risque élevé de développer un diabète de type 2.

La majorité d'entre eux (72,2%) vivent actuellement dans les pays en voie de développement où le mode de vie est en train de se transformer. Il est prévu que 454 millions soit 8,0 % de la population mondiale (20-79 ans), seraient atteints par l'intolérance au glucose d'ici 2030 et 548 millions soit 8,6 % d'ici 2045

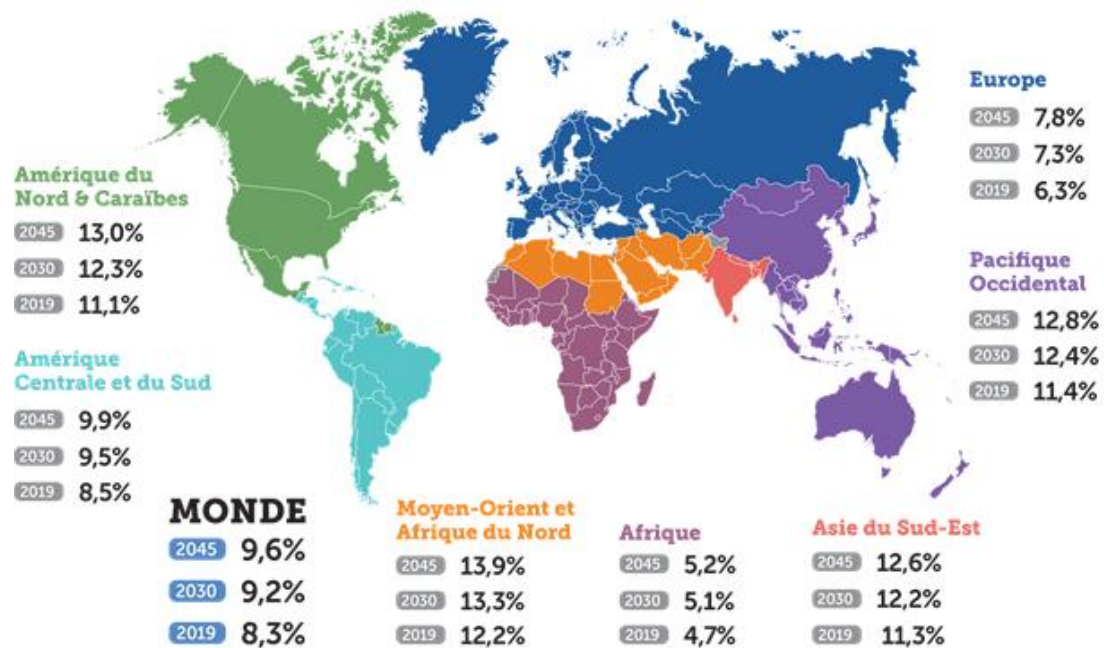


Figure 5 : Répartition mondiale du diabète selon la Fédération Internationale du Diabète [31]

1.5. Traitement médicamenteux

Ce type de traitement regroupe deux types de médicaments ; les antidiabétiques oraux et l'insuline injectable.

1.5.1. Antidiabétiques oraux

Selon leurs modes d'action, on peut regrouper ces médicaments en deux grandes classes :

a) Antidiabétiques hypoglycémiants

➤ Les sulfamides

Ces médicaments agissent en stimulant le pancréas pour qu'il sécrète plus d'insuline, ce qui augmente l'entrée du glucose dans les cellules de l'organisme. Ainsi, ils diminuent la glycémie en augmentant la libération d'insuline par le pancréas. Ex : gliméripide [32].

Les inhibiteurs de la DPP-4 et analogues du GLP-1 Ces médicaments agissent sur un processus naturel de l'organisme, le système des incrétines, ce qui stimule le pancréas à libérer plus

d'insuline, diminue la production de glucose par le foie et diminue la sécrétion du glucagon par les cellules α pancréatique. Ex : januvia [33]

b) Antidiabétiques anti-hyperglycémiants

➤ Les biguanides

Ils empêchent l'élévation de la glycémie en diminuant la fabrication de glucose par le foie et en augmentant l'utilisation du glucose par les cellules. Elle ne stimule pas la production d'insuline. Ex : métformine [34]

➤ Les inhibiteurs de l'alpha glucosidase

Ils agissent localement dans l'intestin. Ils provoquent un délai d'absorption des glucides en retardant la digestion des sucres complexes (chaînes de plusieurs sucres) en sucres simples. Ceci diminue donc, le pic de la glycémie après les repas. Leurs effets se manifestent sans délai, dès la première dose. Ex : l'acarbose [32]

c) Les thiazolidinédiones

Ils agissent en potentialisant l'action de l'insuline, en augmentant la sensibilité des tissus à cette dernière. Ex : Avandia [34]. Par contre, les Thiazolidinédiones ou glitazones, ne sont plus commercialisés en Europe, pour des effets secondaires graves et surtout leur risque carcinogène [33]

1.5.2. L'insuline injectable (insulinothérapie)

L'insuline n'est pas le traitement idéal du diabète non insulino-dépendant car si elle permet de baisser les glycémies en favorisant le transport et le métabolisme du glucose intramusculaire, elle facilite la prise de poids en stimulant la lipogenèse [34]. Mais en cas d'échec du traitement antidiabétique oral, les recommandations préconisent le recours à une insulinothérapie tout en conservant les antidiabétiques oraux [35]

1.6. Traitement du diabète par les plantes médicinales

Selon le rapport de l'OMS, 80 % de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour se traiter de diverses maladies. Ce taux remarquablement élevé, peut être expliqué par l'efficacité thérapeutique de ces remèdes naturels prouvée au sein de la population, et aussi par leur disponibilité et leur faible coût. Cette pratique médicale très ancienne, qui est fondée sur l'utilisation d'extraits de plantes et de principes actifs naturels est connue sous le nom de la phytothérapie [36]. De nombreux polyphénols participent à cette activité hypoglycémiante :

l'oleuropéine donne de meilleurs résultats que l'extrait total de feuilles d'olivier pour la production d'insuline, l'hydroxytyrosol améliore la sensibilité à l'insuline, la lutéoline inhibe l'augmentation postprandiale de la glycémie.

1.7. Le stress oxydant et le diabète

1.7.1. Définition

Dans une cellule eucaryote normale, l'énergie nécessaire à son fonctionnement se fait de façon aérobie en utilisant des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions font intervenir des oxydants ou accepteurs d'électrons et des réducteurs ou donneurs d'électrons. Elles ont lieu dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, qui fournit 90% de l'énergie nécessaire [37]. Dans cet organelle intracellulaire, l'oxygène est l'accepteur final d'électron après une cascade de réactions d'oxydo-réduction, faisant intervenir quatre complexes protéiques. Lorsque l'oxygène est transformé en molécule d'eau, cela permet de générer de l'ATP (adénosine triphosphate), molécule à haut potentiel énergétique (figure 6).

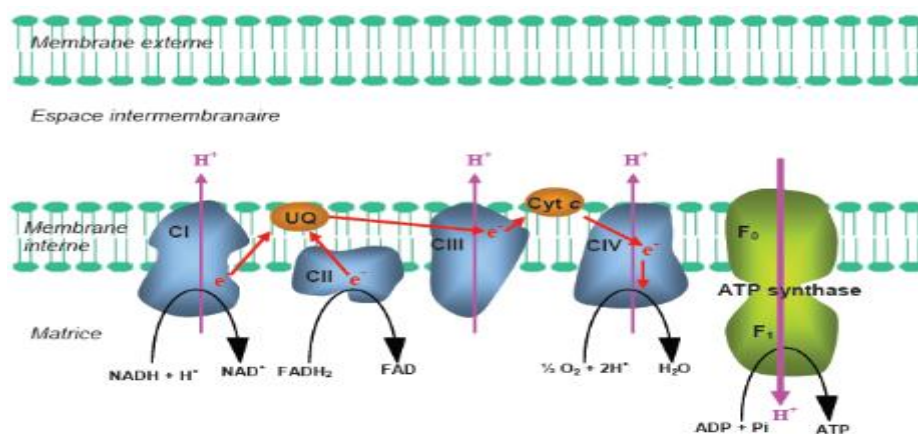


Figure 6 : chaîne respiratoire de la mitochondrie [38]

Cependant 2 à 3% de l'oxygène n'est pas réduit en eau; il est dévié pour former des radicaux libres ou des espèces dérivées de l'oxygène très réactives [39]. Ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes antioxydants. Quand un déséquilibre apparaît entre molécules pro-oxydantes et antioxydantes, en faveur des entités oxydantes, on parle alors de stress oxydant [40]. Il peut être la cause de système antioxydant défectueux ou d'une production importante d'entités oxydantes.

1.7.2. Les entités oxydantes et leur production [41]

Les entités oxydantes sont souvent des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire ou non apparié sur la dernière couche électronique. Cet électron célibataire n'est pas compensé ce qui provoque des dérèglements dans leur champs magnétique, rendant ainsi ces espèces très instables. Elles vont alors tenter de récupérer des électrons sur d'autres molécules comme les substrats biologiques, en les oxydant. Il existe majoritairement trois grandes familles d'espèces réactives :

- Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species), issues de la réduction incomplète de l'oxygène, dont le précurseur est l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Il est à l'origine de la formation d'autres ROS tel que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyl $OH\cdot$. L'oxygène singulet 1O_2 est également une entité oxydante.
- Les espèces réactives de l'azote ou RNS (Reactive Nitrogen Species) qui donnent entre autres des peroxynitrites ($ONOO^-$), du monoxyde d'azote $NO\cdot$ et le radical peroxyde ($ROO\cdot$).
- Les espèces réactives du chlore ou RCS (Reactive Chlorine Species) comme l'acide hypochlorique, $HOCl$. Enfin, il existe d'autres variétés d'entités oxydantes ou de radicaux, comme par exemple l'acide hypobromique, $HOBr$.

1.7.2.1. La production des entités oxydantes au niveau cellulaire

Le précurseur des ROS, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est formé après réduction de l'oxygène O_2 par un électron et en présence d'un cofacteur NADPH. Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique [42]. Les différentes enzymes permettant cette réaction sont: la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases ou COX, les lipo-oxygénases, les Nitric Oxyde Synthases (NOS), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie [43] (figure 6). Les NOS génèrent normalement du monoxyde d'azote NO , mais lorsque la concentration de son cofacteur, la tétrahydrobioptéridine (BH_4) diminue, elle produit $O_2^{\cdot-}$. De plus, le NO formé par les NOS peut réagir avec l'anion superoxyde pour former des peroxynitrites, un composé oxydant secondaire. Les superoxydes dismutase (SOD) vont ensuite dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui est relativement stable et peut diffuser au travers des membranes. Cette molécule donne ensuite via la réaction de Fenton (non enzymatique) une entité très réactive, le radical hydroxyle, $OH\cdot$. Le peroxyde d'hydrogène peut également entrer dans une

voie alternative et être converti en eau par les enzymes catalase et glutathion peroxydase (figure 7)

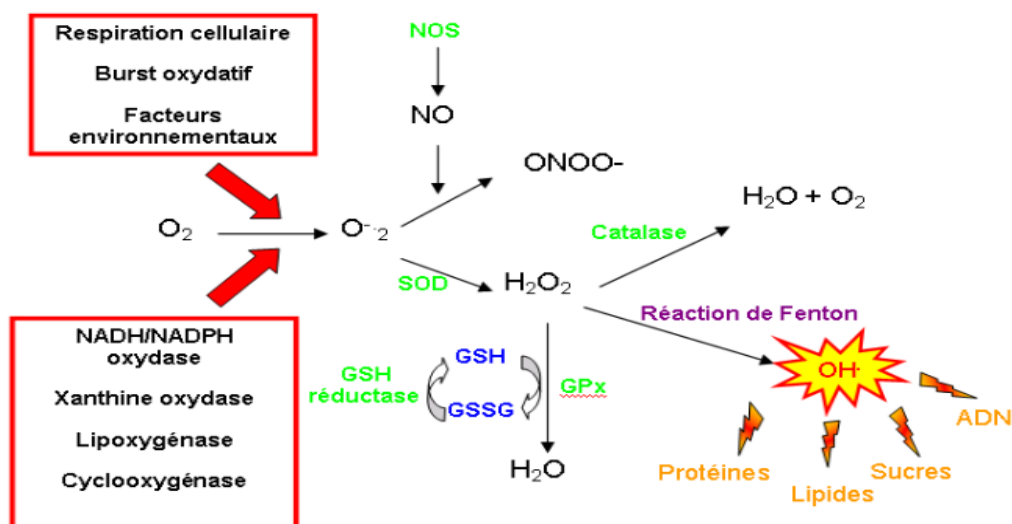


Figure 7 : schéma récapitulatif des sources des ROS, des enzymes impliquées dans la défense antioxydantes et des cibles biologiques [44]

La réaction de Fenton implique des métaux de transition. L'oxydation de l'ion ferreux (Fe^{2+}) en ion ferrique (Fe^{3+}) en présence de peroxyde d'oxygène H_2O_2 génère le radical hydroxyle, le plus puissant oxydant de la famille des ROS, car il ne peut être détruit enzymatiquement. La réaction de Fenton peut se faire directement à partir de l'anion superoxyde pour générer le même radical (figure 8).

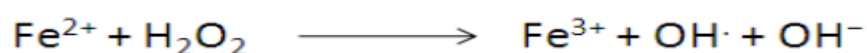


Figure 8 : Réaction de Fenton [40]

1.8. Les cibles biologiques du stress oxydant

Les entités oxydantes étant très réactives, elles réagissent avec les premières molécules qu'elles rencontrent. Elles ont comme cibles les lipides, les acides nucléiques, les protéines et les sucres [45].

1.9. Implications du stress oxydant dans le diabète et pathologie associée

Une production importante de ROS joue un rôle dans la pathogénèse de nombreuses maladies. Ils sont impliqués dans l'ischémie/re-perfusion, les maladies neurodégénératives, les

cancers, l'infarctus, le diabète, l'hypertension mais aussi dans la formation des lésions vasculaires de l'athérosclérose [46].

1.9.1. Le diabète

Lors de la pathologie diabétique, l'hyperglycémie constitue un stress oxydant [47]. Elle est responsable de l'augmentation de la glycolyse qui par accroissement du potentiel de membrane mitochondriale augmente la formation de radicaux. De plus, elle inhibe la glyceraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase ce qui diminue la formation du cofacteur réduit NADPH, H^+ essentiel à la régulation de l'homéostasie redox [48]

1.9.2. Glutotoxicité liée à l'hyperglycémie

Les mécanismes de la toxicité du glucose au niveau des tissus cibles des complications du diabète sont multiples [49]. Le glucose exerce son effet toxique et forme des ROS par différents mécanismes. Il a été montré chez des rats Goto-Kakizaki (GK), diabétiques de type 2, non obèses, une augmentation des marqueurs du stress oxydant suite à une hyperglycémie [50]. Les mécanismes conduisant à la formation de ROS sont notamment, le phénomène d'auto-oxydation du glucose, la voie des polyols, la voie de la PKC et la glycation des protéines avec formation des produits avancés de fin de glycation (AGEs).

1.9.2.1. Auto-oxydation du glucose

L'auto-oxydation du glucose a été décrite par Wolff et Dean (1987) [51]. Le glucose dans sa forme linéaire (projection de Fischer) possède une fonction aldéhyde et une fonction hydroxyle adjacente en équilibre avec la forme ène-diol (figure 9).

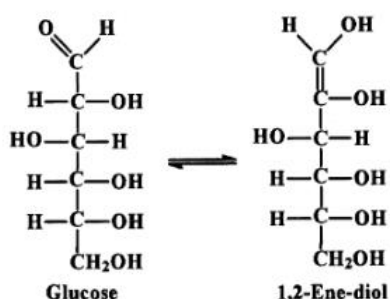


Figure 9 : Représentation selon la projection de Fischer du glucose et de sa forme ène-diol [52]

C'est sous cette dernière forme que le glucose est capable de façon isolée de s'oxyder en présence de métaux de transition, aboutissant à la formation d'un radical anionique ène-diol. Ce radical peut ensuite réagir avec l'oxygène pour libérer des anions superoxydes. Au cours de cette réaction, il y a formation d' α -cétoaldéhyde, qui peut réagir avec des métaux de transition via la réaction Fenton pour former des radicaux hydroxyles très réactifs [53,54,55,]

1.9.2.2. Voie des polyols

A l'état de normoglycémie, le glucose est transformé par l'hexokinase en glucose-6-phosphate pour rejoindre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Cependant, dans le cas d'une hyperglycémie, l'hexokinase est saturée [56]. Le glucose, de ce fait, s'accumule dans les tissus périphériques et active une voie accessoire, la voie des polyols. Dans cette voie, le glucose est transformé en sorbitol par l'aldose réductase, qui n'est activée qu'en présence d'une hyperglycémie, car elle possède une faible affinité pour le glucose [57]. La réaction a lieu en présence du cofacteur NADPH, H^+ issu de la voie des pentoses phosphates. Le sorbitol est ensuite transformé en fructose par le sorbitol déshydrogénase, dont le cofacteur est le NAD^+ (figure 10). Le sorbitol, qui ne peut pas franchir la membrane plasmique, s'accumule dans la cellule, et augmente la pression osmotique, entraînant une hyperosmolarité intracellulaire [58]. La production accrue de fructose par cette voie peut également stimuler la formation des AGEs grâce au plus grand pouvoir réducteur du fructose par rapport au glucose [59].

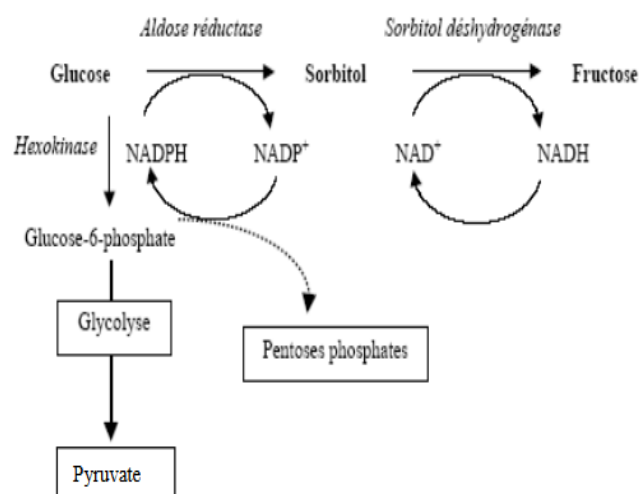


Figure 10 : Voie des polyols et autres voies du catabolisme du glucose [60]

L'activation de cette voie peut avoir des effets délétères [61]. La principale conséquence est la modification du statut redox intracellulaire résultant de la baisse en NADPH, H^+ , au détriment du fonctionnement de nombreuses enzymes antioxydantes comme la glutathion-réductase, l'ascorbate-réductase et la NOS qui utilisent ce cofacteur [62]. Cette baisse de cofacteur et de GSH réduit augmente la sensibilité de la cellule au stress oxydant [63].

1.9.2.3. Voie de la PKC

Une hyperactivité de la protéine kinase C au cours du diabète dans de nombreux tissus est une des hypothèses avancées [64]. L'hyperglycémie induit une synthèse accrue de diacylglycérol (DAG) à partir des intermédiaires de la glycolyse, qui est un cofacteur activateur des différentes isoformes de la PKC [65]. L'augmentation de l'activité de l'enzyme induit une augmentation de l'expression des gènes néfastes pour la cellule et au contraire, diminue celle des gènes bénéfiques. En effet, elle augmente l'expression de facteurs vasoconstricteurs (endothéline-1) en diminuant ceux vasodilatateurs (NO). Elle induit également l'expression de gènes pro-inflammatoires et augmente la production de ROS par la NADPH oxydase [63] (figure 11).

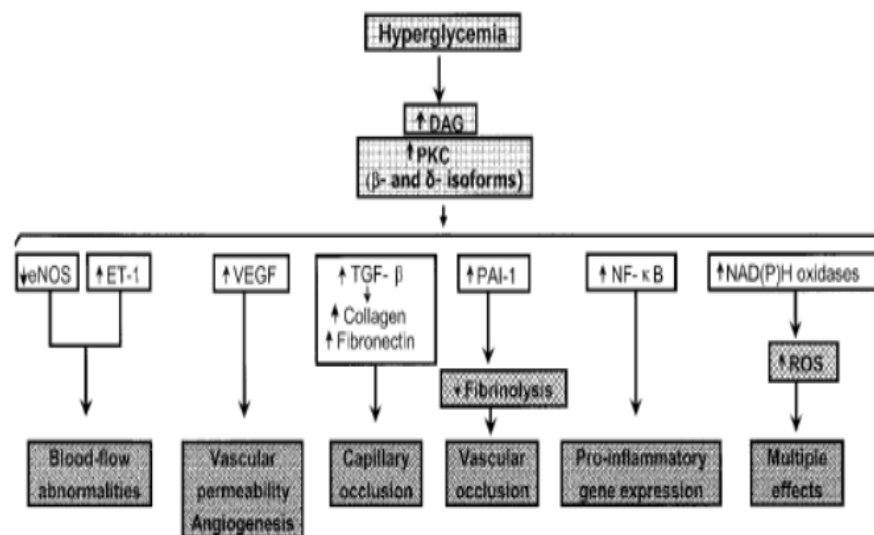


Figure 11 : Conséquence de l'activation de la PKC induite par l'hyperglycémie [63]

1.9.3. Glycation des protéines et formation des AGEs

1.9.3.1. Formation des AGEs

Un autre rôle cytotoxique du glucose concerne la glycation lente non enzymatique des protéines [65]. Le glucose (ou autre sucre réducteur) réagit avec la fonction amine N-terminal des protéines ou d'un acide aminé, le plus souvent une lysine, ce qui permet la formation d'une base de Schiff qui se réarrange en produit d'Amadori. Cette réaction est très dépendante du temps d'exposition au sucre et de la concentration de celui-ci. La formation de ces composés est réversible [66]. Par la suite, les produits d'Amadori se dégradent irréversiblement en α -céto-aldéhyde comme le 1 et 3-désoxyglucosone, qui peut encore réagir avec des protéines pour former des adduits fluorescents appelés produits de Maillard [67, 68, 69] (figure 12).

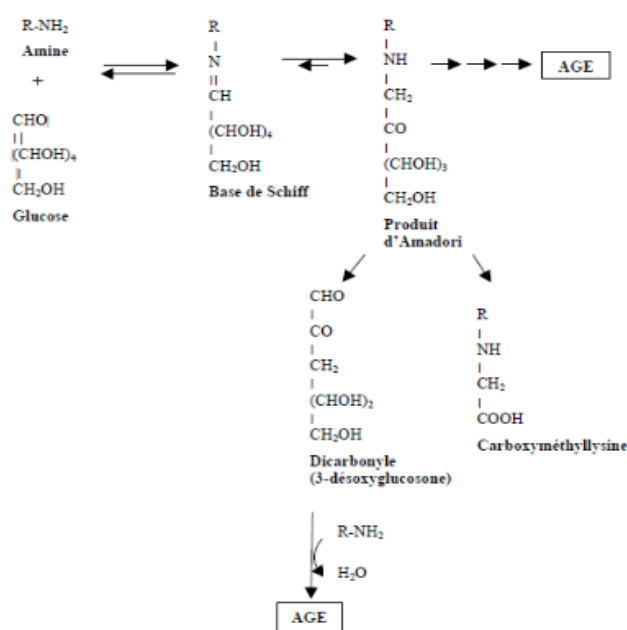


Figure 12 : Formation des AGEs par la voie de Maillards [60]

Les produits de Maillard sont aussi appelés produits de glycation avancées (AGEs) et sont fortement mutagènes. De plus, ils ne peuvent pas être détruits car le protéasome ne peut détruire les protéines glyquées. Ces produits s'accumulent alors dans la cellule et peuvent entraîner un dysfonctionnement de son métabolisme, finissant par engendrer sa mort. La formation d'AGEs est dépendante des ROS ; elle est augmentée par la production de MDA et

par la diminution de GSH réduit [70]. Une fois formées, les protéines glyquées produisent également des anions superoxydes [71]. La glycation touche des protéines comme l'albumine, les immunoglobulines, le fibrinogène, le collagène et les LDL. La protéine glyquée la plus connue est l'hémoglobine glyquée, HbA1c dont le taux est utilisé en clinique comme indice du contrôle métabolique de la glycémie [72].

1.9.4. Conséquences de la glycation

La glycation peut provoquer une altération des activités enzymatiques (présence d'un résidu lysine glyquée au voisinage du site actif de l'enzyme ou modification de la conformation de l'enzyme), la formation d'agrégats entre les protéines [73] et la perte d'une partie des propriétés mécaniques de la paroi vasculaire par épaissement de celle-ci et par diminution de la fluidité membranaire. La glycation au niveau des acides nucléiques entraîne des cassures des chromosomes, une atteinte des processus de réparation, de réplication et de transcription.

1.10. Défenses antioxydantes des cellules β

Les cellules β pancréatiques sont très vulnérables au stress oxydant de par leur déficience en enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase à cuivre/zinc (Cu/Zn SOD) et la glutathion peroxydase [74, 75] (qui représentent la première ligne de défense contre le stress). De plus, elles présentent une faible concentration en glutathion réduit GSH [76]. Des études ont montré qu'une surexpression de la Gpx, de la CAT et de la SOD à cuivre/zinc dans des cellules insulino-sécrétrices les protégeaient du stress oxydant [77,78]. *In vivo*, d'autres études ont mis en évidence l'effet protecteur d'une surexpression de la SOD à cuivre/Zinc chez une souris transgénique en augmentant la tolérance des cellules β au stress oxydant induit par l'alloxane [79,80]. De plus, l'effet diabétogène de la streptozotocine est diminué chez des souris transgéniques surexprimant dans les cellules β , la thiorédoxine, une enzyme antioxydante [81]. Dans les cellules RINm5F, la surexpression de la catalase, de la Gpx et de la Cu/Zn SOD protège les cellules β contre la fragmentation de l'ADN induit par des cytokines [82].

1.11. Effet du stress oxydant sur l'insulino-sécrétion et l'insulino-résistance

Les ROS perturbent et inhibent l'insulino-sécrétion [83] en inhibant la transduction du signal du glucose dans les cellules β . En effet, le peroxyde d'hydrogène à une dose de 1mmol/L sur des îlots de souris, inhibe la sécrétion d'insuline en diminuant le ratio ATP/ADP intracellulaire. Par conséquent, une activation des canaux potassiques ATP-dépendant entraîne

une hyperpolarisation membranaire [84] qui empêche la libération de l'insuline par la cellule β (figure 13). Ces études ont été confirmées sur des îlots de rat [85] et humain [86] avec des doses en peroxyde d'hydrogène comprises entre 0,1 et 0,5mmol/L.

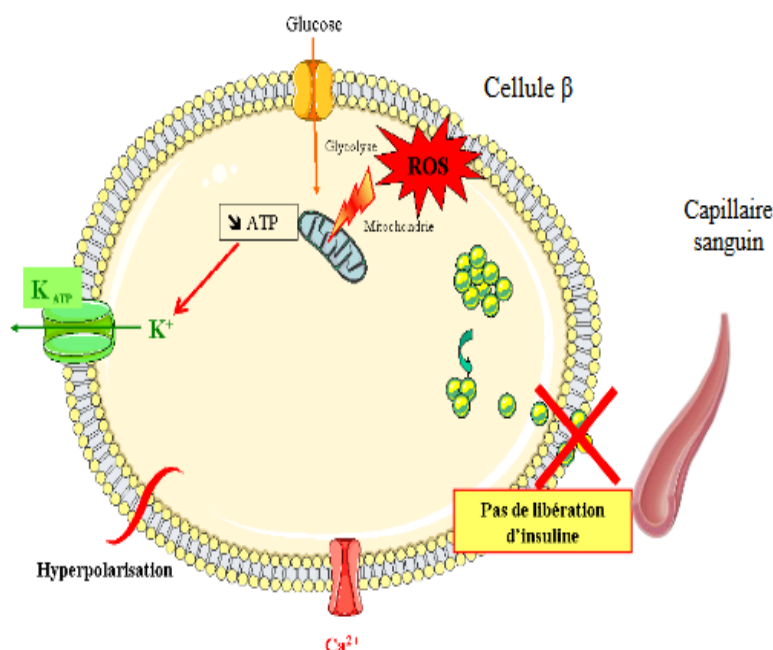


Figure 13 : Effet du stress oxydant sur l'insulino-sécrétion [60]

La baisse de la concentration en ATP est due à une attaque des ROS sur les mitochondries. La mitochondrie est une des premières sources de ROS mais elle est également sa principale cible. Elles peuvent inhiber la chaîne respiratoire [87] et endommager des composés mitochondriaux comme l'ADN mitochondrial. Ce dernier est dépourvu d'histones et de systèmes de réparation efficaces comparé à l'ADN nucléaire [88,89]. Il est donc plus sensible à l'attaque des espèces réactives. L'ADN mitochondrial, une fois altéré, perturbe également le fonctionnement de la chaîne respiratoire, générant des ROS. De plus, d'autres études ont montré que des produits de peroxydation lipidique comme le 4-HNE diminuent la sécrétion d'insuline [90].

Les ROS sont également impliquées dans l'insulino-résistance. Des études sur des cellules en culture démontrent que les ROS inhibent la transduction du signal de l'insuline. Elles empêchent l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline et par conséquent celle de la protéine IRS-1, conduisant à un blocage des voies en amont de la PI3K. La translocation du

récepteur GLUT4 est alors inhibée [91] ne permettant pas l'entrée du glucose dans la cellule (figure 14).

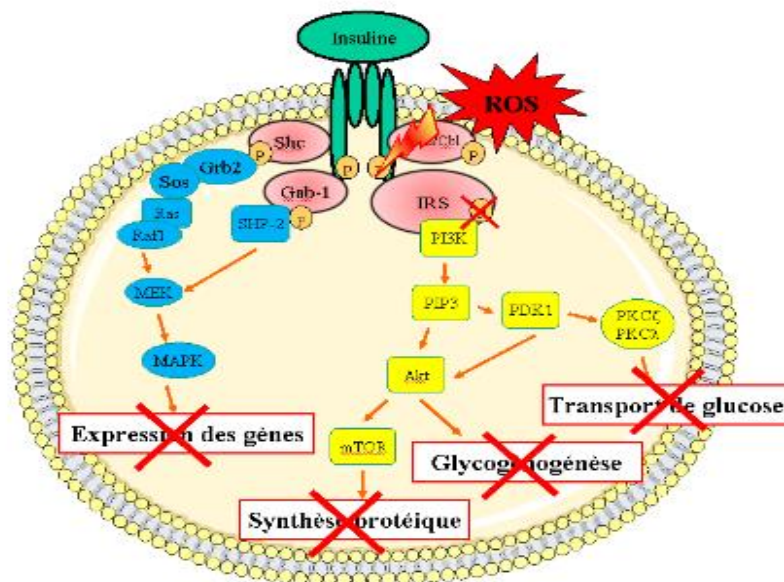


Figure 14 : Mécanisme de résistance à l'insuline induite par les ROS [60]

En effet, des concentrations de l'ordre de la micromolaire en peroxyde d'hydrogène suffisent à inhiber l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline sur des cellules en culture [92] entraînant ou favorisant l'insulino-résistance.

1.12. Préventions par les antioxydants [60]

Le terme antioxydant était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. À la fin du XIXe siècle et au début du XXe siècle les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire, par exemple, la corrosion des métaux. Les antioxydants, dans le cas présent, sont des molécules naturellement produites par le corps ou bien apportées par l'alimentation pour combattre les effets toxiques des radicaux lors du stress oxydant. La production des entités oxydantes est constamment en équilibre avec les systèmes de défenses antioxydantes (figure 15).

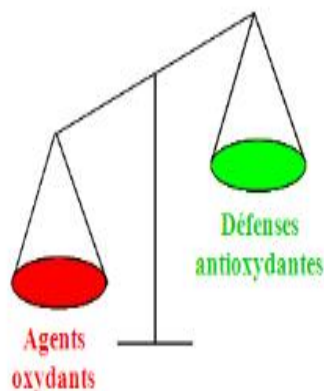


Figure 15 : Déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les systèmes de défenses antioxydantes lors du stress oxydant [60]

1.13. Les systèmes de défenses antioxydants

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydantes très efficaces afin de diminuer la concentration des entités oxydantes dans l'organisme. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat [93]. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire [94]. Il existe différents types de molécules qu'elles soient naturelles ou synthétiques et dont le mode d'action repose sur un système enzymatique (premières lignes de défense) ou non (molécules piègeuses d'électrons).

1.14. Les enzymes antioxydantes [60]

Les enzymes antioxydantes sont les premières lignes de défenses contre les entités oxydantes. Leur rôle est de diminuer la quantité de ROS présentes dans la cellule. Parfois ces enzymes nécessitent des oligo-éléments (Cu, Zn, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour pouvoir exercer leur activité enzymatique.

1.14.1. Superoxydes dismutases (SOD)

Les SOD sont les premières enzymes à intervenir dans la cascade des ROS. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène, selon la réaction suivante (figure 16).

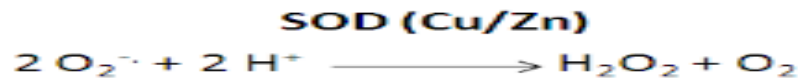


Figure 16 : Réaction de dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène

IL en existe trois isoformes décrites chez les mammifères [95]: la SOD à Manganèse (Mn) dans les mitochondries, à cuivre (Cu) ou à zinc (Zn) dans le cytoplasme et les mitochondries, et des formes Cu/Zn SOD extracellulaires. Les deux dernières sont retrouvées dans les vaisseaux sanguins. Il existe des molécules chimiques de synthèse qui possèdent cette activité enzymatique et sont perméables aux membranes cellulaires. Elles sont appelées SOD mimétiques.

1.14.2. Catalase (CAT)

Le peroxyde d'hydrogène généré notamment lors de la dismutation de l'anion superoxyde est dégradé par la catalase. Cette enzyme est formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un groupe hème, qui constituent les sites actifs de la CAT. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, ce qui crée une molécule d'eau et un groupement intermédiaire Fe(IV)=O très oxydant; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène [60] . Cette réaction est illustrée par les deux demi-équations suivantes (figure17) :

L'enzyme est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes.

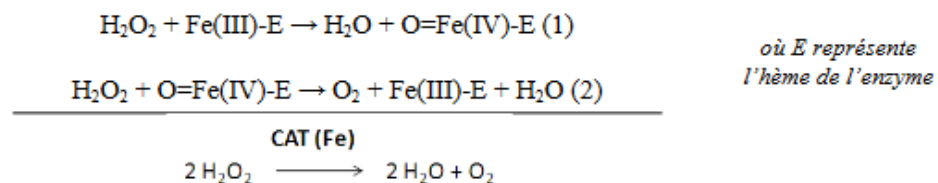


Figure 17 : Réactions d'oxydation de peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation du dioxygène

1.14.3. Glutathions peroxydases (GPx) et glutathions réductases (GR)

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. La Gpx est présente dans

les liquides extracellulaires (sang) et dans les cellules au niveau du cytoplasme et des membranes. Elle assure la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, des hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (ROH) et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires, grâce à la présence de glutathion réduit (GSH), selon le mécanisme suivant (figure 18):

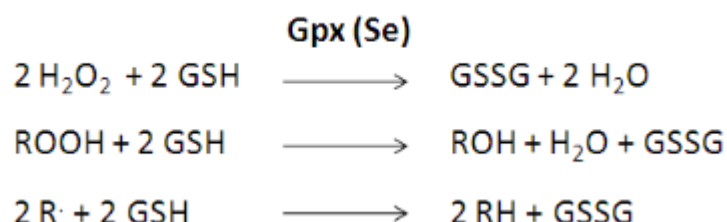


Figure 18 : Réaction du mécanisme d'action de la glutathion peroxydase

Les molécules toxiques sont ainsi transformées en molécules assimilables comme l'eau et l'alcool. Dans chacune de ces réactions, une molécule de glutathion oxydée GSSG est obtenue. Pour que cette réaction perdure, il doit y avoir un taux constant de GSH, ce qui est rendu possible par la glutathion réductase (GR). Elle catalyse la réduction du GSSG en GSH (figure 19), à l'aide du cofacteur NADPH sous forme réduite (NADPH, H⁺). Le NADPH, H⁺ provient de l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, de la voie des pentoses phosphates [60].



Figure 19 : Réaction de réduction GSSG en GSH

1.15. Les systèmes antioxydants non enzymatiques et leurs effets

Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont des nutriments naturellement apportés par l'alimentation ou par des composés endogènes. Ils peuvent avoir un rôle de «scavenger», c'est-à-dire qu'ils ont la capacité de piéger les entités oxydantes en captant leur électron libre et en formant ainsi des entités plus stables qui pourront être éliminées par d'autres systèmes antioxydants. Les principales molécules sont le glutathion (GSH), la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (acide L-ascorbique), la vitamine A (caroténoïde) et les polyphénols [60].

1.16. Importance des antioxydants alimentaires

Lors d'un stress oxydant, les défenses sont saturées et insuffisantes. Les apports exogènes d'antioxydants peuvent suppléer cette insuffisance. En effet, la vitamine E, C, les caroténoïdes et les polyphénols apportés par l'alimentation ont des effets directs sur les constituants cellulaires et circulants [96]. De plus, les oligo-éléments comme le zinc, le sélénium, le manganèse ou le cuivre, apportés par le bol alimentaire, permettent de faire fonctionner des enzymes antioxydantes comme les superoxydes dismutases [96]. La plupart des antioxydants de l'alimentation proviennent des végétaux c'est-à-dire des fruits, des légumes, des plantes ou des racines mais aussi des déchets de certaines plantes tel que le grignon et les margines d'olive. Les antioxydants vont réduire les radicaux libres ; chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre [97]. De nombreux végétaux contiennent des antioxydants. Souvent, la mesure de la capacité antioxydante totale (CAT) est réalisée par la procédure ORAC «Oxygen Radical Absorbance Capacity». L'unité ORAC est exprimée en micromoles d'équivalents de Trolox ou TE (dérivé soluble de la vitamine E, perméable aux cellules). Cette valeur mesure la capacité de l'aliment à neutraliser le radical peroxyde. Il a été démontré que, pour avoir un impact significatif sur la capacité antioxydante du plasma et des tissus, la consommation de molécules antioxydantes doit être comprise entre 3 000 et 5 000 unités ORAC [98].

1.17. Risque des antioxydants

Un antioxydant peut devenir pro-oxydant et avoir l'effet contraire de celui escompté à partir du moment où la dose ingérée est trop importante. Ainsi, lors des suppléments, il ne faut pas dépasser les doses indiquées. De plus, les antioxydants ingérés dans le bol alimentaire n'ont pas la même biodisponibilité que s'ils sont ingérés sous forme purifiée. Par exemple, une ingestion de 100 mg de quercétine par l'alimentation augmente son taux sanguin, mais la prise de 100 mg de quercétine purifiée augmente 10 fois son taux sanguin, dose qui devient alors toxique. Ainsi, le catabolisme oxydant de la quercétine conduit à la formation de produits secondaires, qui facilitent la formation des anions superoxydes et diminuent le GSH [99]. Des études ont également montré que l'oxydation des polyphénols antioxydants génère des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène et des complexes qui sont potentiellement toxiques [100].

1.18. Les antioxydants dans le diabète

De nombreux antioxydants sont utilisés dans la pathologie diabétique, notamment à l'aide d'une supplémentation en vitamines, coenzyme et oligo-éléments. En effet, une étude a montré qu'une supplémentation en vitamine E permet de protéger contre la glycation des protéines et des radicaux libres [101, 102]. De plus, elle a des effets positifs sur l'action de l'insuline chez des patients diabétiques de type 2 [103,104]. Elle permet de réduire la glycémie, l'hémoglobine glyquée (HbA1c), les triglycérides, les acides gras libres et le cholestérol total. La vitamine C est d'un grand intérêt également car cet antioxydant hydrosoluble permet de régénérer la vitamine E et le GSH.

Une supplémentation en cette molécule permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline [105]. Cependant, des études ont montré qu'il n'y avait pas d'effet de la vitamine C chez des sujets témoins [106] et chez des patients diabétiques de type 2 insulino-résistants, à forte dose [107]. Il a été également rapporté qu'une supplémentation en vitamine D pendant les premières années de la vie diminue significativement le risque de développer un diabète de type 1 [108,109].

L'étude DAISY «*Diabetes Autoimmunity Study in the Young*» a montré qu'une alimentation comprenant des acides gras riches en oméga 3 (acides gras polyinsaturés) était associée à une réduction du risque de développer une auto-immunité au niveau de l'îlot chez des enfants prédisposés génétiquement au diabète de type 1 [110]. L'acide lipoïque est un cofacteur notamment des enzymes du cycle de Krebs. Son rôle antioxydant est moins connu que celui des vitamines E ou C. Sur des modèles animaux de diabète de type 1 et 2, l'acide lipoïque améliore la sensibilité à l'insuline dans les cellules musculaires [111]. Il améliore également cette sensibilité chez le patient diabétique de type 2 après administration intra veineuse (iv) ou per os (ou voie orale) [112]. Son mécanisme d'action est inconnu, mais des données *in vivo* suggèrent qu'il permet le maintien du GSH réduit en présence du stress oxydant et qu'il empêche l'activation des inhibiteurs des kinases (IKK β) permettant la restauration de la sensibilité à l'insuline [113]. Ruderman et Prentki (2004) ont également montré que l'acide lipoïque améliore l'insulino-sensibilité en ayant un effet sur l'AMP kinase [114]. Enfin, Bouloumie et *al.* (1994) ont montré qu'une administration de GSH en infusion chez des patients diabétiques de type 2 a également un effet bénéfique sur la sensibilité de l'insuline [115].

1.19. Les composés d'origine naturelle non vitaminique

Outre la supplémentation en vitamines et oligo-éléments, les cultures anciennes utilisaient les plantes ou la nourriture pour se prémunir des maladies. Ainsi, dans la médecine traditionnelle

indienne, l'utilisation de l'écorce d'un arbre de la famille des fabacées, *Pterocarpus marsupium roxb*, était utilisée pour soigner le diabète. Mais d'autres végétaux ou fruits ont des propriétés hypoglycémiantes comme le melon amer, le ginko, les ails et les oignons. En 1988, des études cliniques menées à Mexico ont montré l'effet hypoglycémiant du nopal, un cactus plus connu sous le nom de figuier de Barbarie [116]. Le fenugrec a également des propriétés hypoglycémiantes dans le diabète de type 1 [117] et les feuilles de bleuets dans le diabète de type 2 [118] conduisent à une diminution du LDL. Enfin la cannelle à des doses de 1 à 6g, permet de diminuer les risques de complications cardiovasculaires en améliorant la sensibilité à l'insuline chez des patients diabétiques [119]. Les cosse de haricot permettent également de diminuer la glycémie car elles sont riches en flavonoïdes.

1.20. Les polyphénols

Ils représentent un groupe important de composés issus des plantes ayant des effets protecteurs envers de nombreuses pathologies, comme les maladies cardiovasculaires et les cancers. Il existe des composés non azotés qui sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzène avec plusieurs groupements hydroxyle qui peuvent être libres ou liés à d'autres fonctions chimiques [120].

L'activité antioxydante des polyphénols est due au caractère acide de la fonction phénol (donneur d'hydrogène) et à sa possibilité d'établir des liaisons hydrogènes. Cela lui confère la capacité de complexer les métaux, de se combiner à des molécules nucléophiles et de faire des réactions d'oxydoréduction [121]. Leur possibilité de piéger les radicaux libres est due à leur fonction hydrogène.

1.20.1. Implication de quelques biophénols du grignon d'olive dans le diabète

L'hydroxytyrosol, souvent abrégé HT ou HTyr, et le tyrosol abrégé Tyr sont des dérivés métaboliques de l'oleuropéine après hydrolyse et sont structurellement similaires. Ils sont fortement présents dans les déchets de l'industriel oléicole (grignon et margine). De nombreuses recherches ont été menées au cours des vingt dernières années pour tenter de déterminer les effets sur la santé de l'oleuropéine [122], de l'hydroxytyrosol, du tyrosol et d'autres composés phénoliques présents dans l'huile d'olive [123, 124, 125, 126, 127]. Les preuves montrent que l'hydroxytyrosol a des propriétés antioxydantes, affecte l'homéostasie du glucose et des lipides et peut protéger contre le diabète [127, 128, 129, 130, 131].

1.20.1.1. Hydroxytyrosol

Par ailleurs, Les études expérimentales d'exposition à l'hydroxytyrosol (HT) des cellules musculaires squelettiques, des adipocytes, des hépatocytes et des cellules pancréatiques indiquent que l'HT peut avoir des effets qui pourraient être bénéfiques dans le traitement du diabète ou du syndrome métabolique [132]. Les quelques études ayant examinée les effets de l'HT sur les cellules musculaires squelettiques ont montré que l'HT peut augmenter la capacité oxydative et la santé musculaire en soutenant la biogenèse mitochondriale et en protégeant les myocytes du stress oxydatif, en plus d'augmenter l'absorption du glucose [133, 134, 135,136]. Plusieurs études exposant les adipocytes à l'HT rapportent une adipogenèse diminuée, une capacité mitochondriale améliorée et une accumulation de lipides réduite, cependant, une seule étude a rapporté une différenciation accrue des adipocytes [135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143,144]. La plupart des études sur la culture cellulaire des hépatocytes suggèrent que l'HT atténue le stress oxydatif dans le foie, avec un cas rapporté de synthèse lipidique réduite [145, 146, 147, 148, 149,150]. L'impact de l'exposition des cellules pancréatiques à l'HT n'a pas été établi, mais des recherches préliminaires indiquent qu'elle pourrait augmenter la sécrétion d'insuline et inhiber les dommages aux cellules amyloïdes β [151,152].

En outre, de nombreuses études utilisant des modèles expérimentaux de diabète chez les rongeurs ont montré que l'HT peut avoir des effets bénéfiques *in vivo* contre le diabète, l'obésité et les maladies métaboliques. Le diabète a été induit par voie chimique avec de l'alloxan ou de la streptozotocine, qui endommagent les cellules et inhibent la production d'insuline par le pancréas [153]. Ainsi, les études utilisant des rongeurs atteints de diabète induit par l'alloxane ou la streptozotocine ont montré que l'HT pouvait diminuer les taux sériques de glucose et de lipides, atténuer l'inflammation et réduire considérablement le stress oxydatif. L'impact nocif de l'hyperglycémie et du manque de production d'insuline sur le foie, le cœur, le cerveau, le pancréas et les cellules rétinienne a également été atténué par l'HT [151,154,155,156,157,158,159,160, 161,162,163].

Des expériences secondaires utilisant le Triton WR-1339 pour induire chimiquement l'hyperlipidémie ont également montré que l'HT diminuait les lipides sériques et les lésions hépatiques [161,163]. HT a également été étudié dans des modèles de souris génétiques db / db C57BL / 6J de diabète, dépourvus de récepteurs de leptine et développant l'obésité et l'hyperglycémie [153]. L'administration de HT à ces souris a été efficace pour réduire le glucose et les lipides sériques ainsi que pour contrôler le stress oxydatif dans le foie, les muscles et les tissus cérébraux [164,165]. La plupart de ces études ont rapporté que l'HT atténuait

l'augmentation des lipides sériques, du glucose et de l'insuline causée par les régimes riches en graisses. Ils ont également observé une réduction des dommages oxydatifs, une augmentation de la capacité antioxydante et une diminution de l'inflammation, avec le traitement à HT [164,166, 167, 168, 169, 170, 171,172]. Ces données suggèrent que l'HT a le potentiel de protéger les organes et les tissus des dommages causés par le diabète [132].

1.20.1.2. Tyrosol

Par ailleurs, le Tyrosol (2- (4-hydroxyphényl) -éthanol, Tyr) s'est révélé être un antioxydant cellulaire efficace, probablement en raison de l'accumulation intracellulaire, malgré sa faible activité antioxydante [173]. Le Tyr est un composé plutôt stable et donc, comparé à d'autres polyphénols, beaucoup moins sujet à l'auto-oxydation. Il maintient également une activité antioxydante dans des conditions critiques [174].

En outre, en présence de LDL oxydé, alors que les phénomènes d'autoxydation avaient déjà commencé, le Tyr a maintenu une activité antioxydante inchangée, tandis que d'autres flavonoïdes naturels plus actifs ont montré une réduction drastique de leur activité antioxydante et parfois même sont devenus pro-oxydants [174]

Il a été montré que le Tyr est efficace pour inhiber les dommages oxydatifs des cellules musculaires L6 en inhibant la mort cellulaire induite par H₂O₂ en partie grâce à la régulation des kinases régulées par le signal extracellulaire (ERK), de la kinase N-terminale c-Jun (JNK) et de la p38 MAPK et en augmentant la production d'ATP [175].

Les effets de Tyr sur la modulation des voies en amont régulant la réponse inflammatoire induite par le LPS ont été étudiés. L'étude a confirmé que le Tyr pouvait exercer ses effets bénéfiques contre l'hypertension, l'athérosclérose, les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque chronique, la résistance à l'insuline et l'obésité en modulant la régulation positive du cluster de différenciation 14 (CD14) et en inhibant l'inflammation [176]. Le Tyr réduit également les modifications oxydatives du HDL et en maintenant les propriétés physico-chimiques du HDL, améliore la fonctionnalité du HDL, en particulier la capacité à favoriser l'efflux de cholestérol [177]. Il possède également une activité antiathérogène due à l'inhibition de la production de leucotriène B₄ qui affecte la fonction endothéliale [174]. De plus, il a été montré que le Tyr induit une protection myocardique contre le stress lié à l'ischémie et pourrait être considéré comme une thérapie anti-âge [178].

Le traitement par le Tyr a amélioré l'hyperglycémie en régulant les enzymes clés du métabolisme des glucides chez les rats diabétiques induits par la streptozotocine [179]. Le Tyr

peut également jouer un rôle important dans le traitement du diabète, car il exerce des effets anti-inflammatoires sur le foie et le pancréas des rats diabétiques induits par la streptozotocine, et inhibe l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmatique dans les cellules β pancréatiques [180]. Le dysfonctionnement des cellules β pancréatiques est un facteur majeur déterminant du développement du diabète de type 2.

1.21. Digestion enzymatique et absorption intestinale des glucides

La digestion enzymatique des glucides et leur absorption par la muqueuse intestinale jouent un rôle dans la régulation de la glycémie. Ce rôle est d'ailleurs pris en compte dans la stratégie thérapeutique du diabète, tant par l'élaboration de conseils nutritionnels que dans le mécanisme d'action d'antidiabétiques oraux et cela en se basant sur l'action des alphas glucosidases et sur le transport intestinal du glucose (SGLT1, GLUT2), [181].

Les différentes glucosidases intestinales impliquées dans la digestion enzymatique des glucides sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Les principales glucosidases intestinales connues [182].

Glucosidases intestinales	Substrat	Produits de dégradation
Alpha-amylase	Amidon	Amylose + amylopectine
Sucrase-isomaltase (α -Glucosidase)	Saccharose, maltose, maltotriose	Fructose + Glucose
Maltase-glucoamylase	Maltose, maltotriose, α - dextrines	Glucose
Lactase	Lactose	Galactose + Glucose
α -Dextrinase	α -dextrines, maltose, maltotriose	Glucose

1.21.1. Alpha amylase

1.21.1.1.Définition

L' α -amylase comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires [183]. Elle est une enzyme ubiquitaire, synthétisée chez tous les êtres vivants [184]. C'est une endo-enzyme, de masse moléculaire comprise entre 40 et 70 kDa [185], qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4) de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' α -dextrines [186].

1.21.1.2.Structure

Les α -amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 3 domaines globulaires [183]. Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes (Figure 12). La partie glucidique est formée essentiellement de maltose, les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l' α -amylase est formée de 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α [187 ; 183].

1.21.1.3.origines

Les α -amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes [188, 189].

- a) Origine animale : l' α -amylase animale est généralement extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères tels que les porcs et les veaux [190, 191] .
- b) Origine végétale : l' α -amylase joue chez les plantes un rôle important dans le métabolisme glucidique, où elle participe à l'hydrolyse de l'amidon en produisant des sucres réducteurs (glucose et maltose) directement assimilables [192] . Cette enzyme végétale est généralement obtenue par extraction à partir des céréales notamment le blé, l'orge, le son ou le riz [193]. Elle est souvent formée au cours de la germination des grains [194] .
- c) Origine microbienne : on distingue les α -amylases fongiques et bactériennes. Les α -amylases fongiques diffèrent des amylases bactériennes par une inactivation par la température, un pouvoir élevé de saccharification et un pH optimal faible (4-5) [195].

1.21.1.4.Mécanisme d'action

En général, les α -amylases peuvent agir par différents modes d'action. Selon les conditions (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes [196, 197] .

- a) Attaque aléatoire ou au hasard : n'importe quelle liaison α -(1-4) peut être hydrolysée à partir de l'extrémité réductrice. Elle provoque la formation de glucose, maltose et surtout du D-dextrine [198].
- b) Attaque préférée : l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons glucosidiques dans le substrat [199].

- c) Attaque multiple ou répétitive : elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat et l'enzyme hydrolyse les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat [200].
- d) Mécanisme uni-chaîne : l'enzyme dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. Une fois que l'enzyme forme le complexe actif avec le premier substrat, elle catalyse la réaction et ne forme pas un autre complexe actif avec d'autres substrats jusqu'à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne [199] .
- e) Mécanisme multi-chaîne : toutes les chaînes sont dégradées parallèlement [2001].

1.21.1.5.Régulation de la synthèse de l' α -amylase

La répression catabolique de l'expression des gènes est un système de normalisation fondamental et omniprésent, afin de répondre aux changements de disponibilité nutritive. Des études ont démontré que la biosynthèse de l' α -amylase est régulée uniquement par répression au cours de la transcription et/ou au cours de la traduction [202]. Chez les micro-organismes, le glucose ou d'autres sources de carbone rapidement métabolisables, répriment l'expression des gènes qui codent pour des enzymes liées au métabolisme d'autres sources de carbone [203]. L' α amylase est inhibé par des molécules chimiques telles que l'acarbose dont la structure chimique est représentée dans le schéma ci-dessous (figure 21).

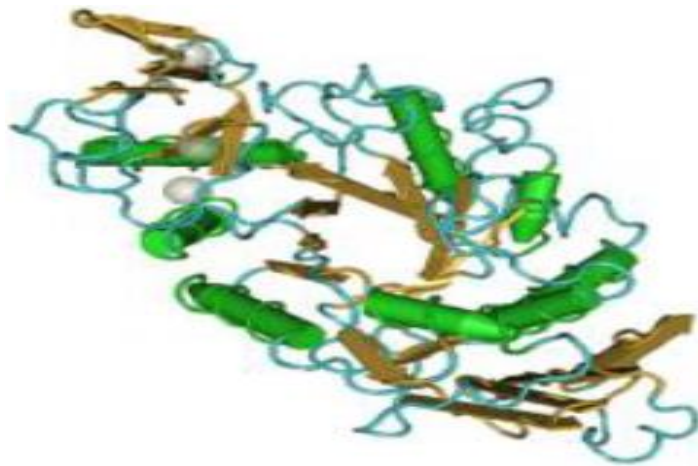


Figure 20 : Représentation des structures secondaire et tertiaire de l' α -amylase de l'orge [204]. Les flèches cylindriques en vert représentent les hélices α , et les flèches plates en brun représentent les feuillets β . Les sphères translucides représentent les ions Ca^{2+} .

1.22. Acarbose [205]

L'acarbose est un inhibiteur oral de l' α -glucosidase et de l' α -amylase utilisé dans la prise en charge du DT2. L'acarbose est un oligosaccharide complexe connu pour réduire et ralentir l'absorption intestinale du glucose, ce qui réduit par la suite la hausse postprandiale de la glycémie chez les patients atteints de DT2. Les patients atteints de DT2 reçoivent souvent une dose de départ recommandée d'acarbose de 50 mg trois fois par jour, qui peut être augmentée à une dose d'entretien de 100 à 200 mg trois fois par jour après 6 à 8 semaines si nécessaire. Par contre, une inhibition excessive de l' α -amylase pancréatique résultant d'une utilisation prolongée de l'acarbose peut entraîner l'accumulation de glucides non digérés dans le côlon et servir de substrat à la fermentation bactérienne ; les conséquences en sont des complications gastro-intestinales sévères telles que flatulences, diarrhée et distension abdominale.

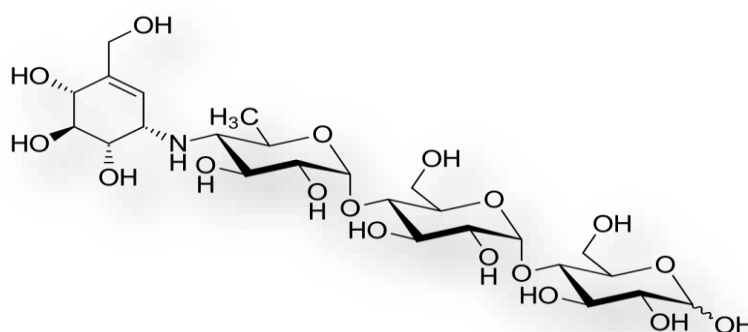


Figure 21 : structure de l'acarbose [206]

Matériels Et Méthodes

La partie expérimentale qui a pour but de mettre en évidence l'effet antidiabétique *in vitro* des différents échantillons résumés dans le tableau n°2, va consister tout d'abord à évaluer le contenu phénolique par la méthode de Folin - Ciocalteu (polyphénols totaux) et par la méthode trichlorure d'aluminium (flavonoïdes). Ensuite à l'évaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes (DPPH et ABTS).

1. Matériels

Les produits d'encapsulation qui nous a servis de support matériel dans cette expérience sont résumés dans le tableau ci-dessous

Tableau 2 : les différents produits étudiés constitués de composés phénoliques libres et encapsulés

Echantillons	Abréviation
Grignon d'olive avant encapsulation	GG départ
Encapsula de polyphénols de grignon d'olive sous micro-ondes	PP/A μ -ondes
Encapsula de tyrosol sous micro-ondes	Tyr/A μ -ondes
Encapsula de tyrosol sous chauffage conventionnel	Tyr/A conv

Pour rappel le grignon de départ a été acheté chez GRAPSUD, les encapsulas ont été obtenus par le procédé d'encapsulation dont la description a fait l'objet de la première partie de cette thèse.

1.1. Préparation des échantillons

Tous les échantillons ont été préparés selon le même protocole avant les différentes analyses, excepté le grignon qui a nécessité de petites modifications. Etant donné que, tous les échantillons sont tous issus de lyophilisation cela nous a facilité leur manipulation, ainsi : 30 mg de chaque lyophilisat ont été pesés sur une balance analytique RADWAG (AS 220/C/2), puis introduit dans un tube à hémolyse, avec 15 mL d'eau distillée, les tubes sont chauffés au bain-marie (45°C) pendant 15min, pour dissoudre complètement l'amidon et ainsi les composés phénoliques encapsulés sont libérés. La poudre de grignons d'olive a été préparée dans un mélange de solvant (eau/éthanol) car elle n'est pas soluble dans l'eau. Soit 30 mg de lyophilisat de grignons ont été pesé, puis introduit dans un tube à hémolyse avec de l'eau et de l'éthanol (80/20 v/v), ensuite la solution a été chauffée au bain-marie (37°C) pendant 15 min.

La caractérisation du grignon d'olive et de l'encapsula de polyphénols a été réalisée par UPLC-DAD-MS (voir première partie).

2. Méthodes

2.1. Dosage des composés phénoliques

2.2. Dosage des polyphénols totaux (TPC)

2.3. Méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu

La quantification des composés phénoliques totaux des différents lyophilisats (GG départ, PP/A μ -ondes, Tyr / A conv et Tyr / A μ -ondes) a été réalisée selon le protocole de Lister et Wilson [42] avec de légères modifications.

a) Principe

La méthode utilisée est celle utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_4$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu du tungstène (W_8O_{23}) et de molybdènes (Mo_8O_{23}). La coloration présente un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans l'échantillon [2006].

b) Protocole

Soit 0,5ml de chaque échantillon a été mélangé avec 2ml du réactif de Folin et Ciocalteu dilué au 1/10 ème. Le mélange est bien agité, et laissé à température ambiante pendant 4 min. Ensuite 4mL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7.5 % sont ajoutés au mélange. La solution obtenue est incubée au bain marie pendant 30 min. La lecture de l'absorbance est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS JASCO V-630 à 765 nm contre un blanc qui contient de l'eau. Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations croissantes (16 à 2000 μ g/mL).

c) Expression des résultats

Les résultats obtenus, exprimés en mg Eq acide gallique par gramme de grignon et de lyophilisat, sont calculés selon l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique : $Y=0,010x + 0,002$; $R^2= 0,998$ (figure26).

2.4. Dosage flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes des différents lyophilisats (GG départ, PP/A μ -ondes, Tyr/A conv et Tyr/A μ -ondes) a été réalisée selon le protocole de Dewanto et al. [42] avec de légères modifications.

a) Principe

La détermination du taux de flavonoïdes totaux est estimée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium, utilisé comme agent chromogène, forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et devient rose avec la soude et absorbe dans le visible à 510 nm.

b) Protocole

Soit 1 mL de l'échantillon est mélangé avec 5,6 mL d'eau distillée, puis 0,2 mL de la solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5% a été ajouté. Après cinq minutes, 0,2 mL de Trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10% a été ajouté et le mélange a été laissé au repos pendant 6 min. Ensuite, 2 mL de la soude (NaOH) (1M) a été ajoutée et la solution a été bien mélangée puis laissée à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 min. La lecture de l'absorbance est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS JASCO V-630 à 510 nm contre un blanc contenant de l'eau. Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant la quercétine comme contrôle positif à différentes concentrations croissantes (0 à 100 $\mu\text{g/mL}$).

c) Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes présents dans les différents échantillons exprimée en mg équivalent quercétine/g de grignon et de lyophilisat a été déterminée en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la quercétine : $Y=0,022x + 0,006$; $R^2= 0,999$ (figure 27).

2.5. Evaluation de l'activité antioxydante

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans cette étude nous avons fait recours à deux méthodes celle de DPPH et celle de l'ABTS, ses deux méthodes sont toutes les deux basées sur la capacité d'un antioxydant en occurrence les polyphénols de nos échantillons (encapsulés et non encapsulé) à réduire les radicaux DPPH $\cdot$ et ABTS $\cdot$.

2.6. Méthode DPPH

L'effet antiradicalaire des différents échantillons vis-à-vis du radical DPPH $\cdot$ est basé sur la méthode décrit par Huang et al. [207].

a) Principe

Le radical DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un des radicaux azotés organiques les plus stables, qui porte une couleur pourpre. Tout comme le TEAC utilisant l'ABTS c'est une méthode colorimétrique basée sur la perte de couleur à 517 nm due à la réduction du DPPH (figure 23). La concentration en antioxydants est proportionnelle à la baisse de l'absorbance due à la diminution de l'intensité de la coloration de la solution DPPH.

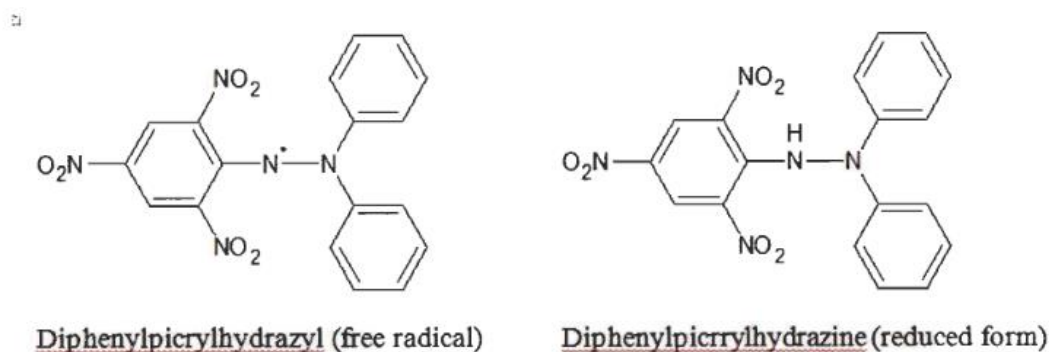


Figure 22 : Le radical DPPH et sa forme réduite [208]

b) Protocole

2,5 mL de différentes concentrations de chaque échantillon aqueux ont été introduit dans des tubes à essai et 0.5 mL de solution méthanolique de DPPH (0.2 mM DPPH, dissous dans le méthanol) fraîchement préparée ont été ajoutés. Le mélange est vigoureusement agité au vortex, les mélanges ont été placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. Après l'agitation au vortex, la lecture du changement de couleur a été effectuée par la mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS JASCO V-630 à la longueur d'onde 517nm. L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en IC₅₀, ce paramètre est défini comme étant la concentration de l'antioxydant qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Les valeurs d'IC₅₀ moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage de réduction (PR) du radical DPPH, qui est calculé par la formule suivante :

$$I \% = [(Abs \text{ Control négatif} - Abs \text{ Echantillon}) / Abs \text{ Control négatif}] \times 100$$

Où :

I % : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif (solution de DPPH seulement).

Le contrôle négatif est composé de la solution de DPPH dans le méthanol seul, et le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard le trolox, avec des concentrations de 18 à 2000 µg/mL.

2.7. Méthode ABTS

a) Principe

Le test TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) ou test de décoloration de l'ABTS^{•+} est effectué selon la méthode décrite par Tuberoso et al [209]. Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2' - azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La solution ABTS est obtenue en mélangeant l'ABTS avec un oxydant (généralement le persulfate de potassium) qui donne une solution d'une couleur bleu intense. La CA est mesurée comme la capacité des composés tests à diminuer l'intensité de la coloration obtenue à partir de l'ABTS en la comparant avec un antioxydant de référence, le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E sans la chaîne aliphatique. La réduction de l'ABTS (figure 23) conduit à une décoloration du bleu de la solution ABTS mesurée à 645-734 nm de la solution [210]. Plus l'absorbance finale est faible, plus la valeur TEAC est élevée, c.-à-d. plus l'antioxydant est efficace [211].

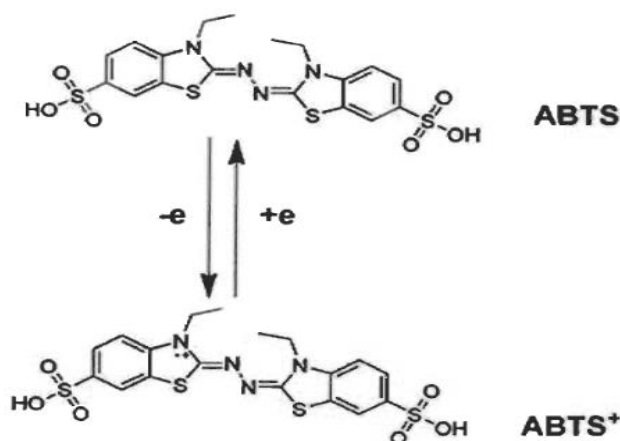


Figure 23 : Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS^{•+} [212]

b) Protocole

➤ Préparation du radical ABTS

Le radical cationique $\text{ABTS}^{\circ+}$ a été produit par la réaction entre 10 mL d'ABTS (2 mM) dans l'eau et 100 μL de persulfate de potassium (70 mM). Le mélange a été mis en incubation à l'obscurité pendant 16 h, à température ambiante. La solution d' $\text{ABTS}^{\circ+}$ a été ensuite diluée avec le méthanol pour obtenir une absorbance de 0,70 à 734 nm.

200 μL de chaque échantillon à différente concentration (40-2000 $\mu\text{g/mL}$) ont été mélangés avec 2 mL de la solution d' $\text{ABTS}^{\circ+}$ diluée, et laisser réagir pendant 1 min. la lecture de l'absorbance du radical $\text{ABTS}^{\circ+}$ est réalisée avec un spectrophotomètre UV/VIS JASCO V- à 734nm. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$(\%) \text{ Inhibition} = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

Où Ac et As sont respectivement les absorbances du contrôle ou le blanc (solution $\text{ABTS}^{\circ+}$ plus méthanol) et de l'échantillon à tester. A partir d'un graphique de concentration par rapport au % d'inhibition, une analyse de régression linéaire a été effectuée pour déterminer la valeur IC_{50} de chaque échantillon.

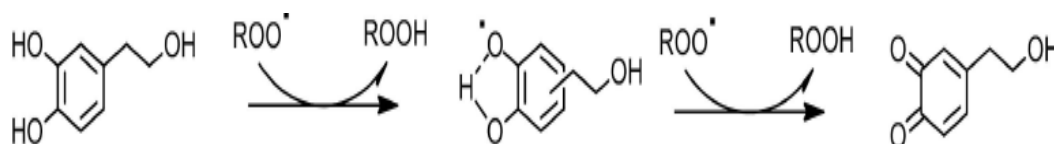


Figure 24 : Mécanisme antiradicalaire de l'hydroxytyrosol [213]

3.2.4. Evaluation de l'effet inhibiteur des échantillons sur l'enzyme α amylase

Cette partie expérimentale consiste à évaluer l'effet inhibiteur des composés phénoliques encapsulés et non encapsulés de l'enzyme hydrolysant les glucides dans le tube digestif (α amylase), *in vitro*.

2.8. Méthode iode-amidon

a) Principe

Le test à l'iode est utilisé pour tester la présence d'amidon. L'amidon se transforme en une couleur "bleu-noir" intense lors de l'addition de solutions aqueuses de l'anion tri-iodure (I^{3-}), en

raison de la formation d'un complexe de transfert de charge intermoléculaire. En l'absence d'amidon, la couleur brune de la solution aqueuse reste.

L'activité inhibitrice de l'enzyme α amylase a été réalisée selon la méthode Xiao et al. [214] et Yoshikawa et al. [215] avec de légère modification. L'acarbose a été utilisé comme témoin positif.

2.9. La réaction enzymatique : réactifs et mode opératoire

➤ Solution d'extrait

Les extraits ont été préalablement préparés comme décrit dans la partie préparation échantillon, Une gamme de concentrations croissantes a été préparée variant de 12 à 2000 $\mu\text{g/mL}$.

➤ Solution de substrat

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de maïs (PROLABO). 400 mg d'amidon sont dissouts dans 25 mL de NaOH (0.4 M) puis chauffé à 100°C pendant 5 min. Le substrat est ensuite refroidit dans de la glace, le pH est ajusté à 7 par ajout d'une solution de HCl (2M préparé à partir de HCl 37%), enfin le volume du substrat est complété à 100mL.

➤ Solution de l'amylase

L'enzyme utilisée est l' α -amylase de l'orge (E.C. 647-016-00-X) sous forme de poudre, son poids moléculaire est de 59 500 Da avec une activité spécifique de 2000UI/mL avec une solubilité de 10 mg soluble dans 10 mL d'eau.

La solution d'enzyme à 2 UI/mL est préparée par la dissolution de 50 mg de l'enzyme dans 50 mL de tampon acétate (85 mg dans 100mL ED, pH 6,5) la solution a été conservée à +4°C.

➤ Solution d'iode ou diiode (réactif)

Dans un Erlen Meyer, 31,5g de cristaux diiode est dispersé dans 25 mL de méthanol (MeOH), la solution est agitée pendant quelques minutes.

➤ Solution d'acarbose

Des solutions d'acarbose à différentes concentrations variant de 16 à 2000 $\mu\text{g/mL}$ sont préparées dans de l'eau distillée.

b) Protocole

Le milieu réactionnel est composé de :

-250 μL de solution d'extrait (échantillon) ou solution d'acarbose (témoin positif) ou solution de tampon phosphate (contrôle : activité enzymatique total sans inhibiteur).

-600 µL de la solution d'amidon (0.2%) y sont ajoutés à chaque tube. Mélanger et préincuber à 37°C pendant 10 min.

-100 µL de la solution d'enzyme dans tous les tubes sauf les blancs ou la solution d'enzyme est remplacée par le tampon. Incubation à 37°C pendant 30 min, après mélange des deux solutions.

La réaction enzymatique est arrêtée par l'addition de 250µl HCl (2M), puis 100 µl de solution d'iode dont le but est la mise en évidence du substrat par la formation d'un complexe iode-substrat qui se révèle à l'œil nu par une coloration violette foncée ou bleue-noire. La lecture de l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre UV/VIS à 630 nm.

c) Expression des résultats

Le Calcul du pourcentage d'inhibition de chaque concentration d'extrait ou d'acarbose par rapport au contrôle (sans inhibiteur) se fait selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - (\text{Abs 2} - \text{Abs 1}) / (\text{Abs 4} - \text{Abs 3}) \times 100\}$$

Abs 1 : absorbance de l'échantillon (extrait + substrat + enzyme) ;

Abs 2 : absorbance du blanc de l'échantillon (extrait + substrat + tampon) ;

Abs 3 : absorbance du contrôle (substrat + enzyme) ;

Abs 4 : absorbance du blanc du blanc (substrat + tampon).

IC₅₀ : la concentration inhibant 50% de l'activité enzymatique. Elle est calculée et déterminée graphiquement à partir de l'équation :

Taux d'inhibition= f (log (concentration))

Les essais de toutes les analyses ont été réalisés en triplicatas, les valeurs d'IC₅₀ ont été rapportées sous forme de moyenne ± écart-type.

Résultats

1. Résultats

1.1. Caractérisation des échantillons

Comme noté plus haut, les échantillons de grignon d'olive de départ ainsi que l'encapsula de polyphénols de grignon d'olive ont été déjà caractérisée par la méthode UPLCDAD-MS, quant aux échantillons de Tyrosol cela a été effectuée par spectrophotométrie UV/VIS. Ainsi le tableau ci-dessous regroupe les différents composés phénoliques présents dans nos échantillons ainsi que leurs concentrations et les méthodes d'analyse. La figure n°25 représente la structure chimique l'acide dihydrocaféique.

Tableau 3 : Récapitulatif des analyses des échantillons analysés

Echantillons	Composés phénoliques identifiés	Concentration en $\mu\text{mol/g}$	Méthodes d'analyse
GG départ	Hydroxytyrosol	795,8	UPLC-DAD-MS
	Glucoside-hydroxytyrosol	21,7	
	Tyrosol	44,8	
	Acide Dihydrocaféique	5,2	
PP/A μ -ondes	Hydroxytyrosol	$71,56 \pm 0,34$	
	Glucoside-hydroxytyrosol	$0,81 \pm 0,01$	
	Tyrosol	$4,50 \pm 0,15$	
	Acide Dihydrocaféique	$0,55 \pm 0,02$	
Tyr/A conv	Tyrosol	$0,40 \pm 0,04$	Spectrométrie UV/VIS
Tyr/A μ -ondes	Tyrosol	$0,53 \pm 0,05$	

En plus de l'hydroxytyrosol et du tyrosol, l'acide dihydrocaféique (figure 25) a fait l'objet de plusieurs études notamment sur son activité biologique. En effet, c'est un polyphénol qui possède diverses activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, neuroprotectrices et inhibitrices des enzymes [216 ; 217]. L'acide dihydrocaféique élimine les radicaux ABTS ($\text{IC}_{50} = 81,86 \mu\text{g} / \text{mL}$) et le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH $\text{IC}_{50} = 192,86 \mu\text{g} / \text{mL}$) et augmente la survie des RGC-5 cellules ganglionnaires rétiniennes de souris dans des conditions hypoxiques et en présence de S-nitroso-N-acétyl-D, L-pénicillamine de manière dose-dépendante [216]. Il diminue également l'activité endothéliale de l'oxyde nitrique synthase (eNOS) dans les cellules endothéliales humaines de manière dose-dépendante [218]. *In vivo*, l'acide dihydrocaféique (30 mg / kg) diminue la taille de l'infarctus dans un modèle de rat d'ischémie transitoire induite par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) [217].

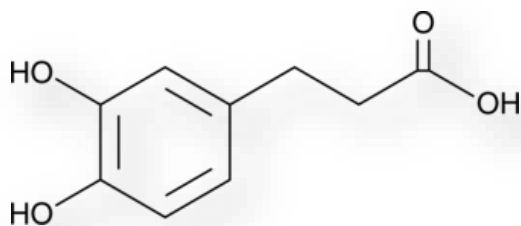


Figure 25 : Structure chimique de l'acide Dihydrocaféique (<https://www.caymanchem.com>) [219]

1.2. Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes

Les analyses quantitatives des phénols totaux, et des flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées respectivement en mg équivalent d'acide gallique et mg équivalent quercétine par g de grignon et de lyophilisat et représentée par les figures (26 et 27).

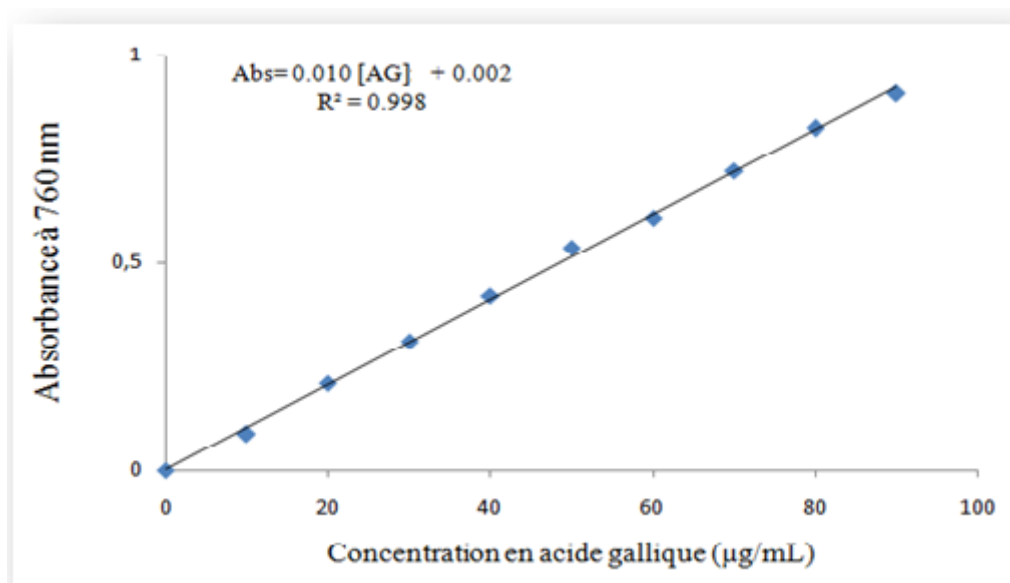


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

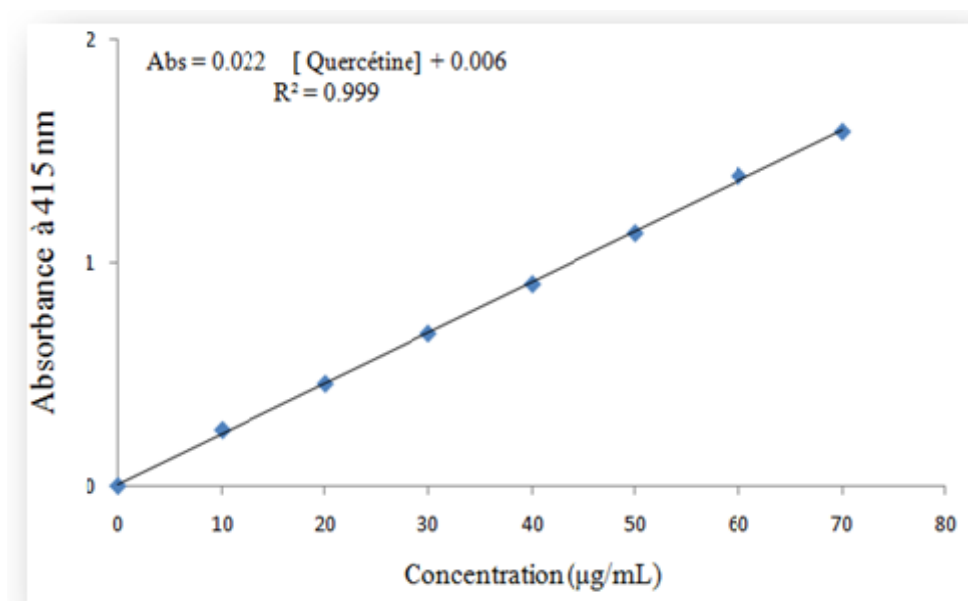


Figure 27 : Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Les résultats rapportés dans le tableau 4, montrent dans le cas de l'échantillon GG de départ une teneur en PPT plus élevée que celle de l'échantillon PP/A µ-ondes, sachant que le PP/A µ-onde est l'encapsula de composés phénoliques du GG de départ (polyphénols libres). Quant aux échantillons de Tyrosol les teneurs en PPT sont quasi égales.

Tableau 4 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans les extraits des échantillons étudiés

Echantillons	PPT mg Eq AG/g de grignon ou de lyophilisat	TFC mg Eq Q/g de grignon ou de lyophilisat
GG départ	49,40 ± 1,46	2,62 ± 0,85
PP/A µ-ondes	7,98 ± 2,49	0,87 ± 0,19
Tyr/A conv	29,91 ± 2,32	0,77 ± 0,06
Tyr/A µ-ondes	26,73 ± 0,84	0,46 ± 0,31

Les teneurs en flavonoïdes sont très faibles, ce qui est tout à fait normal, car les composés phénoliques majoritaires présents dans l'échantillon GG de départ et PP/A µ-ondes, sont les alcools phénoliques qui n'appartiennent pas à la famille des flavonoïdes, les deux autres molécules également identifiées n'appartiennent pas à la classe des flavonoïdes mais se sont plutôt un sucre et un acide. Il en est de même pour les échantillons de Tyrosol, lequel est un alcool phénolique.

1.3. Etude de l'activité antioxydante

1.3.1. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Les résultats de la capacité de piégeage de 50% du radical DPPH• des différents échantillons exprimée mg /mL sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : IC₅₀ du radical DPPH• par les échantillons étudiés

	(DPPH) IC ₅₀ µg/ mL	
Standard	Trolox	106,29 ± 2,46
Echantillons	GG départ	200
	PP/A µ-ondes	179,84 ± 0,29
	Tyr/A conv	
	Tyr/A µ-ondes	

Comme on peut l'observer dans le tableau 5, les échantillons GG de départ et PP/A µ-ondes ont des valeurs IC₅₀ supérieures à celle du standard Trolox. De plus, le pourcentage RSA maximal du standard Trolox (74,77 ± 0,08) ainsi que ceux des échantillons GG de départ (70,20 ± 0,09) et PP/A µ-ondes (69,96 ± 0,03) ont été observés à la même concentration soit 400 µg/mL (figure28). Quant aux échantillons de Tyr/A conv et Tyr/A µ-ondes nous n'avons enregistré aucune activité et ce jusqu'à la concentration maximale (2mg/mL).

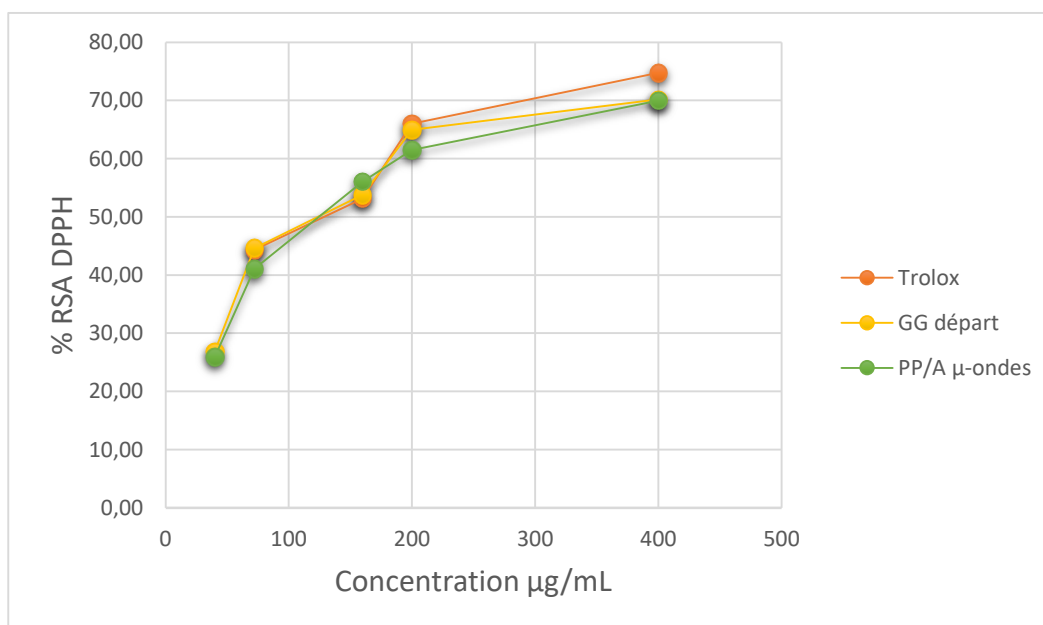


Figure 28 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par le standard Trolox et les échantillons étudiés (GG départ, PP/A µ-ondes, Tyr/A conv et Tyr/A µ-ondes)

1.4. Piégeage du radical ABTS⁺

Les valeurs de l'IC₅₀ de l'activité antioxydante des échantillons par la méthode d'ABTS sont consignées dans le tableau 6.

Tableau 6 : IC₅₀ du radical ABTS⁺ par les échantillons étudiés

	(ABTS) IC ₅₀ µg/ mL	
Standard	Trolox	75,15 ± 1,10
Echantillons	GG départ	37,37 ± 2,21
	PP/A µ-ondes	61,81 ± 0,44
	Tyr/A conv	180
	Tyr/A µ-ondes	176,56 ± 0,23

Les valeurs des IC₅₀ par la méthode de l'ABTS sont plus faibles que celle obtenues par la méthode de DPPH. La plus faible valeur de l'IC₅₀ est obtenue avec l'échantillon GG de départ ensuite PP/A µ-ondes dont tous les deux ont des IC₅₀ inférieurs à celui du standard Trolox, par contre la concentration correspondant au pourcentage maximal RSA diffère, elle est de 200µg/mL pour le Trolox (92,03±0,06 %) et pour les échantillons GG de départ et PP/A µ-ondes elle est de 400µg/mL dont les % max RSA sont respectivement 93,28 ± 0,04 et 93,38 ± 0,04. Quant aux échantillons Tyr/A conv et Tyr/A µ-ondes leur IC₅₀ ont été rapportés contrairement à la méthode DPPH. Les échantillons de Tyrosol ont les plus grands IC₅₀ par rapport au reste des échantillons (figure 29).

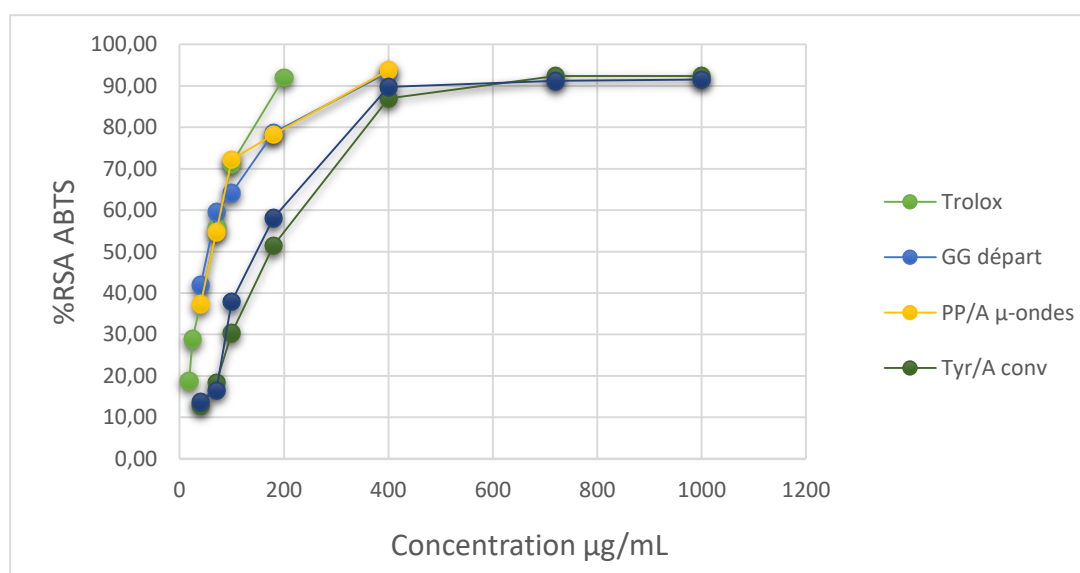


Figure 29 : Pourcentage d'inhibition du radical ABTS par le standard Trolox et les échantillons étudiés (GG départ, PP/A µ-ondes, Tyr/A conv et Tyr/A µ-ondes)

1.5. Activité antidiabétique

1.5.1. Effet inhibiteur des composés phénoliques de grignon d'olive sur l' α -amylase malt *in vitro*

Les résultats de l'évaluation de l'activité inhibitrice *in vitro* des échantillons analysés sur l' α amylase malt d'origine céréalière sont présentés dans le tableau 7. Dans cette étude, l'acarbose agent inhibiteur de l' α amylase est utilisé comme contrôle positif. Son IC_{50} est supérieur à celui des échantillons GG départ et PP/A μ -ondes. Les pourcentages d'inhibition maximaux de l'enzyme alpha amylase par l'acarbose ($82,17 \pm 0,92$) et des échantillons GG de départ ($94,42 \pm 0,22\%$) et PP/A μ -ondes ($96,95 \pm 0,50$) sont observés à la même concentration $400\mu\text{g/mL}$ (figure 24). Les valeurs d' IC_{50} les plus élevées sont observées dans le cas des échantillons de Tyrosol (tableau7, figure 30).

Tableau 7 : IC_{50} de l'activité d' α amylase de malt du contrôle positif et des différents échantillons étudiés

Echantillons	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de l' α amylase
Acarbose	$116,25 \pm 2,04$
GG départ	$100,19 \pm 3,50$
PP/A μ -ondes	$72,28 \pm 1,57$
Tyr/A conv	400
Tyr/A μ -ondes	$559,57 \pm 1,88$

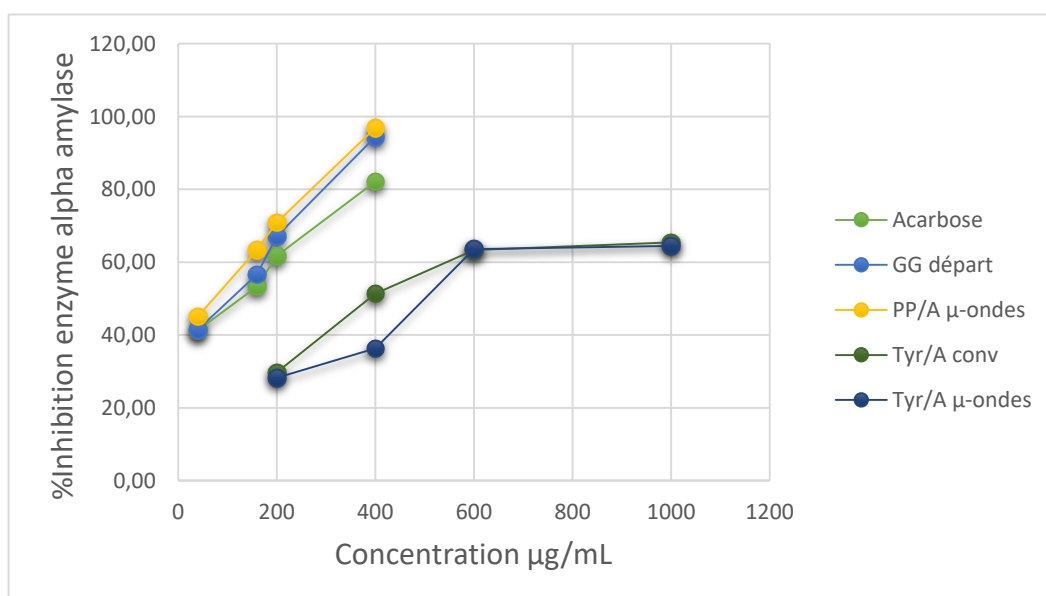


Figure 30 : Pourcentage d'inhibition de l'enzyme alpha amylase par l'acarbose et les échantillons étudiés (GG départ, PP/A μ -ondes, Tyr/A conv et Tyr/A μ -ondes)

Discussion

Discussion

Le diabète est un problème majeur de santé qui a atteint des proportions alarmantes. Actuellement, près d'un demi-milliard de personnes dans le monde vivent avec le diabète. Cette pathologie constitue l'une des urgences sanitaires mondiales du 21^{ème} siècle qui connaît l'évolution la plus rapide [220].

La dégradation du contrôle glycémique post prandial est une première étape vers l'intolérance au glucose qui augmente le risque de développer ultérieurement un diabète de type 2 [221]. L'inhibition de l'alpha-glucosidase et de l'alpha-amylase, enzymes impliquées dans la digestion des hydrates de carbone, peut réduire de façon significative l'augmentation postprandiale de la glycémie et peut donc être une stratégie importante dans la gestion de la glycémie chez les diabétiques de type 2 [222].

Actuellement, trois agents Inhibiteurs sont commercialisés : l'acarbose inhibe la glucoamylase, sucrase, maltase, dextranase et aussi l' α -amylase mais n'agit pas sur les α -glucosidases. Le voglibose et le miglitol (agissent préférentiellement sur les dissaccharidases digestives (sucrase et maltase), ce dernier agit aussi sur l'absorption intestinal du glucose au niveau des entérocytes [222]. Ils ont été employés dans le but de réduire spécifiquement l'hyperglycémie postprandiale, en retardant l'absorption du glucose au niveau de l'intestin vers le courant sanguin sans influencer la sécrétion d'insuline comme le font d'autres antidiabétiques oraux tel que les sulfonylurées [223]. Cependant, les effets indésirables de ses traitements tels que les troubles du foie, les flatulences et les crampes abdominales, [224] nécessitent d'autres alternatives.

Des études menées sur les inhibiteurs naturels de l'alpha-glucosidase et de l'alpha-amylase ont rapportées moins d'effets secondaires ou pratiquement aucun effet secondaire [225, 222].

C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à l'activité antidiabétique des phénols présents dans le grignon d'olive (déchet solide). Cependant, dans notre étude une partie des composés phénoliques analysés sont issus de procédé d'encapsulation, qui est une technique permettant de stabiliser les molécules bioactives, de masquer leur caractère organoleptique désagréable et aussi de les protéger contre les conditions défavorables de l'environnement, en utilisant des matériaux d'emballage tel que les cyclodextrines, l'amidon etc [226] .

Au cours des dernières décennies, les effets positifs de certains phénols d'olive sur la santé humaine ont été scientifiquement démontrés à de nombreuses reprises [227]. En effet, l'une des

activités les plus reconnues des phénols des déchets d'olive est leur capacité à capturer les radicaux libres (*in vitro* et *in vivo*) [226].

En outre, il a été mis en évidence que les fluctuations de la glycémie postprandiale avaient un effet déclencheur plus spécifique du stress oxydatif que de l'hyperglycémie chronique chez les sujets diabétiques et chez les sujets sains [228]. L'hyperglycémie induit des dysfonctionnements endothéliaux qui ont un rôle majeur dans le développement des complications liées au diabète de type 2 [229].

Les antioxydants peuvent atténuer, inhiber, ou retarder l'effet délétère des EOA sur les macromolécules et organes de l'organisme par le piégeage des radicaux libres. Les produits naturels issus de plantes notamment possédant cette propriété ont été démontrés jouant un rôle bénéfique protecteur contre le stress oxydatif engendré dans de nombreuses maladies chroniques et dégénératives [230].

Ainsi, dans cette étude nous avons procédé à l'évaluation de l'activité antioxydante de nos différents échantillons (GG départ, PP/A μ -ondes, Tyr/A conv et Tyr/A μ -ondes) par la méthode DPPH et ABTS. Ces méthodes sont basées sur le transfert d'électron (SET), dont le but est de mesurer la capacité d'un antioxydant (AH) à réduire un oxydant (Ox), qui change de couleur quand il est réduit [231].

Tout d'abord, les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été déterminés pour chaque échantillon. La quantification des polyphénols totaux a été réalisée par la méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu : Les échantillons GG départ et PP/A μ -ondes ont respectivement $49,40 \pm 1,46$ mg EGA/ g de grignon et $7,98 \pm 2,49$ mg EGA/g lyophilisat, la quantité de TPC encapsulés représente 16% de TPC libres. La teneur en TPC des échantillons de Tyrosol sont les suivantes : Tyr/A conv $29,91 \pm 2,32$ mgEGA/g de lyophilisat et Tyr/A μ -ondes $26,73 \pm 0,83$ mgEGA/g.

Le dosage des flavonoïdes par la méthode colorimétrique de Dewanto et al de nos échantillons a révélé l'absence des flavonoïdes dans nos échantillons, bien que cela était prévisible dans le cas des échantillons de Tyrosol car ce dernier n'étant pas un flavonoïde les teneurs ainsi observées sont tout à fait logiques, on note $0,77 \pm 0,06$ mg EQ/g lyophilisat pour Tyr/A conv et $0,46 \pm 0,31$ mg EQ/g lyophilisat pour Tyr/A μ -ondes. Dans le cas de l'échantillon GG départ on note la plus grande teneur en flavonoïdes $2,62 \pm 0,85$ mg EQ/g grignon, par contre pour PP/A μ -ondes la teneur est aussi faible que celles des Tyrosol, soit $0,87 \pm 0,19$ mg EQ/g

lyophilisat. Cela nous permet de suggérer que le peu de flavonoïdes présent dans GG départ n'a pas été encapsulés.

Dans la première partie de la thèse dédiée à l'encapsulation des composés phénoliques, nous avons procédé à la caractérisation du grignon avant et après encapsulation par la méthode UPLC-DAD-MS, ainsi dans ses deux échantillons nous avons pu identifier et quantifier les différents composés phénoliques. Autant dans l'échantillon GG départ que PP/A μ -ondes, les mêmes composés phénoliques ont été identifiés, également les composés majoritaires sont aussi les mêmes dans les deux échantillons.

Les composés phénoliques identifiés dans les deux échantillons GG départ et PP/A μ -ondes ainsi que leur teneurs sont respectivement : Hydroxytyrosol (795,8 $\mu\text{mol/g}$ de grignon, $71,56 \pm 0,34$ $\mu\text{mol/g}$ de lyophilisat soit 8,99% de l'Htyr libre), Glucoside d'hydroxytyrosol (21,7 $\mu\text{mol/g}$ de grignon , $0,81 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/g}$ de lyophilisat soit 3,73% de Gl-Htyr libre), Tyrosol 44,8 $\mu\text{mol/g}$ de grignon, $4,50 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/g}$ de lyophilisat soit 10,04% du Tyr libre) et l'acide dihydrocaféique (5,2 $\mu\text{mol/g}$ de grignon $0,55 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/g}$ de lyophilisat soit 10,57% de l'acide dihydrocaféique libre).

L'analyse par UPLC-DAD-MS est en phase avec le dosage des flavonoïdes, car les composés identifiés n'appartiennent pas à la classe des flavonoïdes. Les composés majoritaires sont les alcools phénoliques (hydroxytyrosol et tyrosol) lesquels sont d'ailleurs très souvent rapporté dans la littérature comme étant les composés phénoliques majoritaires présents dans les déchets d'olive (margine et grignon d'olive) [226].

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos échantillons par la méthode DPPH a révélé la capacité réductrice du radical DPPH $\cdot$ par les composés phénoliques libres et encapsulés. On note pour GG départ $\text{IC}_{50} = 200$ $\mu\text{g/mL}$ et pour PP/A μ -ondes $\text{IC}_{50} = 179,84 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$, les composés encapsulés ont un IC_{50} inférieurs à celui des composés libres, cette différence peut être due à l'encapsulation qui a sans doute maintenue l'activité des composés phénoliques voir même l'améliorer. Le trolox utilisé comme standard a un $\text{IC}_{50} = 106,29 \pm 2,46$ $\mu\text{g/mL}$ inférieur à celui des échantillons GG départ et PP/A μ -ondes.

Par contre, pour les échantillons de Tyrosol nous n'avons pas observé une activité réductrice remarquable du radical DPPH $\cdot$ et ce, jusqu'à concentration maximale (2000 $\mu\text{g/mL}$), cela peut être expliqué :

- soit par les inconvénients de la méthode DPPH, car par cette méthode certains antioxydants peuvent rester inertes face au DPPH relativement stable, en outre certaines réactions avec le DPPH sont réversibles et peuvent mener à une sous-estimation du potentiel des produits testés, et beaucoup d'antioxydants peuvent réagir plus lentement avec le DPPH [231], la solubilité du DPPH que dans des solvants organiques (éthanol, méthanol), rend la mesure de la capacité antioxydante d'antioxydants hydrophiles difficiles [232].
- Ou soit par la structure chimique du Tyrosol. En effet, des études ont rapportées que la faible activité antioxydante du Tyrosol peut être attribuée à l'absence du groupe hydroxyle ortho-diphénolique dans sa structure chimique [233].

L'évaluation de l'activité antioxydante du Tyrosol et ses dérivés lipidiques par la méthode de DPPH dans l'étude de Zhou et al. a également révélé une faible activité antioxydante de ses derniers comparativement à l'hydroxytyrosol considéré comme le meilleur antioxydant parmi les phénols des déchets d'olive [234].

Cependant, L'effet réducteur de tous nos échantillons s'est plus manifesté avec la méthode d'ABTS, la plus faible concentration de l'IC₅₀ est attribuée à l'échantillon GG départ IC₅₀= 37,37 ± 2,21µg/mL ensuite PP/A µ-ondes IC₅₀= 61,81 ± 0,44µg/mL, le trolox a un IC₅₀= 75,15 ± 1,10 µg/mL supérieur à ceux des composés phénoliques libres et encapsulés. Autant dans le cas des composés phénoliques libres que encapsulés, cette remarquable activité antioxydante est imputable à l'ensemble des composés phénoliques identifiés (hydroxytyrosol, tyrosol, l'acide dihydrocaffeic et glucoside d'hydroxytyrosol).

Les échantillons de tyrosol ont les IC₅₀ les plus élevés (Tyr/A conv IC₅₀= 180; Tyr/A µ-ondes IC₅₀= 176,56 ± 0,23).

Par ailleurs, les données disponibles dans la littérature sur les dosages DPPH et ABTS indiquent qu'ils ne sont pas toujours bien corrélés. De plus, ils ne donnent pas souvent les mêmes résultats car leurs mécanismes d'action diffèrent, du fait que deux radicaux différents soient impliqués [235], comme on a pu le constater dans l'étude effectuée sur l'activité biologique de l'acide dihydrocafeique (page n°145).

La capacité inhibitrice des composés phénoliques du grignon (GG départ) des radicaux DPPH (26,82-74,77%, figure 28) et l'ABTS (41,96-93,28%, figure 29 est en accord avec la littérature, qui a montré des propriétés similaires pour les extraits éthanol/eau de grignon issue de deux

cultivars [236] , de grignon d'olive issue d' huilerie locale (Winters, Californie, USA) [237] , Mais aussi les huiles essentielles des coquilles et des graines d'Abrus precatorius [238] .

Par ailleurs, en comparant les pourcentages d'inhibition des composés phénoliques encapsulés du radical DPPH (25,88-69,96%) figure 28 et de l'ABTS (37,37-93,98%) figure 29 à celle des composés phénoliques libres, on s'aperçoit que l'activité antioxydante a été maintenue grâce à la technique d'encapsulation par lyophilisation comme rapporté sur l'extrait de framboise riche en polyphénols (*Rubus chamaemorus*) stabilisé par lyophilisation, avec deux types de maltodextrines (DE 5-8 et DE18.5) comme revêtement matériel, les particules lyophilisées sont stables sur de longues périodes et procurent aux polyphénols une protection efficace contre le phénomène d'oxydation lors de leur stockage, alors que l'activité antioxydante reste identique [239].

Cependant, en comparant l'activité antioxydante par la technique d'ABTS, des composés phénoliques libres (GG départ) à celles des échantillons de Tyrosol, A/Tyr conv (12,96-92,40%, figure 29), A/Tyr μ -ondes (13,92-91,51%, figure 29), bien que le phénol encapsulé ait une intéressante activité radicalaire, les composés phénoliques libres et encapsulés présentent une activité antiradiacalire plus intéressante, ce qui est tout à fait logique car les activités dans le cas du tyrosol sont imputées à une seule molécule, tant disque les biophénols libres et encapsulés exercent une activité synergique.

En outre, dans l'étude de Urza et al., [240] l'encapsulation des composés phénoliques des feuilles d'olivier dans la matrice d'Inuline (polysaccharide produit naturellement par certaines plantes) par atomisation avec $87,1 \pm 0,27\%$ d'efficacité d'encapsulation, une teneur en TPC 13,2mg EGA/g de particules d'Oleuropéine-Inuline, a rapporté l'activité antioxydante par deux méthodes DPPH avec $32.8 \pm 0.5\mu\text{mol Trolox E/g}$ de microparticules et FRAP avec $52,03 \pm 0,9\mu\text{mol TroloxE/g}$ de microparticules. Dans cette étude, ils ont procédé à l'enrichissement d'une pâte d'amidon avec des microparticules d'oleuropéine d'une part et d'autre part avec des composés phénoliques de feuilles d'olivier encapsulés, ensuite la pâte a été frite à température ambiante et sous vide dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de l'oleuropeine ainsi que celle des composés phénoliques encapsulés dans les deux conditions.

En effet, plus la concentration de polyphénols additionnés dans les pâtes de microparticules d'OLE et d'OLE-IN est élevée, plus la capacité antioxydante est grande, tant pour la friture atmosphérique que pour la friture sous vide. Les matrices additionnées de microparticules d'OLE-IN ont montré la plus grande capacité antioxydante à la fois pour la friture

atmosphérique et la friture sous vide. Cet effet pourrait être attribué à la dégradation plus faible des polyphénols lorsqu'ils sont ajoutés sous forme de microparticules OLE-IN, ainsi qu'à l'effet protecteur des microparticules contre les interactions avec d'autres composants de la matrice alimentaire qui peuvent réduire leur capacité antioxydante [240]

En outre, Les résultats obtenus dans cette étude soulignent la pertinence de l'utilisation d'une technologie de traitement telle que la friture sous vide, capable de préserver les polyphénols et/ou l'encapsulation, une technologie capable de fournir une protection pendant le traitement des aliments, dans la conception d'aliments riches en polyphénols avec des effets bénéfiques potentiels sur la santé humaine [240].

Les principaux résultats obtenus concernant l'étude *in vitro* de l'effet inhibiteur de l' α amylase par les échantillons (GG départ, PP/A μ -ondes, Tyr/A conv et Tyr/A μ -ondes) comparés à ceux de l'acarbose comme molécule de référence, nous montrent que tous nos échantillons possèdent une activité inhibitrice variable dose-dépendante (figure 30) peuvent être classés selon un ordre décroissant vis-à-vis de l' α -amylase selon leur IC₅₀ respective, comme suit :

A/PP μ -ondes ($72,28 \pm 1,57 \mu\text{g/mL}$), GG départ ($100,19 \pm 3,50 \mu\text{g/mL}$), acarbose ($116,25 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$), Tyr/A conv ($400 \mu\text{g/mL}$), Tyr/A μ -ondes ($559,57 \pm 1,82 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats montrent dans un premier temps l'efficacité des composés phénoliques dans l'inhibition de l'enzyme alpha amylase et ce, autant dans le cas des phénols libres que encapsulés, même si les meilleurs IC₅₀ sont observés dans le cas des derniers, cela peut être expliqué par le fait que l'encapsulation ait maintenue la stabilité ainsi que l'activité des composés phénoliques, comme nous l'avons constaté avec l'activité antioxydante.

En comparant l'activité antioxydante et antidiabétique des échantillons de tyrosol à celles des composés phénoliques libres et encapsulés, sachant que le Tyrosol constitue l'un des composés majoritaires nous pouvons sans doute réitérer le phénomène de synergie entre les différents composés phénoliques, qui a contribué à une meilleure activité des échantillons GG départ et A/PP μ -ondes.

Ce phénomène est également observé par Mwakalukwa et *al.* [221] qui ont étudié l'effet inhibiteur des enzymes alpha amylase et alpha glycosidase des composés phénoliques isolés de déchets d'olive (margine), leur étude a révélé que certains composés de la margine sont des inhibiteurs potentiels des enzymes α -glucosidase et α -amylase, impliquées dans l'hydrolyse des glucides pour générer du glucose (PPHG) l'une des toutes premières étapes de la pathogenèse du diabète. Ils ont également démontré le mécanisme d'inhibition de l' α -glucosidase par des

composés actifs, dont l'un d'entre eux étant un lignane d'olive, le 1-acétoxypinorésinol, qui a été rapporté pour la première fois.

En effet, ils ont remarqué un effet diminué du composé hydroxytyrosol lorsqu'il est isolé, tant disque avec d'autres composés ils observent une meilleure activité, ils ont donc suggérer qu'il y a un effet additif ou synergique de l'activité globale de certains composés mineurs qui n'ont pas été isolés mais peuvent avoir contribué à l'activité globale.

En outre, l'effet synergique des extraits est largement connu en phytochimie. Par exemple l'extrait d'origan contenant de l'acide rosmarinique avait une activité d'inhibition de l'amylase plus élevée que celle d'une quantité similaire d'acide rosmarinique purifié, ce qui suggère que d'autres composés chimiques de l'extrait ont contribué à une activité inhibitrice supplémentaire [241].

Une combinaison de différents acides phénoliques était plus efficace pour inhiber l'activité enzymatique (α -amylase et amyloglucosidase) que l'acide phénolique individuel [242]

Par ailleurs, plusieurs études antérieures ont été consacrées à l'évaluation de l'activité inhibitrice de l' α amylase des composés phénoliques d'olive [223]

En effet, dans l'étude de Nickavar et al. [243 24] consacrées aux plantes médicinales iraniennes montrent que l'extrait aqueux des feuilles d'olivier a une faible activité inhibitrice vis-à-vis de l' α amylase (15,84% d'inhibition à une concentration de 2,30 mg/ml) en comparaison avec la plus faible concentration obtenue dans notre étude ($IC_{50}=72,28 \pm 0,12 \mu\text{g/mL PP/A}$).

Par ailleurs, les résultats de komaki et al. montrent que l'extrait éthanolique de feuille d'olive présente un effet inhibiteur plus élevé que l'extrait aqueux vis-à-vis de α amylases pancréatique et salivaire. Leurs IC_{50} respectives sont de 4 et 0.02 mg/mL pour l'extrait éthanolique, 67 et 70,9 mg/mL pour l'extrait aqueux [244]. L'identification des composés actifs à partir de l'extrait éthanolique abouti a deux molécules : lutéoléine et l'acide oléanolique. La première inhibe α amylase porcine avec IC_{50} variant dans un intervalle de 0,05-0,5mg/mL. Alors que l'acide oléanolique inhibe α amylase humain pancréatique avec IC_{50} de 0,1mg/mL. L'acide oléanolique inhibe aussi les α glucosidases [244].

Conclusion

Conclusion

Cette étude a consisté à mettre en évidence l'effet antioxydant (DPPH et ABTS) et antidiabétique (inhibition de l'alpha amylase *in vitro*) des biophénols du grignon d'olive. En effet, ces dernières années, les applications potentielles d'antioxydants à des fins médicales ont suscité un intérêt croissant, car les informations liant la pathogenèse de plusieurs maladies humaines au stress oxydatif abondent. Les sources alimentaires naturelles sont connues pour contenir des composés antioxydants capables de piéger les radicaux libres et ces antioxydants alimentaires ont suscité un intérêt particulier en tant que défenses contre les maladies dégénératives. Les composés phénoliques se trouvent en abondance dans de nombreux aliments végétaux et la plupart d'entre eux ont montré des propriétés antioxydantes à la fois dans des études *in vitro* et *in vivo*.

En outre, les déchets de l'industrie oléicoles (margine et grignon) sont également une riche source de composés phénoliques qui ont fait l'objet de plusieurs études dans le but de les valoriser et ainsi limiter leur impact négatif sur l'environnement.

Ainsi, notre étude sur l'effet inhibiteur des biophénols encapsulés et libres de l'enzyme alpha amylase a révélée dans un premier temps l'efficacité du procédé d'encapsulation, car on observe une meilleure activité antidiabétique mais également une meilleure activité antioxydante des composés encapsulés.

Cependant, en comparant l'activité antioxydante et antidiabétique des biophénols encapsulés et libres et encapsulés à celle des échantillons de Tyrosol, on observe une nette meilleure activité antioxydante et antidiabétique dans le cas des biophénols encapsulés et libres, ce qui est tout a fait logique car les activités dans le cas du Tyrosol sont imputées à une seule molécule, tant dis que les biophénols exercent une activité synergique.

Ainsi, les sous-produits d'olive (grignon, margine etc) sont une source importante de composés phénoliques pour les formulations antidiabétiques, les compléments alimentaires ... pour développer de nouveaux médicaments antidiabétiques.

Les résultats obtenus dans cette étude sont très prometteurs, néanmoins des analyses complémentaires sont nécessaires, telle que l'étude de l'effet inhibiteur d'autres enzymes (alpha glycosidase, lipase etc), mais également une étude *in vivo* serait assez bénéfique pour une meilleure application au niveau industriel.

Référence

1. Raccach, D., 2004. Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. EMC - Endocrinol. 1, 29–42. doi:10.1016/j.emcend.2003.10.003
2. OMS, 2002. Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002 – 2005 267.
3. Watanabe, J.; Kawabata, J.; Kurihara, H.; Niki, R. Isolation and Identification of α -Glucosidase Inhibitors from Tochu-Cha (*Eucommia Ulmoides*). Biosci., Biotechnol., Biochem. 1997, 61, 177–178.
4. Taslimi, P.; Aslan, H. E.; Demir, Y.; Oztaskin, N.; Maraş, A.; Gulçin, İ.; Beydemir, S.; Goksu, S. Diarylmethanon, Bromophenol and Diarylmethane Compounds: Discovery of Potent Aldose Reductase, α -Amylase and α -Glycosidase Inhibitors as New Therapeutic Approach in Diabetes and Functional Hyperglycemia. Int. J. Biol. Macromol. 2018, 119, 857–863.
5. Phung, O. J.; Scholle, J. M.; Talwar, M.; Coleman, C. I. Effect of Noninsulin Antidiabetic Drugs Added to Metformin Therapy on Glycemic Control, Weight Gain, and Hypoglycemia in Type 2 Diabetes. J. Am. Med. Assoc. 2010, 303, 1410–1418.
6. Tringali, C. Bioactive Compounds from Natural Sources; Isolation, Characterisation and Biological Properties; First Ed.; Tringali, C., Ed.; Taylor & Francis: New York, 2001.
7. Demir, Y.; Durmaz, L.; Taslimi, P.; Gulçin, İ. Antidiabetic Properties of Dietary Phenolic Compounds: Inhibition Effects on α - Amylase, Aldose Reductase, and α -Glycosidase. Biotechnol. Appl. Biochem. 2019, 66, 781–786.
8. Zohra GHAYATI, « antioxydant et diabète de type 2 », 2019.
9. Kuinar V, Collins T, Robbins SL, Pathologic basis of disease. 7e éd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.939- 954. ISBN 0-8089-2302-1.
10. Wémeau JL, Vialettes B, Schlienger JL. Endocrinology, diabète, métabolisme et nutrition pour le praticien. Paris, France: Masson; 2014. ISBN:9782294715846.
11. Mcphee SJ, Ganong WF. Pathophysiology of disease an introduction to clinical medicine. 5e éd. New York: LANGE Medical Books; 2006. ISBN:0-07110523-9.
12. Portha B. Signalisation intracellulaire et exocytose de l'insuline. Med Ther Endocrinol 2000;2:37-46.
13. Scheen AJ, Luyckx FH. L'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) revisitée : 2e partie: Indices d'insulinosécrétion, d'insulinosensibilité et de disposition orale. Med Mal Metab 2010;4(6):684-690.

14. Marie b EN: Biologie humaine; 2008.
15. Grimaldi A. Traité de diabétologie. 2e éd. Paris, France: Médecine Sciences Llamination; 2009. ISBN 13: 9782257000286.
16. Beaugier L, Sokol H (editors). Les fondamentaux de la pathologie digestive. Paris, France: Elsevier-Masson; 2014. ISBN:9782294731181.
17. Observatoire Régional de la santé Réunion. Le diabète. Ile de La Réunion, France: ORS Réunion; 2015.
18. Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 1998, 15(7):539-5553.
19. 21 Rocchini AP: Childhood obesity and a diabetes epidemic. N Engl J Med 2002, 346 (11):854-855.
20. 22 Akerblom HK, Vaarala O, Hyoty H, Ilonen J, Knip M: Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. Am J Med Genet 2002, 115(1):18-29.
21. Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Wajcberg E, Mandarino LJ, DeFronzo RA: Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002, 283(6):E1135-1143.
22. Durlach V, Gillery P, Grulet H, Gross A, Moysset P, Leutenegger M: [Relationship between lipoprotein(a) and non-insulin-dependent diabetes in 602 patients]. Rev Med Interne 1993, 14(10):994.
23. Favier F, Jaussent I, Moullec NL, Debussche X, Boyer MC, Schwager JC, Papoz L: Prevalence of Type 2 diabetes and central adiposity in La Reunion Island, the REDIA Study. Diabetes Res Clin Pract 2005, 67(3):234-242
24. Rocchini AP: Childhood obesity and a diabetes epidemic. N Engl J Med 2002, 346 (11):854-855.
25. OMS - Organisation Mondiale de la Santé.: Rapport sur la santé dans le monde 2010.
26. National Institute of Diabetes and digestive and kidney diseases. Insulin Resistance and Prediabetes. National Diabetes Information Clearinghouse No. 14-4893. Bethesda, Etats-Unis: NIH. 2014.
27. Jolio N. complications et effets of diabetes [Internet]. Lukula: Salutemo (R.D.Congo); c2014 [updated 09 Sèpt 2014] : <http://salutemo.com/diabete.html>. (consulte´ le 14/05/2018)
28. Atlas du diabète de la FID 8ème édition 2017

29. Atlas du diabète de la FID 9ème édition 2019
30. Borm, K., Luscher, S & Muller, B. 2012. Premières étapes du traitement du diabète de type 2 nouvellement diagnostiqué – conseils pratiques. *Forum medsuiss* 48: 929- 935.
31. Bouxid, H. Les plantes médicinales et le diabète de type 2. Thèse doctorat en médecine. Université sidi Mohammed Ben Abdellah de Fès. 2012. 106p.
32. Deshaies, B., Les médicaments pour le contrôle de la glycémie (antihyperglycémiant).
33. Prisme diabète, Mauricie centre du Québec, 2011, 1-11.
34. Gabriel, R. Introduction au diabète gestationnel. Formation au diabète gestationnel. Reims. 2011, p 19.
35. Wémeau JL, Vialettes B, Schlienger JL. Endocrinology, diabète, métabolisme et nutrition pour le praticien. Paris, france: Masson; 2014. ISBN:9782294715846.
36. Delattre J, Beaudoux J.L, Bonnefont- Rousselot D. Sources cellulaires des espèces réactives de l’oxygène. In : Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologique. Edt Tec Doc. Paris : Lavoisier, 2005 : 45-80
37. Koppenol WH. 100 years of peroxynitrite chemistry and 11 years of peroxynitrite biochemistry. *Redox Rep.*, 2001, 6(6):339-41. *mammals, Physiol.Rev.*, 1997, 77(3):31-58.
38. Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.*, 1991, 69(21-23):965-8.
39. Nathalie AUBERVAL « Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par les antioxydants d’origine naturelle,2010.
40. Mao GD, Poznansky MJ. Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS Lett.*, 1992, 305(3):233-6.
41. 43 Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.*, 2000, 87(10):840-4.
42. Favier A. Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L’act. chim*, 2003: 108-115.
43. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 1998, 78(2):547-81.
44. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, 25(1):29-38.
45. Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, 25(2):274-8.

46. Leverve X. Hyperglycemia and oxidative stress: complex relationships with attractive prospects. *Intensive Care Med.*, 2003, 29(4):511-4.
47. Berger MM. Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 2006, 20(1):48-53.
48. Benhamou PY. Biochimie des complications vasculaires du diabète. Synthèse du 14ème Congrès de l'IDF, Washington DC, 1991.
49. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999, 48(4):927-32.
50. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.*, 1987, 245(1):243-50.
51. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.*, 1999, 344(Pt 1):109-16.
52. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem. J.*, 1988, 256(1):205-12.
53. Wolff SP. Is hyperglycemia risky enough to justify the increased risk of hypoglycemia linked with tight diabetes control? *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 1991, 46(2):129-39.
54. Hunt JV, Wolff SP. Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Radic. Res. Commun.*, 1991, 12(Pt1):115-23.
55. Gonzalez AM, Sochor M, Hotherhall JS, McLean P. Effect of experimental diabetes on the activity of hexokinase in rat lens: an example of glucose overutilization in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 30;84(4):858-64.
56. King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 1996, 25(2):255-70.
57. Burg MB. Molecular basis of osmotic regulation. *Am. J. Physiol.*, 1995, 268(6 Pt 2):F983-96.
58. Suárez G, Rajaram R, Bhuyan KC, Oronsky AL, Goidl JA. Administration of an aldose reductase inhibitor induces a decrease of collagen fluorescence in diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, 1988, 82(2):624-7.
59. Caroline Januel, Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète : étude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4, 2003.
60. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.

61. Nature, 2001, 414(6865):813-20
62. Bravi MC, Pietrangeli P, Laurenti O, Basili S, Cassone-Faldetta M, Ferri C, De Mattia G. Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*, 1997, 46(10):1194-8.
63. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 2005, 54(6):1615-25.
64. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, 1994, 43(9):1122-9.
65. Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu. Rev. Biochem.*, 1981 50:385-432.
66. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.*, 1984, 101(4):527-37.
67. MacLaughlin JA, Pethig R, Szent-Györgyi A. Spectroscopic studies of the protein methylglyoxal adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1980, 77(2):949-51.
68. Njoroge FG, Sayre LM, Monnier VM. Detection of D-glucose-derived pyrrole compounds during Maillard reaction under physiological conditions. *Carbohydr. Res.*, 1987, 167:211-20.
69. Monnier VM. Toward a Maillard reaction theory of aging. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1989, 304:1-22.
70. Jain SK, Palmer M. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997, 22(4):593-6.
71. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab.*, 1988, 14(1):25-30.
72. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 1976, 295(8):417-20.
73. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab. Rev.*, 1988, 4(5):437-51.
74. Grankvist K, Marklund SL, Täljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem. J.*, 1981, 199(2):393-8.

75. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, 20(3):463-6.
76. Ammon HP, Hagele R, Youssif N. A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release. *Endocrinology*, 1983, 112:720-726.
77. Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S. Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia*, 1999, 42(7):849-55.
78. Kralik PM, Xu B, Epstein PN. Catalase transfection decreases hydrogen peroxide toxicity in a pancreatic beta cell line. *Endocr. Res.*, 1998, 24(1):79-87.
79. Kubisch HM, Wang J, Luche R, Carlson E, Bray TM, Epstein CJ, Phillips JP. Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994, 91(21):9956-9.
80. Kubisch HM, Wang J, Bray TM, Phillips JP. Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta-cells against oxidative stress. *Diabetes*, 1997, 46(10):1563-6.
81. Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, Miyazaki J. Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J. Exp. Med.*, 1998, 188(8):1445-51.
82. Lortz S, Tiedge M, Nachtwey T, Karlsen AE, Nerup J, Lenzen S. Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes*, 2000, 49(7):1123-30.
83. Krippeit-Drews P, Lang F, Häussinger D, Drews G. H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.*, 1994, 426(6):552-4.
84. Krippeit-Drews P, Kramer C, Welker S, Lang F, Ammon HP, Drews G. Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J. Physiol.*, 1999, 514 (Pt 2):471-81.
85. Kim HR, Rho HW, Park BH, Park JW, Kim JS, Kim UH, Chung MY. Role of Ca²⁺ in alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1994, 1227(1-2):87-91.

86. Jahr H, Bretzel RG, Wacker T, Weinand S, Brandhorst H, Brandhorst D, Lau D, Hering BJ, Federlin K. Toxic effects of superoxide, hydrogen peroxide, and nitric oxide on human and pig islets. *Transplant Proc.*, 1995, 27(6):3220-1.
87. Shiva S, Crawford JH, Ramachandran A, Ceaser EK, Hillson T, Brookes PS, Patel RP, Darley-Usmar VM. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem. J.*, 2004, 379(Pt 2):359-66.
88. Bohr VA. DNA damage and its processing. relation to human disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2002, 25(3):215-22
89. Stevnsner T, Thorslund T, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp. Gerontol.*, 2002, 37(10-11):1189-96.
90. Miwa I, Ichimura N, Sugiura M, Hamada Y, Taniguchi S. Inhibition of glucose-induced insulin secretion by 4-hydroxy-2-nonenal and other lipid peroxidation products. *Endocrinology*, 2000, 141(8):2767-72.
91. Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 1998, 47(10):1562-9.
92. Hansen LL, Ikeda Y, Olsen GS, Busch AK, Mosthaf L. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. Evidence for a role of H₂O₂ in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(35):25078-84.
93. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 1990, 186:1-85.
94. Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardès-Albert M, Jore D, Legrand A, Peynet J, Vasson MP. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*, 2003, 52(5):586-9.
95. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64:97-112.
96. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.*, 2001, 85(Suppl 2):S67-74.
97. Pelli K, Lyly M. Antioxidants in the diet. VTT Biotechnology, Finland, 2003.
98. Prior RL, Cao G. Antioxidant related to natural product supplements & the need for methods of standardisation. *Journal of American Nutraceutical Association*, 1999, 2(2):45-56.

99. Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickançaité E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(1-2):107-16.
100. Sang S, Lambert JD, Hong J, Tian S, Lee MJ, Stark RE, Ho CT, Yang CS. Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-)-epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice. *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, 18(11):1762-9.
101. Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes*, 1992, 41(2):167-73.
102. Sinclair AJ, Lunec J, Girling AJ, Barnett AH. Modulators of free radical activity in diabetes mellitus: role of ascorbic acid. *EXS*, 1992, 62:342-52.
103. Caballero B. Vitamin E improves the action of insulin. *Nutr. Rev.*, 1993, 51(11):339-40.
104. Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F. Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. *Diabetes Care*, 1993, 16(11):1433-7.
105. Paolisso G, D'Amore A, Balbi V, Volpe C, Galzerano D, Giugliano D, Sgambato S, Varricchio M, D'Onofrio F. Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics. *Am. J. Physiol.*, 1994, 267(4 Pt 1).
106. Hirai N, Sakashita S, Sano T, Inoue T, Ohigashi H, Premasthira C, Asakawa Y, Harada J, Fujii Y (2000) Allelochemicals of the tropical weed *Sphenoclea zeylanica*. *Phytochemistry* 55(2):131–140
107. Chen H, Karne RJ, Hall G, Campia U, Panza JA, Cannon RO 3rd, Wang Y, Katz A, Levine M, Quon MJ. High-dose oral vitamin C partially replenishes vitamin C levels in patients with Type 2 diabetes and low vitamin C levels but does not improve endothelial dysfunction or insulin resistance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006, 290(1):H137-45.
108. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*, 2001, 358(9292):1500-3.
109. Stene LC, Joner G; Norwegian Childhood Diabetes Study Group. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 78(6):1128-34.
110. Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, Orton HD, Barón AE, Clare-Salzler M, Chase HP, Szabo NJ, Erlich H, Eisenbarth GS, Rewers M. Omega-3

- polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. *JAMA*, 2007, 298(12):1420-8.
111. Peth JA, Kinnick TR, Youngblood EB, Tritschler HJ, Henriksen EJ. Effects of a unique conjugate of alpha-lipoic acid and gamma-linolenic acid on insulin action in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2000, 278(2):R453-9.
 112. Evans JL, Goldfine ID. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.*, 2000, 2(3):401-13.
 113. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal.*, 2005, 7(7-8):1040-52.
 114. Ruderman N, Prentki M. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004, 3(4):340-51.
 115. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J.*, 1999, 13(10):1231-8.
 116. Frati-Munari AC, Gordillo BE, Altamirano P, Ariza CR. Hypoglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lemaire in NIDDM. *Diabetes Care*, 1988, 11(1):63-6.
 117. Sharma RD, Raghuram TC, Rao NS. Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1990, 44(4):301-6.
 118. Abidov M, Ramazanov A, Jimenez Del Rio M, Chkhikvishvili I. Effect of Blueberin on fasting glucose, C-reactive protein and plasma aminotransferases, in female volunteers with diabetes type 2: double-blind, placebo controlled clinical study. *Georgian Med. News*, 2006, (141):66-72.
 119. Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khatkhat KN, Anderson RA. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2003, 26(12):3215-8.
 120. Escarpa A, González MC. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *J. Chromatogr. A.*, 2000, 897(1-2):161-70.
 121. Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem. Soc. Symp.*, 1995, 61:103-16.
 122. Shamshoum H., Vlacheski F., Tsiani E. Anticancer effects of oleuropein. *Biofactors*. 2017;43:517–528. doi: 10.1002/biof.1366.
 123. Finicelli M., Squillaro T., Di Cristo F., Di Salle A., Melone M.A.B., Galderisi U., Peluso G. Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives. *J. Cell. Physiol.* 2019;234:5807–5826. doi: 10.1002/jcp.27506.

124. Tuck K.L., Hayball P.J. Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.* 2002;13:636–644. doi: 10.1016/S0955-2863(02)00229-2.
125. Tejada S., Pinya S., Del Mar Bibiloni M., Tur J.A., Pons A., Sureda A. Cardioprotective Effects of the Polyphenol Hydroxytyrosol from Olive Oil. *Curr. Drug Targets.* 2017;18:1477–1486. doi: 10.2174/1389450117666161005150650.
126. Imran M., Nadeem M., Gilani S.A., Khan S., Sajid M.W., Amir R.M. Antitumor Perspectives of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol: Recent Updates. *J. Food Sci.* 2018;83:1781–1791. doi: 10.1111/1750-3841.14198.
127. Alkhatib A., Tsang C., Tuomilehto J. Olive Oil Nutraceuticals in the Prevention and Management of Diabetes: From Molecules to Lifestyle. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:2024. doi: 10.3390/ijms19072024.
128. Granados-Principal S., Quiles J.L., Ramirez-Tortosa C.L., Sanchez-Rovira P., Ramirez-Tortosa M.C. Hydroxytyrosol: From laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr. Rev.* 2010 ; 68:191–206. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00278.x.
129. Umeno A., Horie M., Murotomi K., Nakajima Y., Yoshida Y. Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones. *Molecules.* 2016 ; 21:708. doi: 10.3390/molecules21060708.
130. Peyrol J., Riva C., Amiot M.J. Hydroxytyrosol in the Prevention of the Metabolic Syndrome and Related Disorders. *Nutrients.* 2017; 9:306. doi: 10.3390/nu9030306.
131. Wani T.A., Masoodi F.A., Gani A., Baba W.N., Rahmanian N., Akhter R., Wani I.A., Ahmad M. Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol—A review of the recent literature. *Trends Food Sci. Technol.* 2018; 77:77–90. doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.001.
132. Filip Vlavcheski, Mariah Young et Evangelia Tsiani, Antidiabetic Effects of Hydroxytyrosol: In Vitro and In Vivo Evidence, *Antioxidants (Basel)*. 2019 Jun; 8(6): 188.
133. Friedel A., Raederstorff D., Roos F., Toepfer C., Wertz K. Hydroxytyrosol Benefits Muscle Differentiation and Muscle Contraction and Relaxation. Application No. 13/550,972. U.S. Patent. 2013 Mar 7;
134. Burattini S., Salucci S., Baldassarri V., Accorsi A., Piatti E., Madrona A., Espartero J.L., Candiracci M., Zappia G., Falcieri E. Anti-apoptotic activity of hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl laurate. *Food Chem. Toxicol.* 2013;55:248–256. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.049.

135. Drira R., Sakamoto K. Modulation of adipogenesis, lipolysis and glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes by hydroxytyrosol acetate: A comparative study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013;440:576–581. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.106.
136. Wang X., Li H., Zheng A., Yang L., Liu J., Chen C., Tang Y., Zou X., Li Y., Long J., et al. Mitochondrial dysfunction-associated OPA1 cleavage contributes to muscle degeneration: Preventative effect of hydroxytyrosol acetate. *Cell. Death Dis.* 2014;5:e1521. doi: 10.1038/cddis.2014.473.
137. Hao J., Shen W., Yu G., Jia H., Li X., Feng Z., Wang Y., Weber P., Wertz K., Sharman E., et al. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 2010;21:634–644. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.03.012.
138. Warnke I., Goralczyk R., Fuhrer E., Schwager J. Dietary constituents reduce lipid accumulation in murine C3H10 T1/2 adipocytes: A novel fluorescent method to quantify fat droplets. *Nutr. Metab.* 2011;8:30. doi: 10.1186/1743-7075-8-30.
139. Drira R., Chen S., Sakamoto K. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *Life Sci.* 2011;89:708–716. doi: 10.1016/j.lfs.2011.08.012.
140. Drira R., Sakamoto K. Hydroxytyrosol stimulates lipolysis via A-kinase and extracellular signal-regulated kinase activation in 3T3-L1 adipocytes. *Eur. J. Nutr.* 2014;53:743–750. doi: 10.1007/s00394-013-0578-7.
141. Scoditti E., Massaro M., Carluccio M.A., Pellegrino M., Wabitsch M., Calabriso N., Storelli C., De Caterina R. Additive regulation of adiponectin expression by the mediterranean diet olive oil components oleic Acid and hydroxytyrosol in human adipocytes. *PLoS ONE.* 2015;10:e0128218. doi: 10.1371/journal.pone.0128218.
142. Tutino V., Orlando A., Russo F., Notarnicola M. Hydroxytyrosol Inhibits Cannabinoid CB1 Receptor Gene Expression in 3T3-L1 Preadipocyte Cell Line. *J. Cell. Physiol.* 2016;231:483–489. doi: 10.1002/jcp.25094.
143. Stefanon B., Colitti M. Original Research: Hydroxytyrosol, an ingredient of olive oil, reduces triglyceride accumulation and promotes lipolysis in human primary visceral adipocytes during differentiation. *Exp. Biol. Med.* 2016;241:1796–1802. doi: 10.1177/1535370216654226.

144. Anter J., Quesada-Gómez J.M., Dorado G., Casado-Díaz A. Effect of Hydroxytyrosol on Human Mesenchymal Stromal/Stem Cell Differentiation into Adipocytes and Osteoblasts. *Arch. Med. Res.* 2016;47:162–171. doi: 10.1016/j.arcmed.2016.06.006.
145. Pan S., Liu L., Pan H., Ma Y., Wang D., Kang K., Wang J., Sun B., Sun X., Jiang H. Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion injury in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013;57:1218–1227. doi: 10.1002/mnfr.201300010.
146. Priore P., Siculella L., Gnoni G.V. Extra virgin olive oil phenols down-regulate lipid synthesis in primary-cultured rat-hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* 2014;25:683–691. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.01.009.
147. Rubio-Senent F., de Roos B., Duthie G., Fernández-Bolaños J., Rodríguez-Gutiérrez G. Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. *Eur. J. Nutr.* 2015;54:1287–1295. doi: 10.1007/s00394-014-0807-8.
148. Rodríguez-Gutiérrez G., Rubio-Senent F., Gómez-Carretero A., Maya I., Fernández-Bolaños J., Duthie G.G., de Roos B. Selenium and sulphur derivatives of hydroxytyrosol: Inhibition of lipid peroxidation in liver microsomes of vitamin E-deficient rats. *Eur. J. Nutr.* 2018 doi: 10.1007/s00394-018-1733-y.
149. Gutierrez V.R., de la Puerta R., Catalá A. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol. Cell. Biochem.* 2001;217:35–41. doi: 10.1023/A:1007219931090.
150. Stupans I., Kirlich A., Tuck K.L., Hayball P.J. Comparison of Radical Scavenging Effect, Inhibition of Microsomal Oxygen Free Radical Generation, and Serum Lipoprotein Oxidation of Several Natural Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:2464–2469. doi: 10.1021/jf0112320.
151. Hamden K., Allouche N., Damak M., Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem. Biol. Interact.* 2009;180:421–432. doi: 10.1016/j.cbi.2009.04.002.
152. Wu L., Velandar P., Liu D., Xu B. Olive Component Oleuropein Promotes β -Cell Insulin Secretion and Protects β -Cells from Amylin Amyloid-Induced Cytotoxicity. *Biochemistry.* 2017;56:5035–5039. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00199.
153. King A.J. The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.* 2012;166:877–894. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x.

154. Jemai H., El Feki A., Sayadi S. Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *J. Agric. Food Chem.* 2009;57:8798–8804. doi: 10.1021/jf901280r.
155. Hamden K., Allouche N., Jouadi B., El-Fazaa S., Gharbi N., Carreau S., Damak M., Elfeki A. Inhibitory action of purified hydroxytyrosol from stored olive mill waste on intestinal disaccharidases and lipase activities and pancreatic toxicity in diabetic rats. *Food Sci. Biotechnol.* 2010;19:439. doi: 10.1007/s10068-010-0062-6.
156. Ristagno G., Fumagalli F., Porretta-Serapiglia C., Orrù A., Cassina C., Pesaresi M., Masson S., Villanova L., Merendino A., Villanova A., et al. Hydroxytyrosol attenuates peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetes in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60:5859–5865. doi: 10.1021/jf2049323.
157. López-Villodres J.A., Abdel-Karim M., De La Cruz J.P., Rodríguez-Pérez M.D., Reyes J.J., Guzmán-Moscoso R., Rodríguez-Gutierrez G., Fernández-Bolaños J., González-Correa J.A. Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. *J. Nutr. Biochem.* 2016;37:94–100. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.07.015.
158. Reyes J.J., Villanueva B., López-Villodres J.A., De La Cruz J.P., Romero L., Rodríguez-Pérez M.D., Rodríguez-Gutierrez G., Fernández-Bolaños J., González-Correa J.A. Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol in Experimental Diabetes Mellitus. *J. Agric. Food Chem.* 2017;65:4378. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02945.
159. González-Correa J.A., Rodríguez-Pérez M.D., Márquez-Estrada L., López-Villodres J.A., Reyes J.J., Rodríguez-Gutierrez G., Fernández-Bolaños J., De La Cruz J.P. Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol in Experimental Diabetic Retinopathy: Relationship with Cardiovascular Biomarkers. *J. Agric. Food Chem.* 2018;66:637–644. doi: 10.1021/acs.jafc.7b05063.
160. Wang W., Shang C., Zhang W., Jin Z., Yao F., He Y., Wang B., Li Y., Zhang J., Lin R. Hydroxytyrosol NO regulates oxidative stress and NO production through SIRT1 in diabetic mice and vascular endothelial cells. *Phytomedicine.* 2019;52:206–215. doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.208.
161. Xie Y., Xu Y., Chen Z., Lu W., Li N., Wang Q., Shao L., Li Y., Yang G., Bian X. A new multifunctional hydroxytyrosol-fenofibrate with antidiabetic, antihyperlipidemic, antioxidant and antiinflammatory action. *Biomed. Pharmacother.* 2017;95:1749–1758. doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.073.

162. Xie Y.-D., Chen Z.-Z., Li N., Lu W.-F., Xu Y.-H., Lin Y.-Y., Shao L.-H., Wang Q.-T., Guo L.-Y., Gao Y.-Q., et al. Hydroxytyrosol nicotinate, a new multifunctional hypolipidemic and hypoglycemic agent. *Biomed. Pharmacother.* 2018;99:715–724. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.123.
163. Xie Y.-D., Chen Z.-Z., Shao L.-H., Wang Q.-T., Li N., Lu W.-F., Xu Y.-H., Gao Y.-Q., Guo L.-Y., Liu H.-L., et al. A new multifunctional hydroxytyrosol-clofibrate with hypolipidemic, antioxidant, and hepatoprotective effects. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018;28:3119–3122. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.06.010.
164. Cao K., Xu J., Zou X., Li Y., Chen C., Zheng A., Li H., Li H., Szeto I.M.-Y., Shi Y., et al. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic. Biol. Med.* 2014;67:396–407. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.029.
165. Zheng A., Li H., Xu J., Cao K., Li H., Pu W., Yang Z., Peng Y., Long J., Liu J., et al. Hydroxytyrosol improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of db/db mice: Role of AMP-activated protein kinase activation. *Br. J. Nutr.* 2015;113:1667–1676. doi: 10.1017/S0007114515000884.
166. Jemai H., Bouaziz M., Fki I., El Feki A., Sayadi S. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem. Biol. Interact.* 2008;176:88–98. doi: 10.1016/j.cbi.2008.08.014.
167. Tabernero M., Sarriá B., Largo C., Martínez-López S., Madrona A., Espartero J.L., Bravo L., Mateos R. Comparative evaluation of the metabolic effects of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives (hydroxytyrosyl acetate and ethyl hydroxytyrosyl ether) in hypercholesterolemic rats. *Food Funct.* 2014;5:1556–1563. doi: 10.1039/C3FO60677E.
168. Voigt A., Ribot J., Sabater A.G., Palou A., Bonet M.L., Klaus S. Identification of Mest/Peg1 gene expression as a predictive biomarker of adipose tissue expansion sensitive to dietary anti-obesity interventions. *Genes Nutr.* 2015;10:27. doi: 10.1007/s12263-015-0477-z.
169. Pirozzi C., Lama A., Simeoli R., Paciello O., Pagano T.B., Mollica M.P., Di Guida F., Russo R., Magliocca S., Canani R.B., et al. Hydroxytyrosol prevents metabolic impairment reducing hepatic inflammation and restoring duodenal integrity in a rat model of NAFLD. *J. Nutr. Biochem.* 2016;30:108–115. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.12.004.
170. Poudyal H., Lemonakis N., Efentakis P., Gikas E., Halabalaki M., Andreadou I., Skaltsounis L., Brown L. Hydroxytyrosol ameliorates metabolic, cardiovascular and

- liver changes in a rat model of diet-induced metabolic syndrome: Pharmacological and metabolism-based investigation. *Pharmacol. Res.* 2017;117:32–45. doi: 10.1016/j.phrs.2016.12.002.
171. Wang N., Liu Y., Ma Y., Wen D. Hydroxytyrosol ameliorates insulin resistance by modulating endoplasmic reticulum stress and prevents hepatic steatosis in diet-induced obesity mice. *J. Nutr. Biochem.* 2018;57:180–188. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.03.018.
 172. Echeverría F., Valenzuela R., Espinosa A., Bustamante A., Álvarez D., Gonzalez-Mañan D., Ortiz M., Soto-Alarcon S.A., Videla L.A. Reduction of high-fat diet-induced liver proinflammatory state by eicosapentaenoic acid plus hydroxytyrosol supplementation: Involvement of resolvins RvE1/2 and RvD1/2. *J. Nutr. Biochem.* 2018;63:35–43. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.09.012.
 173. Di Benedetto, R.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Filesi, C.; Santangelo, C.; Giovannini, C.; Matarrese, P.; D'Archivio, M.; Masella, R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2007, 17, 535–545. [CrossRef]
 174. Perona, J.S.; Cabello-Moruno, R.; Ruiz-Gutierrez, V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J. Nutr. Biochem.* 2006, 17, 429–445. [CrossRef]
 175. Lee, K.M.; Hur, J.; Lee, Y.; Yoon, B.-R.; Choi, S.Y. Protective Effects of Tyrosol Against Oxidative Damage in L6 Muscle Cells. *Food Sci. Technol. Res.* 2018, 24, 943–947. [CrossRef]
 176. Chang, C.-Y.; Huang, I.-T.; Shih, H.-J.; Chang, Y.-Y.; Kao, M.-C.; Shih, P.-C.; Huang, C.-J. Cluster of differentiation 14 and toll-like receptor 4 are involved in the anti-inflammatory effects of tyrosol. *J. Funct. Food* 2019, 53, 93–104. [CrossRef]
 177. Berrougui, H.; Ikhlef, S.; Khalil, A. Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Promote Cholesterol Efflux and Improve HDL Functionality. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 2015, 208062. [CrossRef] [PubMed]
 178. Samuel, S.M.; Thirunavukkarasu, M.; Penumathsa, S.V.; Paul, D.; Maulik, N. Akt/FOXO3a/SIRT1-Mediated Cardioprotection by n-Tyrosol against Ischemic Stress in Rat in Vivo Model of Myocardial Infarction: Switching Gears toward Survival and Longevity. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 9692–9698. [CrossRef]
 179. Chandramohan, R.; Pari, L. Anti-inflammatory effects of tyrosol in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J. Funct. Food* 2016, 27, 17–28. [CrossRef]

180. Lee, H.; Im, S.W.; Jung, C.H.; Jang, Y.J.; Ha, T.Y.; Ahn, J. Tyrosol, an olive oil polyphenol, inhibits ER stress-induced apoptosis in pancreatic beta-cell through JNK signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, 469, 748–752. [CrossRef] [PubMed]
181. Besson, C. La glycémie post-prandiale de la physiologie à la pathologie. In collection sucre et santé. Rédaction ITI.ch.Schoën. Paris. 2009, 3-19p.
182. Sim, L. Structural and inhibition studies of human intestinal glucosidases. These de doctorat. Université de Toronto. 2010, 123p.
183. Nouadri T., - L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21 : Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Université Mentouri, Constantine. 2011, p. 160.
184. Merabti R., 2006. - Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Université Mentouri, Constantine. p. 85.
185. Kelly C.T., Bolton D. & Fogarty W.M., - Bi-phasic production of α -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation. *Biotechnology*, 1997, 19(7): 675-677.
186. Panchal C.J., - Yeasts strain selection. In Marcel Dekker, USA. 1990, p. 189.
187. Chiba S., - Amyloglycosidase. In Handbook of Amylases and related enzymes. The Amylase Research Society of Japan, Pergamum Press, Oxford, U.K. 1988, pp. 104-116.
188. Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N., Characterisation of Alkaline - Amylase from *Bacillus* sp AB 04. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2003, 08(1): 80-83.
189. Srinivasa Rao M., Reddy G., Venkateswara Rao G. & Sambasiva Rao K.R.S., - Studies on the extraction and characterisation of thermostable α -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology*, 2004, 4: 289-291.
190. Bertheau Y., Kotoujansky A. & Colenoa A., - Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hydrolyses et de dépolymérisation. In Mouranche A. et Coste C. (Ed) : Hydrolyses et dépolymérase enzymes, d'intérêt industriel. Gautier-Villard. 1985, pp. 47-108.
191. Chatterton J.-R., Vogelsong K.-M., Lu Y- Ellman A.-B. & Hudgens G.-A., - Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Physiology Journal*, 1996, 16(4): 344-348.
192. Badot R.M. & Merlin D., - Métabolisme énergétique et mouvement révolutif chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*). In Annales Scientifiques, Biologie Végétale. Université de Franche-Comté. 1984, pp. 7-12.

193. Charles A., Guy L. & Laurent M., - Biochimie alimentaire. In l'abrégé, Dunod, 2003, Paris.
194. Costes C., - Les enzymes. Production et utilisations industrielles, Bordas, Paris. 1982, pp. 37-195.
195. Mazur A.K. & Nakatani H., - Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic α -amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993, 306(1):29-38.
196. Nielson J.-E., Borchert T.-V. & Vriend G., - The determinant of α -amylase pH-activity profiles. Protein Engineering. Oxford University Press, 2001, 14(7): 505-512.
197. Scriban R., - Biotechnologies. Techniques et Documentation-Lavoisier. 1999, pp. 149-157.
198. Berry D. & Paterson A., - Enzymes in food industry. Sucking C.J. Enzyme chemistry impact and application. Edition champman and hall, London. 1990, pp. 306-351.
199. Kandra L., Gyemant G., Farakas E. & Liptak A., - Action pattern of porcine pancreatic α -amylase on three different series of beta-maltooligosaccharide glycoside. Carbohydrate Research, 1997, 289(3): 237-242.
200. Pazur J.H. & Marchetti N.T., - Action patterns of amylolytic enzymes as determined by the [1-¹⁴C] mlto-oligo-saccharides mapping method. Carbohydrate Research, 1992, 227: 215-225.
201. Bhella R.S. & Altosaar I., - Translational control of α -amylase gene expression in *Aspergillus awamori*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1987, 9(4): 287-293.
202. Chung-An L., Eng-Kiat L. & Su-May Y., - Sugar response sequence in the promoter of a rice α -amylase gene serves as a transcriptional enhancer. Journal of Biological Chemistry, 1998, 17:10120-10131.
203. Anders Kadziola, Jun-ichi Abe, Birte Svensson, Richard Haser, Crystal and Molecular Structure of Barley α -Amylase, Journal of mol biology. Vol 239, Issue 1, 26 May 1994, Pages 104-121.
- 204.
205. Vermerris W., Nicholson R. L., Phenolic compound biochemistry. Springer Science & Business Media, 2007.
206. B. Huang, H. Ke, J. He, X. Ban, H. Zeng, Y. Wang, Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo, F. ChemToxicol., 2011, 49: 185-90.
207. Snezana Agatonovic-Kustrin^{1*}, David Mortona¹ and Pauzi A. Yusof², Reversed Phase HPTLC-DPPH Free Radical Assay as a Screening Method for Antioxidant

- Activity in Marine Crude Extracts, *Oceanography*, 2014, 2:4.
<http://dx.doi.org/10.4172/2332-2632.1000e112>.
208. C I G Tuberosoa, M Boban, E Bifulco, D Budimir, F M Pirisia, Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey, *Food Chemistry*, 2013, 140 686–691.
 209. Re R., Pellegrini N., Proteggente A, Pannala A, Yang, M., Rice-Evans, c., .1999. Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
 210. Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. & Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 2002, 36, 177-187.
 211. Lew Paul Christopher, Bin Yao, Yun Ji: Lignin biodegradation with laccase-mediator systems, *Front. Energy Res.*, 31 March 2014 | <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00012>.
 - 212.
 213. Z Xiao, R Storms, A Tsang, A quantitative starch–iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities, *Analytical Biochemistry*, 2006 351, 146–148.
 214. YOSHIKAWA H, MARUO B. Stimulation of amylase formation by an amine from
 215. Jang, H., Choi, Y., Ahn, H.R., et al. Effects of phenolic acid metabolites formed after chlorogenic acid consumption on retinal degeneration in vivo. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, 59(10), 1918-1929.
 216. Lee, K., Lee, B.J., and Bu, Y. Protective effects of dihydrocaffeic acid, a coffee component metabolite, on a focal cerebral ischemia rat model. *Molecules*, 2015, 20(7), 11930-11940.
 217. Huang, J., De Paulis, T., and May, J.M. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. *J. Nutr. Biochem.* 2004, 15(12), 722-729.
 218. <https://www.caymanchem.com>
 219. Atlas du diabète de la FID, 9ème Edition, 2019, P4.
 220. Rogers Mwakalukwa, Yhiya Amen, Maki Nagata, and Kuniyoshi Shimizu, Postprandial Hyperglycemia Lowering Effect of the Isolated Compounds from Olive Mill Wastes – An Inhibitory Activity and Kinetics Studies on α -Glucosidase and α -Amylase Enzymes, *ACS Omega* 2020, 5, 20070–20079.
 221. Lebovitz H.E, Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metabol Clin North Am.* 1997; 26:539-551.

222. BECHIRI-ABBES Asma, Contribution à l'étude de l'effet de plantes médicinales sur l'hyperglycémie postprandiale chez le rat Wistar, 2016.
223. Shobana S., Sreerama Y.N., Malleshi N.G. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*. 2009; 115: 1268-1273.
224. Tundis R, Loizzo M.R, Menichini F. Natural products as alpha-amylase and alphaglucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*. 2010; 10(4): 315-31.
225. Charis M. Galanakis et Kali Kotsiou, RECOVERY OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM OLIVE MILL WASTE, *Sciencedirect*, 2017, Pages 205-229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.00010-8>
226. Antonella De Leonardis and Vincenzo Macciola, Olive Biophenols as Food Supplements and Additives, *Sciencedirect*, 2010, Pages 283-289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00030-9>
227. Monnier, L., Mas, E., Ginet, C., Michel, F., Villon, L., Cristol, J. P., & Colette, C. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *Jama*, 2006, 295(14), 1681-1687.
228. Ceriello, A., Taboga, C., Tonutti, L., Quagliaro, L., Piconi, L., Bais, B., ... & Motz, E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation effects of short-and long-term simvastatin treatment. *Circulation*, 2002, 106(10), 1211-1218.
229. Kaur, R., & Arora, S. Chemical constituents and biological activities of *Chukrasia tabularis* A. Juss.-A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2009, 3(4), 196-216.
230. Huang D., Ou B., Prior RL., The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*, 2005, 53: 1841-1856.
231. Amao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals:a practice case. *Tr Food Sc Tehnol*. 2000 ; 11(11): 419-421.
232. Mateos, R., Trujillo, M., Pereira-Caro, G., Madrona, A., Cert, A., & Espartero, J. L. New lipophilic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(22), 10960–10966.

233. Da-Yong Zhou, Yuan-Xin Sun, Fereidoon Shahidi, Preparation and antioxidant activity of tyrosol and hydroxytyrosol esters, *Journal of Functional Foods* 37 (2017) 66–73.
234. Rubio-Senent, F.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Lama-Muñoz, A.; Fernández-Bolaños, J. Phenolic extract obtained from steam-treated olive oil waste: characterization and antioxidant activity. *LWT–Food Sci. Technol.* 2013, 54, 114–124. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.04.011.
235. Alessandra De Bruno, Rosa Romeo, Francesca L. Fedele, Andrea Sicari, Amalia Piscopo & Marco Poiana, Antioxidant activity shown by olive pomace extracts, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2018, DOI: 10.1080/03601234.2018.1462928.
236. Gabriela A. Macedoa,c, Adina L. Santanaa,b, Lauren M. Crawfordc, Selina C. Wangc,d, Fernanda F.G. Diasc, Juliana M.L.N. de Moura Bellc, Integrated microwave- and enzyme-assisted extraction of phenolic compounds from olive pomace, *LWT - Food Science and Technology*, 2021, 138 110621.
237. Okoh, S., Asekun, O., Familoni, O., & Afolayan, A. Antioxidant and free radical scavenging capacity of seed and shell essential oils extracted from *Abrus precatorius* (L). *Antioxidants*, 2014, 3, 278–287. <https://doi.org/10.3390/antiox3020278>
238. Laine P., Kylli P., Heinonen M., Jouppila K. Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56:11251–11261. [PubMed] [Google Scholar]
239. Doughs Catalina Urzúaa,b, Estefanía González, Verónica Dueikb, Pedro Bouchonb, Begoña Giménezc, Paz Roberta, Olive leaves extract encapsulated by spray-drying in vacuum fried starch–gluten doughs, *food and bioproducts processing* 2017, 106, 171–180.
240. McCue, P. P., & Shetty, K. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 13, 101–106.
241. Kandil, A., Li, J., Vasanthan, T., & Bressler, D. C. Phenolic acids in some cereal grains and their inhibitory effect on starch liquefaction and saccharification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60, 8444e8449.
242. Nickavar, B., & Yousefian, N. Evaluation of α -amylase inhibitory activities of selected antidiabetic medicinal plants. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2011, 6(2), 191–195.

243. Komaki, E., Yamaguchi, S., Maru, I., Kinoshita, M., Kakehi, K., Ohta, Y., & Tsukada, Y. Identification of anti- α -amylase components from olive leaf extracts. Food Science and Technology Research, 2003. 9(1), 35-39.
244. Ali, M. S., Jahangir, M., ul Hussan, S. S., & Choudhary, M. I., Inhibition of α -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. Phytochemistry, 2002, 60(3), 295-299. 2 221

Conclusion Générale Et Perspectives

Conclusion générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans une problématique générale sur la recherche de méthodes de valorisation des déchets issus de l'extraction d'huile d'olive. En effet, Nous nous sommes proposés de développer une approche permettant de valoriser le contenu phénolique du grignon d'olive, connaissant les nombreux avantages des composés phénoliques (l'hydroxytyrosol, le tyrosol ...) sur la santé. Cependant ses composés ont tendance à s'oxyder facilement sous l'influence de la lumière, de l'oxygène, de la température, du pH et d'autres facteurs externes, conduisant à des changements structuraux. Par conséquent, il est difficile de maintenir pendant longtemps leur activité fonctionnelle dans les aliments, les médicaments et les cosmétiques. L'encapsulation est une technique qui permet de palier à ses problèmes.

Ainsi dans un premier temps, nous avons procédé à l'encapsulation d'un composé modèle (tyrosol), par lyophilisation. Deux types de chauffages ont été utilisés pour gélatiniser l'amidon de pomme de terre, car l'amidon natif à température ambiante est insoluble dans l'eau. Pour former le complexe amylose-phénols cela a nécessité de gélatiniser l'amidon à 100°C sous chauffage conventionnel et chauffage μ -onde. L'efficacité d'encapsulation a été meilleure sous chauffage μ -ondes comparativement au chauffage conventionnel. Nous avons également réalisé une cinétique de libération du tyrosol *in vitro* à 24°C et 37°C. Autant à température ambiante qu'à température corporelle, nous avons observé le relargage quasi-total du tyrosol dès les premières minutes de la cinétique.

Le chauffage sous μ -onde a été retenu pour l'encapsulation des composés phénoliques du grignon. Pour rappel dans cette étude nous avons travaillé sur un grignon commercial optimisé en tyrosol et en hydroxytyrosol. La caractérisation du grignon avant encapsulation par ULPC-DAD-MS a révélé la présence de deux autres composés en plus de ceux précédemment cités, il s'agit du glucoside d'hydroxytyrosol et de l'acide dihydrocafféique. En outre, l'encapsulation des composés phénoliques a été optimisée, en ayant recours à une technique d'encapsulation appelée kneading, à laquelle s'ajoute la lyophilisation. Les deux ainsi combinées ont considérablement participées à l'augmentation du pourcentage d'encapsulation des différents composés phénoliques, comparativement à l'encapsulation du tyrosol effectué seulement par lyophilisation.

L'analyse MEB-EDS, des différents complexes obtenus nous a permis d'effectuer une analyse qualitative et quantitative. Les images observées montrent la structure de l'amidon ayant subi un chauffage qui l'a déstructuré en passant de la forme granulaire à une forme lamellaire plus

ou moins lisse et ceci dans le cas des deux types de chauffage. L'analyse quantitative nous a permis d'observer la composition chimique des complexes ainsi que du grignon de départ qui avait un rapport C/O plus élevé que ceux des complexes de A/PP μ -ondes, mais plus proche de ceux des complexes de tyrosol.

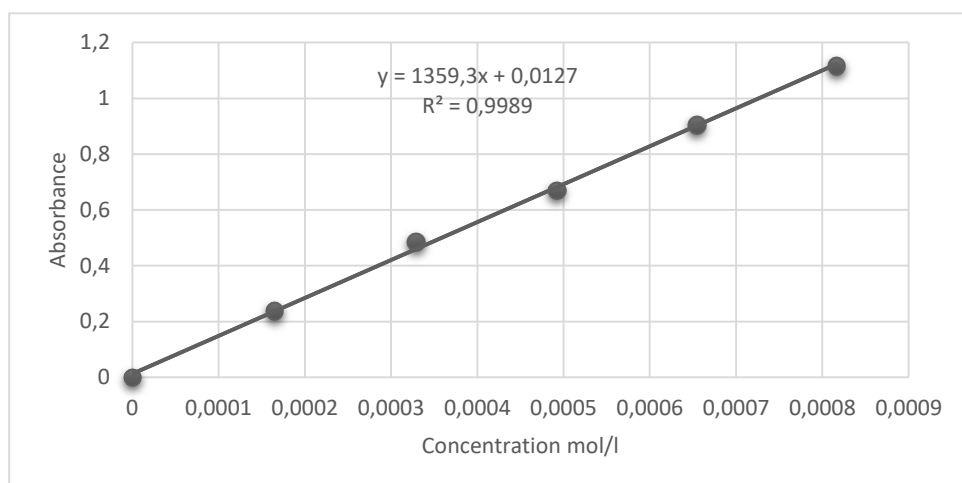
Par ailleurs, de nombreuses études ont rapporté l'implication des composés phénoliques dans le traitement de nombreuses pathologies, en l'occurrence le diabète de type 2. En effet, dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons procédé à l'étude de l'effet inhibiteur de l'enzyme alpha amylase ainsi que l'activité antioxydante des différents échantillons (GG départ, A/PP μ -ondes, A/Tyr conv et A/Tyr μ -ondes).

Cette étude nous a permis de tirer deux conclusions, la première portant sur l'efficacité d'encapsulation, car autant pour les composés phénoliques encapsulés que pour le tyrosol nous avons observé une importante activité antioxydante et antidiabétique. La deuxième concerne le phénomène synergique des composés phénoliques, car autant pour les composés phénoliques libres que pour les composés phénoliques encapsulés, nous avons noté de meilleures activités antioxydante et antidiabétique comparativement aux encapsulas de tyrosol.

Perspectives

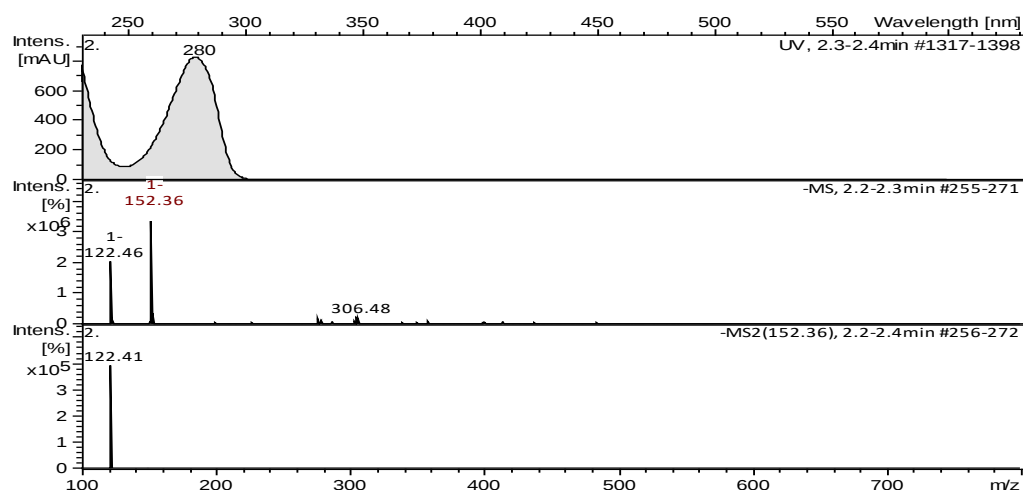
Compte tenu des résultats prometteurs obtenus dans l'encapsulation ainsi que les activités antioxydante et antidiabétique des composés phénoliques du grignon d'olive. Il serait intéressant d'élargir cette étude dans un premier temps aux déchets issus directement de l'extraction de l'huile d'olive, car dans notre étude nous n'avons travaillé que sur du grignon commercial optimisé en tyrosol et en hydroxytyrosol. Par contre avec le déchet brute il y'aura une grande variété de composés phénoliques qu'il serait intéressant d'encapsuler et ainsi pouvoir observer le phénomène d'encapsulation sélective de l'amylose vis-à-vis des composés phénoliques souvent rapporté dans la littérature. Dans un deuxième temps, il serait aussi intéressant de réaliser des études *in vivo*, car toutes les études ont été réalisées *in vitro* dans notre étude. Par ailleurs, pour envisager les encapsulas obtenus comme nutraceutique une panoplie d'analyse doit être effectuée entre autre la biodisponibilité des composés phénoliques encapsulés, leur toxicité etc.

Annexe 1 : détermination du coefficient d'absorption molaire du tyrosol

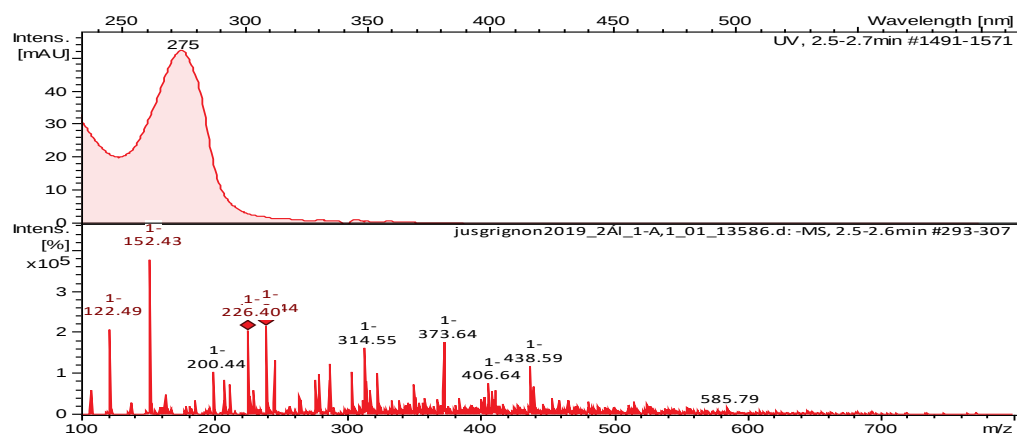


$\epsilon = 1360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 280 nm

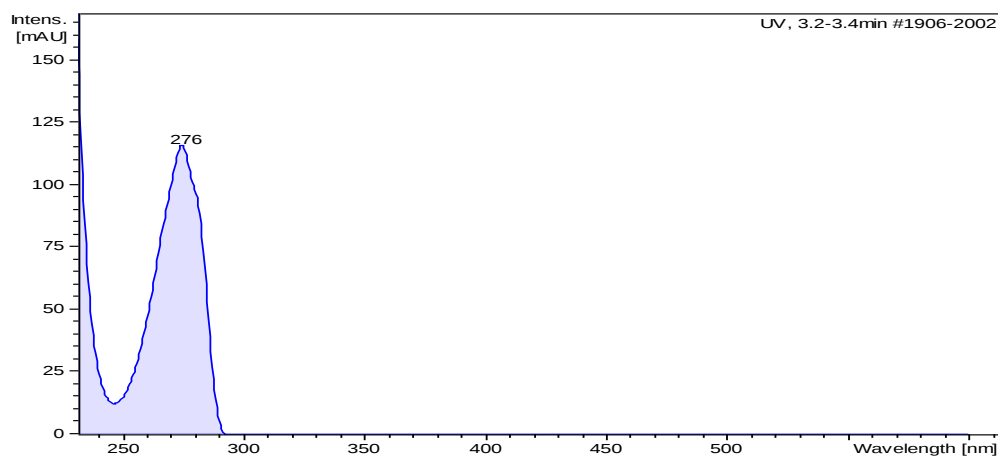
Annexe 2 : spectre UV-visible et spectre de masse de l'hydroxytyrosol standard



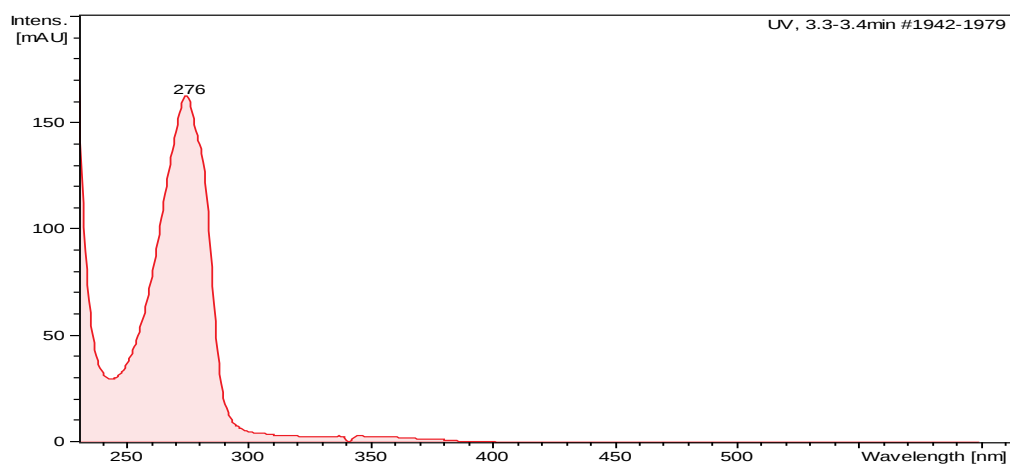
Annexe 3 : spectre UV-visible et spectre de masse du glucoside d'hydroxytyrosol dans le de grignon d'olive de départ



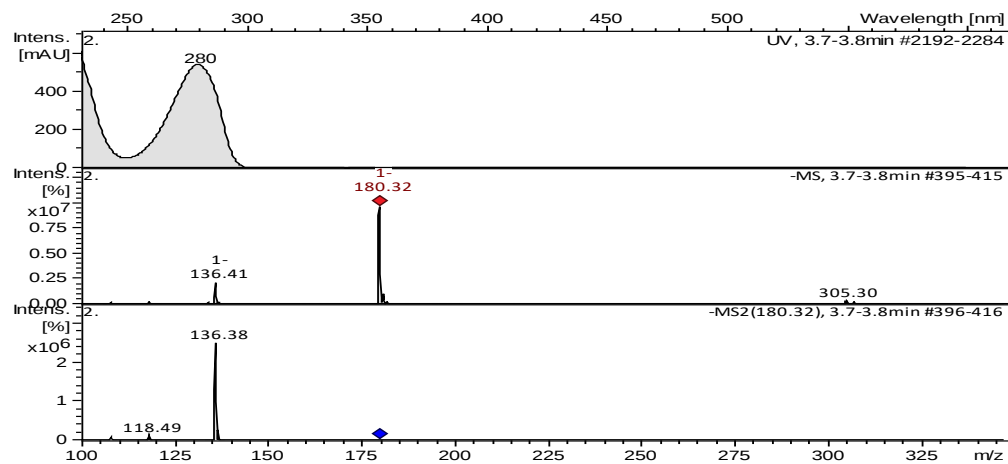
Annexe 4 : spectre UV-visible du tyrosol standard



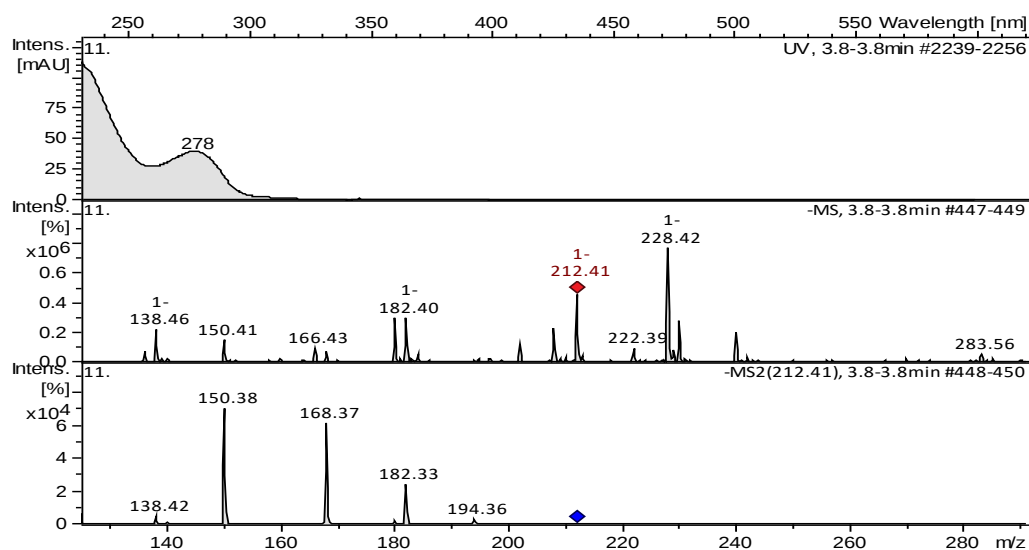
Annexe 5 : spectre UV-visible du tyrosol dans le grignon d'olive de départ



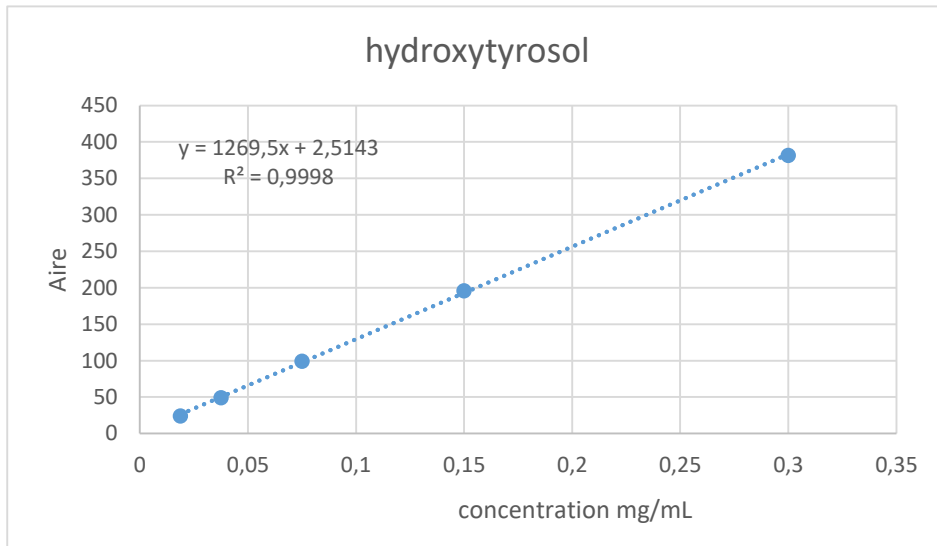
Annexe 6 : spectre UV-visible et spectre masse de l'acide dihydrocaféique standard

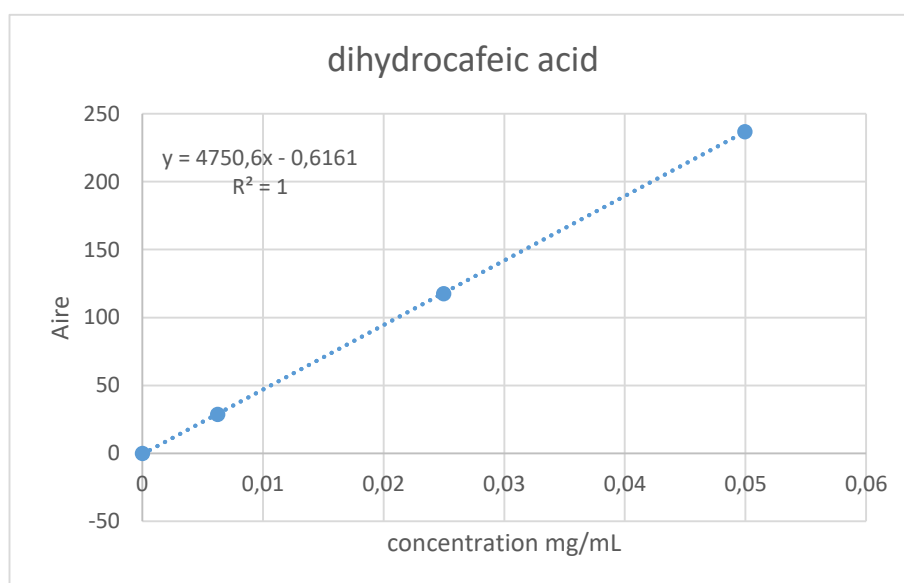
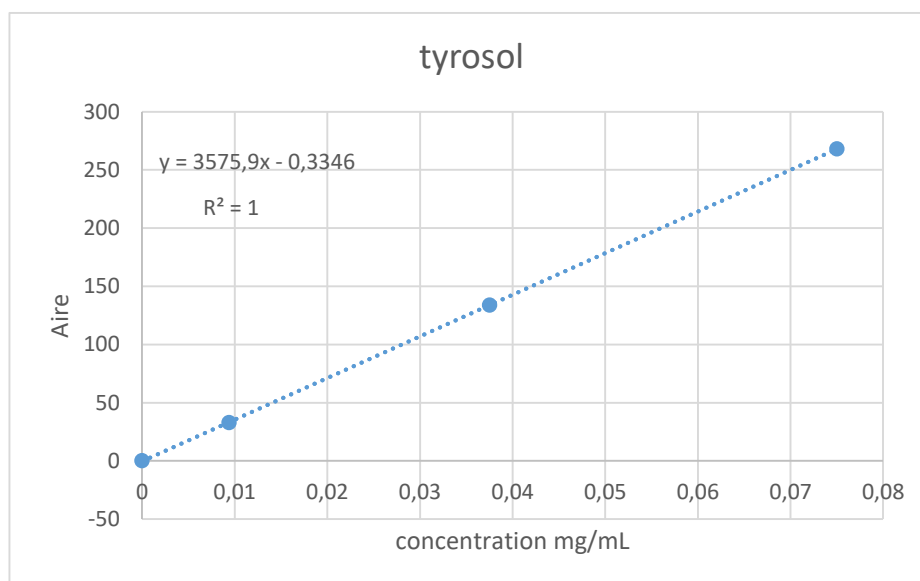


Annexe 7 : spectre UV-visible et spectre de masse de l'acide dihydrocaféique dans le grignon d'olive de départ

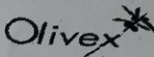
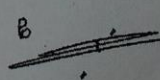


Annexe 8 : courbe d'étalonnage des composés phénoliques encapsulés dans l'amidon de pomme de terre





Annexe 9 : Fiche technique du grignon d'olive utilisé dans l'encapsulation des polyphénols

	Document : Fiche de RESULTAT D'ANALYSE / ANALYSIS RESULT SHEET	
	Produit / Product: Extrait d'Olive titré en polyphénols / Olive Extract with a guaranteed content in polyphenols	
	FT N° : 18 298 PHO NU	L1R18 278 PHO
Date d'analyse / Analysis date :	26/11/2018	
Date de fabrication / Manufacturing date :	05/10/2018	
Date d'expiration / Expiry date :	26/11/2020	
	RESULTATS / RESULTS	SPECIFICATIONS
Hydroxytyrosol (en équivalent Tyrosol) HPLC (%)	6,6	≥ 6,0
Hydroxytyrosol (as tyrosol equivalent) HPLC (%)		
Tyrosol (en équivalent Tyrosol) HPLC (%)	0,9	≥ 0,8
Tyrosol (as tyrosol equivalent) HPLC (%)		
Densité - Density	0,46	> 0,40
Humidité (%) - Moisture (%)	4,8	< 7,0
Teneur en solvant résiduel (Ethanol) (%)	0,045	< 0,1
Residual solvent content (Ethanol) (%)		
Microbiologie - Microbiology :		
Flora totale (ufc/g) - Total viable aerobic organisms (cfu/g)	0	< 1 000
Levures et moisissures (ufc/g) - Yeasts and moulds (cfu/g)	0	< 100
Coliformes totaux - Total coliforms	Absence - None	Absence - None
Escherichia Coli * - Escherichia Coli *	Absence - None	Absence - None
Salmonelle * - Salmonella *	Absence - None	Absence - None
Métaux lourds (ppm) - Heavy metals (ppm)		
Plomb - Lead	0,051	< 3,00
Arsenic - Arsenic	<0,01	< 2,00
Mercurie - Mercury	<0,005	< 0,10
Cadmium - Cadmium	0,061	< 1,00
HAP* - PAH*	Conforme - Conform	Conforme à la réglementation CE Conform to the EC regulation
Pesticides (ppm) - Pesticides (ppm)	Conforme - Conform	Conforme à la Pharmacopée Européenne Conform to the European Pharmacopoeia
*Dosé 1 fois par an sur un lot moyen - *Checked once a year on an average batch		
Commentaires :	Produit conforme aux spécifications	
Comments:	Product conform to specifications	
Analysé par - Analysed by : Sandra DEBRAY 	Approuvé par - Approved by : Nelly URBAN 	
Contrôle Qualité - Quality Control	Responsable Assurance Qualité - Quality Manager	

Résumé.

Ce travail s'insère dans le cadre de la valorisation des déchets de l'industrie oléicole. En effet, l'extraction de l'huile d'olive génère d'importante quantité de déchets. Selon le système d'extraction on obtient soit l'huile d'olive, margine et grignon (système à trois phases) ou soit l'huile et le grignon humide (système à deux phases). Les margines (déchet liquide) et les grignons (déchet solide) sont des déchets toxiques pour l'environnement surtout pour le sol du fait de leur forte teneur en composés phénoliques. Cependant, ses composés phénoliques ayant un fort pouvoir antioxydant sont très sollicités dans plusieurs secteurs industriels (pharmaceutiques, cosmétiques...). Ainsi, ce travail a été consacré à la valorisation des déchets d'olive notamment le grignon.

Dans une première partie nous avons procédé à l'encapsulation d'un composé phénolique modèle le tyrosol par la matrice de pomme de terre gélatinisé sous chauffage conventionnel et sous chauffage μ -ondes. L'efficacité d'encapsulation s'est avérée meilleure sous chauffage μ -ondes $75,7 \pm 10,4\%$ tandis qu'elle est de $48,2 \pm 5,4\%$ sous chauffage conventionnel. Le relargage contrôlé du tyrosol a été effectué *in vitro* en utilisant l'enzyme alpha amylase porcine à 24°C et à 37°C , la cinétique de libération a été réalisée sur 1h, dès les premières minutes la totalité du tyrosol était déjà libéré.

Le protocole d'encapsulation du tyrosol a été optimisé puis appliqué aux composés phénoliques du grignon d'olive commercial (optimisé en tyrosol et en hydroxytyrosol). Le grignon de départ a été caractérisé par UPLC-DAD-MS, les composés phénoliques identifiés sont l'hydroxytyrosol, le glucoside d'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'acide dihydrocafféique. Les mêmes composés ont été dosés dans la matrice de pomme de terre, le glucoside d'hydroxytyrosol a une efficacité d'encapsulation de 100%, l'hydroxytyrosol $97,0 \pm 0,5\%$, le tyrosol de $95,1 \pm 6,0\%$ et l'acide dihydrocafféique de $93,2 \pm \%$.

L'analyse au MEB des échantillons des complexes de tyrosol/amidon et de polyphénol/amidon, a montré le changement de la structure de l'amidon dû aux différents types de chauffage (conventionnel et μ -ondes) utilisés. L'analyse EDS a révélé la composition chimique des complexes et du grignon qui sont riches en carbone et oxygène.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'activité antioxydante et l'effet inhibiteur de l'enzyme alpha amylase (activité antidiabétique) des produits obtenus par l'encapsulation. L'activité antioxydante a été réalisée par deux méthodes (DPPH et ABTS). Les composés phénoliques libres et encapsulés ont une meilleure activité antioxydante comparativement aux échantillons de tyrosol. L'évaluation de l'effet inhibiteur de l'enzyme alpha amylase *in vitro*, a été réalisée par la méthode iodine, les composés phénoliques encapsulés et libres ont montrés une meilleure activité inhibitrice de l'enzyme alpha amylase par rapport aux échantillons de tyrosol.

Mots clés : Grignon d'Olive, Composés Phénoliques, Encapsulation, Antioxydant, Antidiabétique

Abstract.

This work is part of the recovery of waste from the olive industry. Indeed, the extraction of olive oil generates a large amount of waste, depending on the extraction system we obtain either olive oil, vegetable water and pomace (three-phase system) or either the oil and moist pomace (two-phase system). Vegetable waters (liquid waste) and pomace (solid waste) are toxic waste for the environment due to their high content of phenolic compounds. However, its phenolic compounds having a strong antioxidant power are in great demand in several industrial sectors (pharmaceuticals, cosmetics, etc.). Thus, this work was devoted to the recovery of olive waste, in particular pomace.

In a first part, we proceeded to the encapsulation of a phenolic compound model tyrosol by the gelatinized potato matrix under conventional heating and under μ -wave heating. The encapsulation efficiency was found to be better under μ -wave $75.7 \pm 10.4\%$ heating while it is $48.2 \pm 5.4\%$ under conventional heating. The controlled release of tyrosol was carried out *in vitro* using the enzyme porcine alpha amylase at 24°C and 37°C , the release kinetics were carried out over 1 hour, from the first minutes all of the tyrosol was already released.

The tyrosol encapsulation protocol was optimized and then applied to the phenolic compounds of commercial olive pomace (optimized for tyrosol and hydroxytyrosol). The starting pomace was characterized by UPLC-DAD-MS, the phenolic compounds identified are hydroxytyrosol, hydroxytyrosol glucoside, tyrosol and dihydrocaffeic acid. The same compounds were assayed in the potato matrix; hydroxytyrosol glucoside has 100% encapsulation efficiency, hydroxytyrosol 97.0 ± 0.5 , tyrosol 95.1 ± 6.0 and dihydrocaffeic acid $93.2 \pm 5\%$.

SEM analysis of samples of tyrosol / starch and polyphenol / starch complexes showed the change in starch structure due to the different types of heating (conventional and μ -wave) used. EDS analysis revealed the chemical composition of the complexes and pomace, which are rich in carbon and oxygen.

In a second part, we studied the antioxidant activity and the inhibitory effect of the enzyme alpha amylase (antidiabetic activity) of the products obtained by the encapsulation. Antioxidant activity was achieved by two methods (DPPH and ABTS). Free and encapsulated phenolic compounds have better antioxidant activity compared to tyrosol samples. The evaluation of the inhibitory effect of the alpha amylase enzyme *in vitro* was carried out by the iodine method, the encapsulated and free phenolic compounds showed better inhibitory activity of the alpha amylase enzyme compared to the tyrosol samples.

Key words: Olive Pomace, Phenolic Compounds, Encapsulation, Antioxidant, Antidiabetic.

Article

One-Step Extraction of Olive Phenols from Aqueous Solution Using β -Cyclodextrin in the Solid State, a Simple Eco-Friendly Method Providing Photochemical Stability to the Extracts

Aurélia Malapert ¹, Emmanuelle Reboul ² , Olivier Dangles ¹ , Alain Thiéry ³, N'abinty Sylla ⁴  and Valérie Tomao ^{1,*} 

¹ Avignon University, INRAE, UMR408 MicroNut Team, 84000 Avignon, France; aurelia.malapert@univ-avignon.fr (A.M.); olivier.dangles@univ-avignon.fr (O.D.)

² Aix-Marseille University, INRAE, INSERM, C2VN, Marseille, France; emmanuelle.reboul@univ-amu.fr

³ Aix-Marseille University, CNRS, IRD, IMBE, Marseille, France; alain.thiery@imbe.fr

⁴ Université Mohamed V de Rabat, BP 8007, Rabat 10000, Morocco; nabinty62@yahoo.fr

* Correspondence: valerie.tomao@univ-avignon.fr



Citation: Malapert, A.; Reboul, E.; Dangles, O.; Thiéry, A.; Sylla, N.; Tomao, V. One-Step Extraction of Olive Phenols from Aqueous Solution Using β -Cyclodextrin in the Solid State, a Simple Eco-Friendly Method Providing Photochemical Stability to the Extracts. *Molecules* **2021**, *26*, 4463. <https://doi.org/10.3390/molecules26154463>

Academic Editor: Teresa Escribano Bailón

Received: 2 July 2021

Accepted: 21 July 2021

Published: 24 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The extraction of phenolic compounds from olive mill wastes is important, not only to avoid environmental damages, but also because of the intrinsic value of those biophenols, well-known for their high antioxidant potential and health benefits. This study focuses on tyrosol (Tyr) and hydroxytyrosol (HT), two of the main phenolic compounds found in olive mill wastes. A new, simple, and eco-friendly extraction process for the removal of phenolic compounds from aqueous solutions using native β -cyclodextrin (β -CD) in the solid state has been developed. Several β -CD/biophenol molar ratios and biophenol concentrations were investigated, in order to maintain β -CD mostly in the solid state while optimizing the extraction yield and the loading capacity of the sorbent. The extraction efficiencies of Tyr and HT were up to 61%, with a total solid recovery higher than 90% using an initial concentration of 100 mM biophenol and 10 molar equivalents of β -CD. The photochemical stability of the complexes thus obtained was estimated from ΔE^*_{ab} curve vs. illumination time. The results obtained showed that the phenols encapsulated into solid β -CD are protected against photodegradation. The powder obtained could be directly developed as a safe-grade food supplement. This simple eco-friendly process could be used for extracting valuable biophenols from olive mill wastewater.

Keywords: hydroxytyrosol; tyrosol; β -cyclodextrin; extraction

1. Introduction

In the Mediterranean basin, two of the main agricultural wastes are olive mill wastewaters (OMWW) and olive pomace, both of which are associated with olive oil production [1]. As much as 98% of olive phenolic compounds remain in wastes after olive mill processing and cause environmental damages upon spreading in fields [2]. The European Protection Agency (EPA), in collaboration with organizations, has developed regulations and laws restricting the phenolic content of wastewaters [3].

Previous studies have focused on decreasing the pollutant character of olive mill effluents by removing phenolic compounds. Iboukhoulé et al. [4] succeeded in reducing the phenolic content of OMWW by more than 60% in 65 min. This was accomplished by using an oxidative process based on Cu^{I} and hydrogen peroxide (Fenton reaction). Alternatively, an optimized ozonolytic process allowed the removal of more than 80% of phenolic compounds from wastewaters [5]. On the other hand, physical techniques, especially filtration methods, are commonly used for cleaning water effluents. For instance, Comandini et al. [6] removed phenolic compounds from OMWW by performing ultrafiltration followed by a reverse osmosis step. The ultrafiltration step removed about 40% of the phenolic compounds from the initial OMWW, then reverse osmosis yielded a phenolic-free permeate

and a phenolic-rich concentrate. Other filtration methods rest on adsorption technologies. Aly et al. [7] successively used columns of gravel, fine sand, and a zeolite/acidified cotton mixture for removing pollutants from OMWW. Final steps with activated charcoal and lime led to safe effluents that could be used for irrigation. Abdelkreem [8] dried the olive mill pomace to turn it into an adsorbent that could be used for removing 85% of the phenolic compounds from OMWW. Using granular activated carbon (GAC), Aliakbarian et al. [9] removed 96% of phenolic compounds from OMWW and produced a clean water sample. Ena et al. [10] compared the ability of GAC and Azolla to remove phenolic compounds from OMWW. GAC showed higher adsorption and desorption capacities than Azolla, and the profile of the phenolic compounds retained was different according to the adsorbent used. While the total phenolic content was more than twice as high in the Azolla treated OMWW, HT was more abundant in the GAC-treated OMWW.

Apart from their polluting character, olive mill wastes have emerged as a valuable and economic source of natural phenolic compounds known for their diverse biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties. Among them, HT is considered to be one of the most interesting phenolic compounds in olive oil and its by-products [11].

β -CD is a cyclic oligosaccharide composed of seven D-glucopyranose units connected by α -1,4 bonds. β -CD is “Generally Recognized as Safe” (GRAS) by the European Food Safety Agency (EFSA), which has defined an acceptable daily intake for β -CD of 5 mg/kg of body weight [12]. Due to its relatively nonpolar cavity and its hydrophilic outer surface, β -CD has a well-known ability to form inclusion complexes with a wide range of valuable compounds in aqueous solution, and is nowadays commonly used as a part of formulations for protecting or enhancing the solubility of guest compounds. β -CD also finds many applications in food processing for controlling flavor release or for reducing a bitter taste, for example. Complex formation depends on complementary sizes and the development of stabilizing molecular interactions between host and guest [13].

β -CD is also able to encapsulate phenolic compounds in an aqueous solution [14] and this property could therefore be used for reducing their bitter taste [15]. Moreover, López-García et al. [16] showed that β -CD could increase the antioxidant activity of HT by providing photoprotection. Host-guest complexes can also be formed in the solid state for convenient handling and storage. Spray- and freeze-drying processes are commonly used, and first require mixing β -CD and phenol in an aqueous solution to form the complexes. Over the last 10 years, works on phenolic compounds from olive leaves, [17] *Melissa Officinalis* leaves, [18] and blueberry juice [19] have been reported. Hundre et al. also prepared β -CD-vanillin complexes by spray drying, freeze drying, or by a combination of both, and concluded that the method selected has an impact on the external shape and thermal stability of the powder [20]. Other methods for preparing complexes in the solid state are the classical co-precipitation procedure, the paste technique, (or kneading, which consists in mixing the host and guest with a small amount of water), and solid phase complexation using a high level of mechanical energy to co-grind or extrude the complexes. Only a few studies have focused on the complexes of HT and Tyr with β -CD in the solid state. For instance, Garcia-Padial et al. [21] prepared the solid Tyr- β -CD complex by co-evaporation and kneading.

In this study, a new, simple, and eco-friendly process was developed for the one-step extraction of olive phenolic compounds from an aqueous solution by directly forming a solid-state complex with β -CD. The conditions were optimized in terms of phenol and β -CD concentration and molar ratio.

2. Results and discussion

2.1. Influence of the β -CD/Phenol Molar Ratio

Biophenols were extracted from 10 mM biophenol solutions containing various β -CD amounts over 3 h. The Tyr or HT concentration in the supernatant was plotted as a function of time (Figure 1A,B).

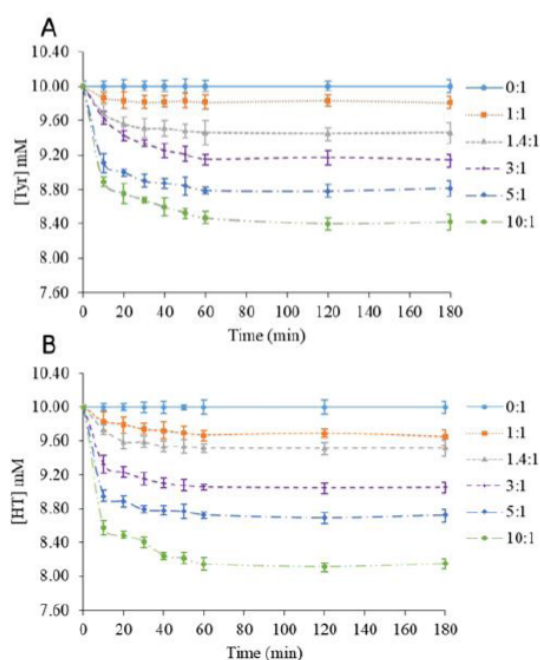


Figure 1. Time-dependence of tyrosol (A) and hydroxytyrosol (B) concentration according to the β -CD/phenol molar ratio.

The studies of solid β -CD as a biophenol-extracting agent led to similar kinetics for Tyr and HT. Compared to standard solutions without β -CD (0:1), adding β -CD caused a fast decrease in the remaining biophenol concentration in the supernatant, which was complete after 60 min. This phenomenon could be explained by the fast adsorption of the phenols onto the solid to reach the equilibrium state [22,23]. Our observations were in agreement with the literature [24–26]. The β -CD/phenol molar ratios of 1:1 and 1.4:1 corresponded to β -CD below or at its solubility limit (16 g/L at 20 °C), and thus did not allow the recovery of powders. However, shifts in the phenols' absorption bands consistent with the formation of inclusion complexes in a solution were observed. At higher molar ratios, solid recovery was possible. Wang et al. [27] studied the adsorption of phenols from wastewaters onto cross-linked β -CD-diphenylmethane diisocyanate polymer particles. The kinetics observed were similar with Tyr and HT.

As shown in Table 1, the solid recovery increased with the β -CD/Tyr molar ratio from 22.2% to 75.4% of the initial solid quantity (β -CD + Tyr). After correcting for the amount of solubilized β -CD, the values increased from 69.2% to 89.5%. For comparison, using freeze-drying, Jantarat et al. [28] obtained a 95.7% yield for curcumin encapsulated into a β -CD derivative. The extraction efficiency was calculated from the biophenol concentration in the rinsed MeOH fraction compared to the initial content. Results were in agreement with the kinetic data, showing an enhancement of the extraction efficiency at higher β -CD/Tyr molar ratios. Kumar et al. [29] proposed that a higher adsorbent amount, although it offers a larger number of available binding sites, could generate partial aggregation. The loading efficiency (Q_e), which decreased with the β -CD quantity, seemed to be consistent with this view.

The same analyses were carried out with the β -CD-HT powder and gave similar data (Table 2).

Table 1. Solid recovery, extraction, and loading efficiencies for a 10 mM Tyr solution.

	Solid Recovery (%)	Solid Recovery Efficiency (%)	Extraction Efficiency (%)	Loading Efficiency	
				mmol/100 g	mg/g
3:1	22.2 ± 3.9	69.2 ± 3.9	2.2 ± 0.2	2.9 ± 0.3	4.1 ± 0.4
5:1	51.7 ± 4.6	79.9 ± 4.6	6.1 ± 0.4	2.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1
10:1	75.4 ± 5.1	89.5 ± 5.1	10.9 ± 1.2	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1

Table 2. Solid recovery, extraction, and loading efficiencies for a 10 mM HT solution.

β-CD/HT Ratio	Solid Recovery (%)	Solid Recovery Efficiency (%)	Extraction Efficiency (%)	Loading Efficiency	
				mmol/100 g	mg/g
3:1	31.4 ± 4.8	78.4 ± 4.8	3.4 ± 0.3	3.2 ± 0.2	4.9 ± 0.3
5:1	57.4 ± 5.4	85.6 ± 5.4	7.1 ± 0.6	2.2 ± 0.0	3.4 ± 0.1
10:1	79.1 ± 3.1	93.2 ± 3.1	13.6 ± 1.3	1.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1

Hence, it can be suggested that solid β-CD does not express selectivity in its extraction of Tyr or HT despite the higher affinity of the former for β-CD in aqueous solution, which is reflected by a ca. 10 times higher binding constant [21]. This is an indication that extraction does not proceed by the encapsulation of the phenols inside the β-CD cavity (as in aqueous solution) but rather by adsorption on the macrocycle's surface, probably by hydrogen bonding. In that view, it may be significant that HT (2 phenolic OH groups, vs. only 1 for Tyr) tends to be slightly more efficiently extracted.

2.2. Influence of the Biophenol Concentration

According to the preceding results, the highest extraction efficiency was obtained with 10 molar β-CD equivalents. This condition was further tested with concentrated solutions of olive phenols (100 mM) (Figure 2).

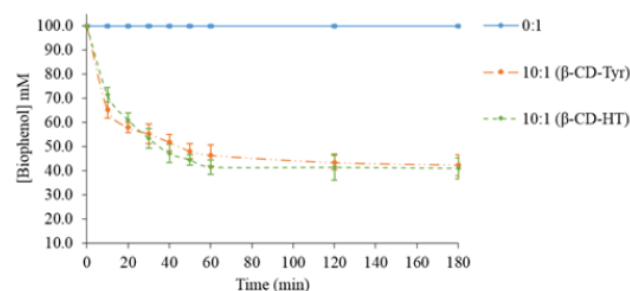


Figure 2. Time-dependence of the biophenol concentration in a concentrated aqueous solution according to the β-CD/phenol molar ratio of 10:1.

As expected, the biophenol concentration in the aqueous phase decreased when the β-CD amount increased. For the same β-CD/biophenol molar ratio, this decrease was significantly higher than in dilute biophenol solutions (10 mM, Figure 1A,B). Table 3 presents the powder analysis.

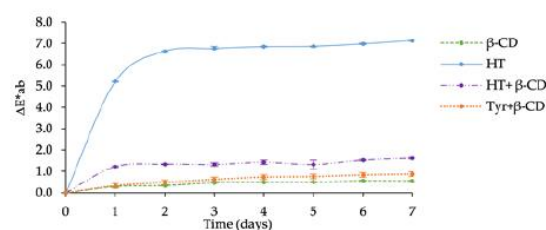
Working with concentrated solutions of phenols permitted much better extraction yields (over 60%) to be reached. The loading efficiency Q_e was still higher than in any experiment starting from a 10 mM Tyr solution. The assays on a concentrated HT solution gave almost identical results.

Table 3. Solid recovery, extraction, and loading efficiencies for 100 mM Tyr or HT solutions.

	β -CD/ Phenol Ratio	Solid Recovery (%)	Solid Recovery Efficiency (%)	Extraction Efficiency (%)	Loading Efficiency	
					mmol/100 g	mg/g
Tyr	10:1	91.7 $\pm$ 6.2	93.1 $\pm$ 6.2	61.9 $\pm$ 4.9	5.9 $\pm$ 0.1	8.2 $\pm$ 0.1
HT	10:1	92.2 $\pm$ 3.1	93.6 $\pm$ 3.1	61.7 $\pm$ 3.1	5.9 $\pm$ 0.1	9.1 $\pm$ 0.2

2.3. Photochemical Stability

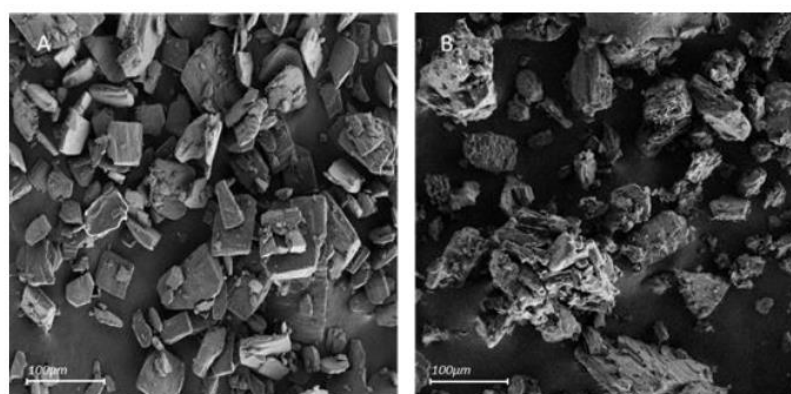
The photochemical stability of the phenol- β -CD complexes was assessed by plotting ΔE^*_{ab} vs. illumination time in comparison with the free phenols (Figure 3).

Figure 3. ΔE^*_{ab} values of β -CD, HT, Tyr, HT+ β -CD, Tyr+ β -CD during photochemical degradation.

The results clearly showed significant differences between the kinetic profiles. HT exhibited a higher ΔE^*_{ab} value than HT+ β -CD over time. The high photodegradation rate observed for free HT is in accordance with the sensitivity of catechols to oxidation. Interestingly, the solid matrix of β -CD strongly enhances the photostability of HT. The kinetic curves for Tyr and Tyr+ β -CD exhibited similar trends with lower ΔE^*_{ab} values (consistent with Tyr being less oxidizable than HT). β -CD protects both phenols against photodegradation in the solid state. By providing a physical barrier between individual phenol molecules, β -CD possibly inhibits the photo-induced polymerization of phenols into brown products.

2.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The following SEM micrographs compare the external shapes of pure β -CD and β -CD + Tyr particles (Figure 4).

Figure 4. Scanning electron micrographs of β -CD (A) and the powder recovered after extraction of Tyr from a 100 mM aqueous solution (10:1 β -CD/Tyr molar ratio) (B) (Magnification: $\times 140$).

Pure β -CD has a micro-sized, angular shape, producing geometrical structures. The solid β -CD-Tyr particles also display the micro-sized morphology. However, the external surface is very irregular and striated compared to pure β -CD. This characteristic could be caused by Tyr particles deposited onto the β -CD particles.

In conclusion, this simple process potentially provides an efficient and sustainable method to extract and stabilize olive phenols from olive oil by-products. The dissociation of the phenol- β -CD particles for β -CD recycling can be simply achieved by rinsing with ethanol, a food-grade solvent in which the phenols, unlike β -CD, are largely soluble.

Work is under way to apply the process to integral OMWW.

3. Experimental

3.1. Materials

β -CD was kindly given by Roquettes Frères (Lesterm, France). Folin-Ciocalteu reagent was supplied by Sigma-Aldrich® (Gillingham, UK). Analytical grade methanol and water were from VWR® (Fontenay-sous-Bois, France) and Fisher Scientific® (Leics, UK), respectively. Tyr was supplied by Sigma-Aldrich® (Deisenhofer, Germany) and HT was purchased from Extrasynthèse (Genay, France).

3.2. Spectroscopic Analysis

UV-visible analyses were performed on an Agilent® 8453 UV-Visible spectrophotometer (Waldbronn, Germany) in a quartz cell (1 cm path length). For quantification, the molar absorption coefficients of the olive phenols were determined: $\epsilon_{(\text{Tyr})} = 1414 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 275 nm, $\epsilon_{(\text{HT})} = 2568 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 280 nm.

3.2.1. Standard Solution

To optimize the phenol- β -CD molar ratio, 10 mM biophenol solutions were prepared in 25 mL H_2O . Then, β -CD was added to a β -CD/phenol molar ratio of 1:1; 3:1; 5:1; 10:1. The β -CD/phenol molar ratio of 1.4:1 corresponds to the β -CD limit of solubility (16 g L^{-1} at 20°C). To optimize the phenolic concentration, 10 mL of a 100 mM phenol solution were mixed with β -CD at 20°C . The β -CD/phenol molar ratio of 10:1 was investigated with both Tyr and HT. All analyses were performed on fresh standard solutions. Each analysis was repeated three times.

3.2.2. Kinetic Analysis

Standard solutions were mixed with β -CD in the solid state at 20°C under stirring at 250 rpm. The phenol concentration in the supernatant was monitored by UV/Vis spectroscopy over 3 h. A brief centrifugation step or dilution into water was carried out if necessary.

3.3. Analysis of Complexes in the Solid State

3.3.1. Solid Recovery Procedure

At the end of kinetics, the biophenol+ β -CD mixture was filtered on a glass filtering funnel (porosity 5). The recovered solid was dried at 35°C until the mass variation was less than 10%. The solid recovery was determined as a percentage of the initial solid amount (biophenol+ β -CD). It was corrected for the solubilized β -CD amount (16 g L^{-1} at 20°C) to determine the true solid recovery efficiency.

3.3.2. Loading and Extraction Efficiencies

The final powders recovered from the kinetic procedure were analyzed to determine the amount of Tyr or HT retained by solid β -CD. Thus, 50 mg of powder were rinsed with 2 mL MeOH and filtered on a $0.2 \mu\text{m}$ PTFE syringe. The loading efficiency Q_e (mmol/100 g) and the extraction efficiency (EE) were then calculated as follows:

$$Q_e = \frac{C_p V_s}{m} \times 100 \quad (1)$$

$$EE = \frac{C_p V_s}{m} \times \frac{m_{\text{recovered solid}}}{C_i V_i} \times 100 \quad (2)$$

where C_p = phenol concentration in the MeOH fraction, vs. = volume of MeOH (2 mL), C_i = initial phenol concentration, V_i = initial volume, and m = mass of the rinsed powder.

3.4. Photodegradation

Photodegradation experiments were performed using a Suntest CPS+ photoreactor (Atlas Photonics), equipped with a xenon arc lamp and a filter to prevent the transmission of wavelengths below 290 nm. Each sample was packed into a quartz mold of 4 mm in diameter and 3 mm in thickness and was then irradiated for seven days at 765 W/m². The photoreactor temperature was approximately 35 °C.

The color of the samples was measured each day according to the CIELAB color scale, over a white background on a reflection spectrophotometer (CM-3500d, Minolta, Osaka, Japan). The aperture diameter of the measuring port was 3 mm. After color measurement, the CIELAB-based color difference (ΔE^*_{ab}) was calculated as:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]} \quad (3)$$

3.5. Scanning Electron Microscopy

The solid particles obtained at a β -CD/Tyr molar ratio of 10:1 were investigated with a Gemini SEM (Zeiss®) scanning electron microscope at a voltage of 3 kV. The microstructure was not coated and was observed at different extensions.

4. Conclusions

This patented work describes a one-step procedure for the concomitant removal of olive phenols from wastewater and the formulation of these micronutrients into a native β -CD matrix. It is based on the affinity of solid β -CD for olive phenols.

Extraction efficiencies obtained for Tyr and HT were up to 61%, with a total solid recovery higher than 90%. The UV irradiation of the phenol- β -CD complexes clearly showed the ability of β -CD in the solid state to protect phenols against photodegradation. This procedure is very simple, environmentally friendly (as no organic solvent is involved), and probably much cheaper than the preparation of phenol- β -CD powders by spray- or freeze-drying processes. It could be applied to agricultural wastewaters for the recovery of high-value phenolic compounds for use as food supplements.

5. Patents

A patent resulted from the work reported in this manuscript: Tomao, V.; Malapert, M. Method for extracting phenolic compounds. EP 3 603 415 B1, 30 December 2020.

Author Contributions: Conceptualization, V.T. and E.R.; validation, V.T., E.R., A.M., and O.D.; investigation, V.T., A.M., N.S., and A.T.; resources, V.T., E.R., A.M., and O.D.; data curation, V.T., A.M., O.D., and N.S.; writing—original draft preparation, V.T., A.M., O.D., N.S., A.T., and E.R.; writing—review and editing, V.T., O.D., and A.M.; visualization, V.T. and O.D.; supervision, V.T. and E.R.; project administration, V.T. and E.R.; funding acquisition, V.T. and E.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Avignon University, FR4241 Tersys.

International Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Roquette Frères (Lestrem, France) and Moulin Castelas (Baux de Provence, France) for providing β -CD and alperujo respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the phenol- β -CD complexes are available from the authors.

References

1. Tsagaraki, E.; Lazarides, H.N.; Petrotos, K.B. *Olive Mill Wastewater Treatment*; Springer: Boston, MA, USA, 2007; pp. 133–157.
2. Rodis, P.S.; Karathanos, V.T.; Mantzavinou, A. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 596–601. [\[CrossRef\]](#)
3. World Health Organization. *Guidelines for Drinking-Water Quality [Electronic Resource]: Incorporating 1st and 2nd Addenda, Recommendations*, 3rd ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2008; Volume 1, pp. 417–419.
4. Iboukhoulef, H.; Amrane, A.; Kadi, H. Removal of phenolic compounds from olive mill wastewater by a Fenton-like system H_2O_2/Cu^{II} -thermodynamic and kinetic modeling. *Desalination Water Treat.* **2016**, *57*, 1874–1879. [\[CrossRef\]](#)
5. Chedeville, O.; Debaq, M.; Porte, C. Removal of phenolic compounds present in olive mill wastewaters by ozonation. *Desalination* **2009**, *249*, 865–869. [\[CrossRef\]](#)
6. Comandini, P.; Lerma-García, M.J.; Massanova, P.; Simó-Alfonso, E.F.; Gallina Toschi, T. Phenolic profiles of olive mill wastewaters treated by membrane filtration systems. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90*, 1086–1093. [\[CrossRef\]](#)
7. Aly, A.A.; Hasan, Y.N.Y.; Al-Farraj, A.S. Olive mill wastewater treatment using a simple zeolite-based low-cost method. *J. Environ. Manag.* **2014**, *145*, 341–348. [\[CrossRef\]](#)
8. Abdelkreem, M. Adsorption of Phenol from Industrial Wastewater Using Olive Mill Waste. *APCBEE Procedia* **2013**, *5*, 349–357. [\[CrossRef\]](#)
9. Aliakbarian, B.; Casazza, A.; Perego, P. Valorization of olive oil solid waste using high pressure—High temperature reactor. *Food Chem.* **2011**, *128*, 704–710. [\[CrossRef\]](#)
10. Ena, A.; Pintucci, C.; Carlozzi, P. The recovery of polyphenols from olive mill waste using two adsorbing vegetable matrices. *J. Biotechnol.* **2012**, *157*, 573–577. [\[CrossRef\]](#)
11. Fernández-Bolaños, J.G.; López, Ó.; López-García, M.Á.; Marset, A. Biological properties of hydroxytyrosol and its derivatives. In *Olive Oil-Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*; IntechOpen: London, UK, 2012; pp. 20–24.
12. Mortensen, A.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Di Domenico, A.; Dusemund, B.; Frutos, M.J.; Galtier, P.; Gott, D.; Gundert-Remy, U.; Leblanc, J.; et al. Re-evaluation of β -cyclodextrin (E 459) as a food additive. *EFSA J.* **2016**, *14*, 4628.
13. Zarzycki, P.K.; Fenert, B.; Glód, B.K. Cyclodextrins-based nanocomplexes for encapsulation of bioactive compounds in food, cosmetics, and pharmaceutical products: Principles of supramolecular complexes formation, their influence on the antioxidative properties of target chemicals, and recent advances in selected industrial applications. In *Encapsulations, Nano-Technology in the Agri-Food Industry*; Grumezescu, A.M., Ed.; Academic Press: London, UK, 2016; pp. 717–767.
14. Aksamija, A.; Polidori, A.; Plasson, R.; Dangles, O.; Tomao, V. The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: A thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis. *Food Chem.* **2016**, *208*, 258–263. [\[CrossRef\]](#)
15. Rescifina, A.; Chiacchio, U.; Iannazzo, D.; Piperno, A.; Romeo, G. β -cyclodextrin and caffeine complexes with natural polyphenols from olive and olive oils: NMR, thermodynamic, and molecular modeling studies. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11876–11882. [\[CrossRef\]](#)
16. López-García, M.Á.; López, Ó.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G. Complexation of hydroxytyrosol with β -cyclodextrins. An efficient photoprotection. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8006–8011. [\[CrossRef\]](#)
17. Mourtzinis, I.; Salta, F.; Yannakopoulou, K.; Chiou, A.; Karathanos, V.T. Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8088–8094. [\[CrossRef\]](#)
18. Mourtzinis, I.; Papadakis, S.E.; Igoumenidis, P.; Karathanos, V.T. Encapsulation of Melissa Officinalis leaf's active compounds in β -cyclodextrin and modified starch. *Procedia Food Sci.* **2011**, *1*, 1679–1685. [\[CrossRef\]](#)
19. Wilkowska, A.; Ambroziak, W.; Czyżowska, A.; Adamiec, J. Effect of microencapsulation by spray-drying and freeze-drying technique on the antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) juice polyphenolic compounds. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2016**, *66*, 11–16. [\[CrossRef\]](#)
20. Hundre, S.Y.; Karthik, P.; Anandharamkrishnan, C. Effect of whey protein isolate and β -cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying method. *Food Chem.* **2015**, *174*, 16–24. [\[CrossRef\]](#)
21. García-Padial, M.; Martínez-Ohárriz, M.C.; Isasi, J.R.; Vélaz, I.; Zornoza, A. Complexation of tyrosol with cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, *75*, 241–246. [\[CrossRef\]](#)
22. Ahmaruzzaman, M. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2008**, *143*, 48–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Soto, M.L.; Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption. *J. Food Eng.* **2011**, *105*, 1–27. [\[CrossRef\]](#)
24. Aoki, N.; Murai, H.; Hattori, K. Removal of phenolic compounds from aqueous solutions using ionic interaction between cyclodextrin derivatives and chitosan. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **2010**, *35*, 809–812. [\[CrossRef\]](#)
25. Romo, A.; Peñas, F.J.; Isasi, J.R.; García-Zubiri, I.X.; González-Gaitano, G. Extraction of phenols from aqueous solutions by β -cyclodextrin polymers. Comparison of sorptive capacities with other sorbents. *React. Funct. Polym.* **2008**, *68*, 406–413. [\[CrossRef\]](#)
26. Xiaohong, L.I.; Baowei, Z.; Kun, Z.H.U.; Xuekui, H.A.O. Removal of nitrophenols by adsorption using β -cyclodextrin modified zeolites. *Chin. J. Chem. Eng.* **2011**, *19*, 938–943.

27. Wang, H.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Han, P.; Lü, X. A facile removal of phenol in wastewater using crosslinked β -cyclodextrin particles with ultrasonic treatment: Removal of phenol in wastewater using β -cyclodextrin. *Clean-Soil Air Water*. **2014**, *42*, 51–55. [[CrossRef](#)]
28. Jantarat, C.; Sirathanarun, P.; Ratanapongsai, S.; Watcharakan, P.; Sunyapong, S.; Wadu, A. Curcumin-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex preparation methods: Effect of common solvent evaporation, freeze drying, and pH shift on solubility and stability of curcumin. *Trop. J. Pharm. Res.* **2014**, *13*, 1215. [[CrossRef](#)]
29. Kumar, N.S.; Suguna, M.; Subbaiah, M.V.; Reddy, A.S.; Kumar, N.P.; Krishnaiah, A. Adsorption of phenolic compounds from aqueous solutions onto chitosan-coated perlite beads as biosorbent. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2010**, *49*, 9238–9247. [[CrossRef](#)]



Contents lists available at ScienceDirect

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/babStudy of the antioxidant and antidiabetic activity *in vitro* of free and encapsulated phenolic compounds of olive pomaceN'nabinty Sylla^{a,*}, Abdelhakim Bouyahya^b, Douae Taha^c, Nadia Dakka^b, Hakima Elhajji^a^a Laboratory of Materials, Nanotechnologies and Environment, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Mohamed V University in Rabat, Morocco^b Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Morocco^c Laboratory of Spectroscopy, Molecular Modeling, Materials, Nanomaterials, Water and Environment, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Mohamed V University in Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Keywords:

Olive pomace
Encapsulated phenolic
Unencapsulated phenolic
Antioxidant activity
Antidiabetic activity

ABSTRACT

We studied the antioxidant and antidiabetic activity of the encapsulated and unencapsulated phenolic compounds of olive pomace. First, we determined the TPC and TFC of all the samples. We noted 49.40 ± 1.46 mg EGA/g of OP start GG, 29.91 ± 2.32 mg EGA/g of lyoph Tyr/Aconv, 26.73 ± 0.84 mg EGA/g of lyoph Tyr/Aμwave and 7.98 ± 2.49 mg EGA/g of lyoph PP/Aμwave, as for the content of TFC we noted very low content, 2.62 ± 0.85 mg EQ/g of OP start GG, 0.77 ± 0.06 mg EQ/g of lyoph Tyr/Aconv, 0.46 ± 0.31 mg EQ/g of lyoph Tyr/Aμwave and 0.87 ± 0.19 mg EQ/g of lyoph PP/Aμwave. The TAC of all the samples was determined by DPPH and ABTS methods, trolox served as positive control. With the DPPH, IC₅₀ value was noted in the case of the Tyr/Aconv and Tyr/Aμwave. On the other hand, for start GG and PP/Aμwave, we note respectively 200 ± 0.15 μg/mL and 179.84 ± 0.29 μg/mL, the trolox 106.29 ± 2.46 μg/mL lower than that of the start GG and PP/Aμwave. With the ABTS, we note respectively for Tyr/Aconv and Tyr/Aμwave, 180 ± 0.83 μg/mL and 176.56 ± 0.23 μg/mL, start GG and PP/Aμwave as well as the trolox the IC₅₀ are respectively 37.37 ± 2.21 μg/mL, 61.81 ± 0.08 μg/mL and 56.09 ± 0.81 μg/mL. The antidiabetic activity was studied by inhibition of the enzyme α-amylase, acarbose was used as standard, the IC₅₀ of the start GG, PP/Aμwave are respectively 100.19 ± 3.50 μg/mL and 72.28 ± 0.16 μg/mL, Tyr/Aconv 400 ± 0.40 μg/mL, Tyr/Aμwave 559.57 ± 1.82 μg/mL exert a less interesting inhibitory effect compared to the other samples. We note in the case of Ac 116.25 ± 2.04 μg/mL. This work highlights the advantages of the encapsulation process, and promotes olive pomace as a potential source of antidiabetic compounds.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic issue at first recognized by lost glucose homeostasis, because of the disturbances of carbohydrate, fat and protein digestion, coming from imperfections in the generation, the emission and the insulin activity (Pari and Saravanan, 2004). DM is generally known to be of the two types, based on insulin dependence (i. e., type I and type II diabetes). Indeed, type I diabetes is also known as immature diabetes which depend on insulin and affects 5% of diabetic population and, the type II diabetes known to be non-insulin dependent and generally affects people who are above 40 age. This can bring about in long-term damage for organs, such as, kidneys, liver, eyes, nerves, heart and veins. The malfunction in some of these organs can lead to death (Huang et al., 2005). It was estimated that about 200 million

people worldwide suffered from DM in 2010, and expected to reach 300 million by 2025 (Amos et al., 1997). The common strategy for treatment focuses mainly on regulating and decreasing blood sugar to fall within the normal level. The main mechanisms in both traditional and western medicines involve decrease blood sugar through stimulating pancreatic β-cells by: inhibition the hormones elevating blood sugar; increasing the affinity, and sensitivity of insulin receptor; reduction glycogen release; enhancing glucose utilization within many tissues and organs; elimination free radicals, enhancing the resistance lipid peroxidation, correction of the lipid and protein metabolic disorders and improving human blood circulation (Mankil et al., 2006).

The alpha-glucosidase inhibitors "starch blockers" inhibit certain enzymes responsible for the breakdown of carbohydrates in the small intestine. They act mainly by decreasing the rate of carbohydrate

* Corresponding author.

E-mail address: nabinty62@yahoo.fr (N. Sylla).<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102126>

Received 18 June 2021; Received in revised form 26 July 2021; Accepted 5 August 2021

Available online 9 August 2021

1878-8181/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

absorption in the body. Moreover, acarbose, an important example in this class, reversibly inhibits both pancreatic α -amylase and α -glucosidase enzymes by binding to the carbohydrate-binding region and interfering with their hydrolysis into mono-saccharides. This results in a slower absorption together with a reduction in postprandial blood-sugar levels (DeFronzo, 1999; Lebovitz, 1997).

Since centuries, many plants considered a fundamental source of potent anti-diabetic drugs. Although, synthetic oral hypoglycemics together with insulin are the main route for controlling diabetes. However, they exhibited prominent side effects and failed to reverse the course of its complications. This drove for finding alternatives, mainly from plant kingdom that are of less severe or even no side effects (Uppendra et al., 2010).

Broadly distributed in the plant kingdom and abundant in our diet, phenols are today among the most discussed categories of natural antioxidants (Boskou, 2006). They include one or more hydroxyl groups (polar part) attached directly to an aromatic ring (nonpolar part) and are often found in plants as esters or glycosides, rather than as free molecules. This stereochemistry distinguishes them according to their polarity variance (Galanakis et al., 2006). Recent epidemiological studies have shown the inverse relation between risk of cancer, cardiovascular diseases, diabetes, several age-related chronic diseases, and intake of diet rich in phenols and antioxidants (Yang et al., 2008; Karadag et al., 2009; Ilyasoglu et al., 2011). It is now shown, thanks to numerous epidemiological studies, that the incidence of type 2 diabetes is reduced with the Mediterranean diet, and more particularly with the consumption of olive oil (Martínez-González et al., 2008; Salas-Salvadó et al., 2011; Koloverou et al., 2014; Salas-Salvadó et al., 2014), thanks to its richness in phenolic compounds. Phenolic compounds represent an important class of natural antioxidants. The term "phenolic compound" includes a large number of secondary plant metabolites that differ in chemical structure and reactivity, ranging from simple compounds to highly polymerized compounds (El Riachy et al., 2011). During the production of olive oil various wastes are generated (olive-oil-mill wastewater (OMWW), olive pomace, storage by-products and filter cake), which could be an alternative source of these compounds (Frankel et al., 2013). Oleuropein, a non-toxic secoiridoid, is the major component of olive polyphenols (Brenes et al., 2001; Bonoli et al., 2004; Morelló et al., 2004; Damak et al., 2008), and it is responsible for the bitter taste and pungent aroma of olive oil (Afanah et al., 2015). Oleuropein, as well as other phenolic compounds such as hydroxytyrosol and tyrosol, have been extensively studied for their beneficial effects in a variety of ailments such as cancer, blood pressure and heart problems, and an array of viral and bacterial diseases (Tuck and Hayball, 2002). Oleuropein degrades gradually into elenolic acid and hydroxytyrosol, as olives mature, but the majority of hydroxytyrosol quantity in OMWW is produced during the extraction of olive oil. That is why some researchers do not detect oleuropein in OMWW (Tsagaraki et al., 2007).

Olive pomace considered as a rich source of phenolic compounds with a wide array of biological activities. Application of polyphenols has recently attracted great interest in the functional foods, nutraceutical, and pharmaceutical industries due to their potential health benefits to humans. However, the effectiveness of polyphenols depends on preserving the stability, bioactivity, and bioavailability of the active ingredients (Fang and Bhandari, 2010). In fact, three aspects of antioxidant attributes have been investigated in the olive pomace: antioxidant capacity (Ranalli and Lucera, 2003; Shahidi and Nacik, 2004), anti-radical, and radical scavenging activities (Nacik and Shahidi, 2004; Lesage-Meessen et al., 2001; Amro et al., 2002). According to some studies, the hydroxytyrosol (Fernández-Bolaños et al., 2002), oleuropein (Mulinacci et al., 2001), tyrosol (Allouche et al., 2004), caffeic acid (Lesage-Meessen et al., 2001), p-coumaric acid, vanillic acid (Bianco et al., 2003), verbascoside, elenolic acid (Mulinacci et al., 2001), catechol (Fiorentino et al., 2003) and rutin (Romero et al., 2002) are the main phenolic compounds in olive pomace. Hydroxytyrosol is

the most famous olive pomace phenol due to its beneficial properties; for example, it exerts advanced antiradical properties compared to vitamins E and C (Fernández-Bolaños et al., 2002). The antioxidant ability of hydroxytyrosol has been proven in the plasma and liver of rats (Visioli et al., 2001), while its cardio-protective effect has been successfully assayed on human cells (Leger et al., 2000). The beneficial effect of hydroxytyrosol as an effective hypoglycemic and antioxidant agent in alleviating oxidative stress and free radicals as well as in enhancing enzymatic defenses in diabetic rats has also been demonstrated (Allouche et al., 2004). Tyrosol; 2-(4-hydroxyphenyl)-ethanol, is one of the major phenolic compound contained in olive oil and has been reported to possess various physiological activities by its potent antioxidant activity (Giovannini et al., 1999). Tyrosol showed antigenotoxic activity and prevents apoptosis in keratinocyte (Salucci et al., 2016). It also prevents the endothelial dysfunction by decreasing the expression of cell adhesion molecule (Carluccio et al., 2003) and inhibits platelet-induced aggregation (Petroni et al., 1995). The tyrosol was reported to ameliorate hyperglycemia in diabetic rats (Chandramohan et al., 2015). However, little data exists on the molecular mechanisms involved in the beneficial effects of tyrosol on diabetes.

polyphenols are able to bind to proteins or polysaccharides, either by the effect of polysaccharides on the formation of polyphenol-protein complexes, or by the effect of protein-polysaccharide complexes on polyphenols by bonds either non-covalent or either covalent (Ozawa et al., 1987; Luck et al., 1994; De Freitas et al., 2003; Mateus et al., 2004a; Carvalho et al., 2006a and b; Soares et al., 2009; Gonçalves et al., 2011a; Soares et al., 2012; Liang et al., 2013; Wang et al., 2007; Bindon and Smith, 2013; Zhao et al., 2013). Polysaccharides are able to compete with proteins to bind to polyphenols. Liang et al. (2013) confirmed that gum arabic or sucrose are able to inhibit lysozyme-procyanidin B3 complexes.

Moreover, the interactions between polyphenols and proteins on the bioavailability of polyphenols are contradictory, for example black tea, the addition of 10% of skimmed milk seems to decrease the bioavailability of flavan-3-ols following their complexation with casein (Lorenz et al., 2007). In contrast, the addition of 50% milk to green tea appears to have no effect on the bio-accessibility of flavan-3-ols (Green et al., 2007), suggesting that the stability and solubility of flavan-3-ols in the intestine are not influenced by milk proteins. The loss of biological activity of polyphenols therefore does not seem to be linked to polyphenol-protein interactions, but rather to the instability of flavan-3-ols at high pH (greater than 5) in milk (Neilson et al., 2007). As for polysaccharides, numerous studies have shown that polysaccharide-polyphenol complexes have a positive effect in the colon (Grant et al., 2020; Kardum and Glibetic, 2018; Le Bourvellec et al., 2005; Monfoulet et al., 2020; Phan et al., 2020; Tarko and Duda-Chodak, 2020). Polyphenols can be released from their complexes by the action of enzymes or microorganisms in the intestinal tract and biotransformed by microbial metabolism in the colon (i.e. from the nonabsorbable form to the absorbed form). It has also been reported that these complexes can promote the growth of beneficial microflora and inhibit the growth of pathogenic microbes (Dobson et al., 2019). The bioavailability of OHTyr, however, has been shown to change significantly depending on the matrix in which the phenolic compounds are administered, the most effective matrix being the olive oil (Visioli et al., 2003). Around 98% of Tyr and OHTyr are present in plasma and urine in conjugated forms such as glucuronides or sulfates. This fact indicates the existence of an extensive first-pass intestinal/hepatic metabolism of the ingested primary forms (Miró-Casas et al., 2003; Rubió et al., 2012).

Some nonvolatile phenolic compounds stimulate the tasting receptors such as bitterness perception, pungency, astringency, and metallic attributes (Boskou, 2012). So, encapsulation is a technique to preserve the stability, but also to camouflage the undesirable organoleptic characteristics of phenolic compounds, by using a wall material guaranteeing their protection against the unfavorable conditions of the surrounding environment (Betz and Kulczik, 2011; Fung et al., 2011).

Table 1
UPLC-DAD-MS analysis conditions.

Eluants	Gradient	Times (min)	Debit (mL/min)	T ° C column	Injection volume (μL)
A: 0.1% HCO ₂ H dans H ₂ O	99-80	0-10			
B: MeCN	80-70	10-12,5	0,3	35	5
	70-0	12,5-13,5			

This technique improves the bioavailability of phenolic compounds but also their antioxidant power.

Therefore, the objective of this study is first to compare the antioxidant activity as well as the inhibitory effect of the α -amylase enzyme of the encapsulated tyrosol with those of encapsulated phenolic compounds from olive pomace. Secondly, to compare the antioxidant activity and the inhibitory effect of α -amylase enzyme of unencapsulated phenolic compounds from olive pomace with those of the encapsulated phenolic compounds.

The Antioxidants Laboratory at the University of Avignon, where a study investigating the formulation of olive pomace phenolic compounds within the potato starch matrix has realized, provided the samples studied in this article. This study first consisted of encapsulating a model phenol (tyrosol), using two types of heating (conventional heating and microwave heating) to gelatinize the starch before adding the tyrosol. The encapsulation technique used is lyophilization. Subsequently, the tyrosol encapsulation protocol was optimized and then applied to the phenolic compounds of olive pomace. This part, carried out in the antioxidants laboratory of the University of Avignon, will be the subject of an article independently of this article on the antioxidant and antidiabetic activity *in vivo* of the products resulting from the study of the antioxidants laboratory of the University of Avignon.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2.1.1. Extract preparation

Tyrosol lyophilisates were obtained by encapsulating commercial tyrosol (Sigma Aldrich) in the gelatinized potato matrix by two types of heating (conventional heating and microwave heating) by the freeze-drying technique, which will be designated as follows: Tyr/A conv and Tyr/A microwave.

The lyophilisates of the phenolic compounds were obtained by encapsulation of the phenolic compounds of commercial olive pomace (GRAPSUD) in the gelatinized potato starch matrix only in the microwave, by the technique of kneading and freeze-drying designated as follows: PP/A microwave).

The unencapsulated phenolic compounds also come from freeze-dried olive pomace from GRAPSUD (Photo 1), and it is designated as follows: Start GG.

Table 2
 α -amylase inhibitory and antioxidant activity of samples (IC₅₀ μg/mL).

Samples and standard	Enzyme inhibitory	Antioxidant activity	
	α -amylase	DPPH assay	ABTS assay
Start GG	100.19 ± 3.50	200 ± 0.15	37.37 ± 2.21
Tyr/A conv	400 ± 0.40		180 ± 0.83
Tyr/A microwave	559.57 ± 1.82		176.56 ± 0.23
PP/A microwave	72.28 ± 0.16	179.84 ± 0.29	61.81 ± 0.08
Acarbose	116.25 ± 2.04		
Trolox		106.29 ± 2.46	56.09 ± 0.84

Start GG: olive Pomace (GRAPSUD), Tyr/A conv: Tyrosol lyophilisate under conventional heating, Tyr/A microwave: Tyrosol lyophilisate under microwave heating, PP/A microwave: lyophilisate of encapsulated olive pomace polyphenols.

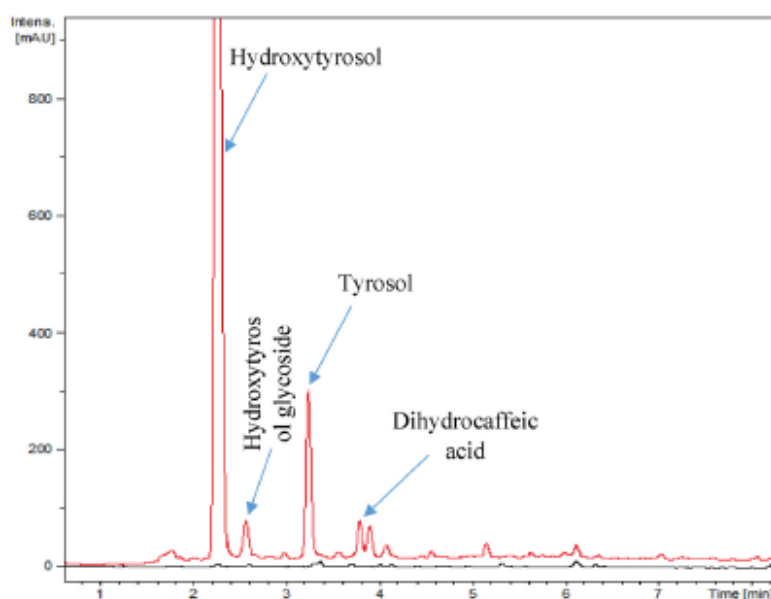


Fig. 1. Chromatographic profile of the start GG sample, at 280 nm (red) and 330 nm (black). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

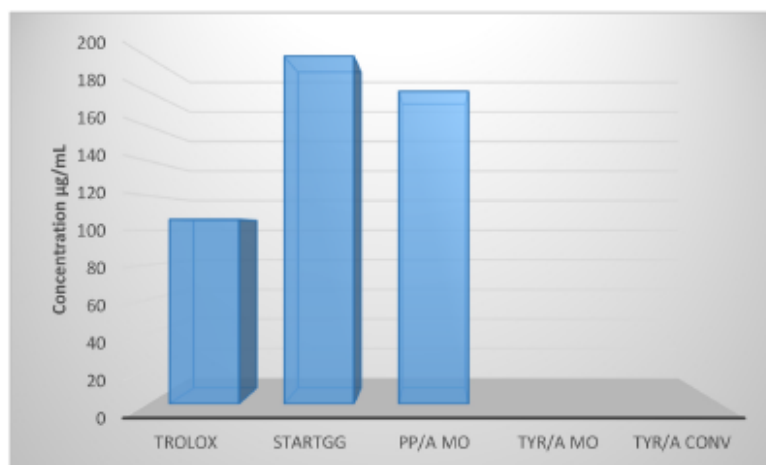


Fig. 2. Comparison of the antioxidant activity of the samples with that of trolox (DPPH test).

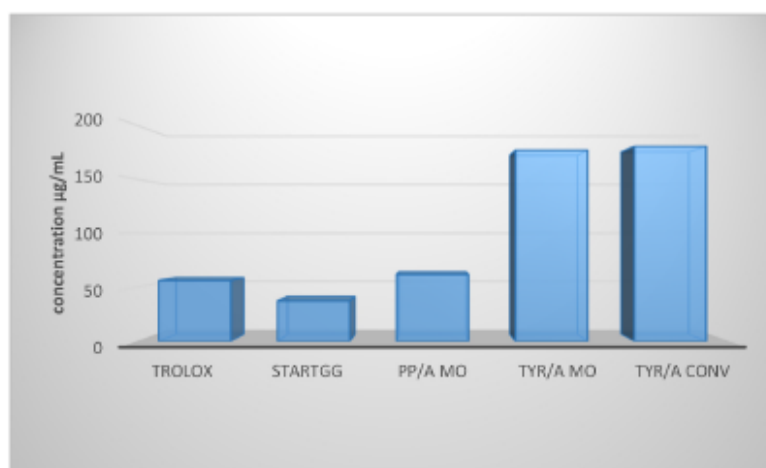


Fig. 3. Comparison of the antioxidant activity of the samples with that of trolox (DPPH test).

2.2. Preparation of sample

The lyophilisates of Tyr/A conv, Tyr/A microwave as well as of PP/A microwave were prepared in distilled water, 30 mg of each lyophilisate introduced into a hemolysis tube, with 15 mL of distilled water (i.e. a stock concentration of 2 mg/mL), then the solution the tubes are heated in a water bath (45 °C) for 15 min, in order to completely dissolve the starch and thus the encapsulated phenolic compounds are released.

The olive pomace powder was prepared in a mixture of solvent (water/ethanol). 30 mg of pomace powder is introduced into a test tube with water and ethanol (30/20 v/v), and then the solution is heated in a water bath (37 °C) for 15 min.

2.3. Total phenolic content

The quantification of the phenolic compound in different lyophilisate (lyophilisat of Tyr/A conv and Tyr/A microwave; lyophilisate PP/A microwave) as well as starting olive pomace (start OG) was performed according to the method of (Lister and Wilson, 2001) with slight

modifications. The appropriate 0.5 mL of sample (30 mg/mL) was transferred to Folin-Ciocalteu reagent (2 mL) diluted 10 times in distilled water. Then, the solution was vigorously mixed with vortex and neutralized with carbonate of sodium (Na_2CO_3) 4 mL, 7.5%. After 30 min of incubation in the bain-marie, the absorbance was recorded at 765 nm against blank sample, which contains water. The phenolic content was determined as milligram of Gallic acid equivalents (GAE) per gram lyophilisate.

2.4. Total flavonoid content

For the determination of the total flavonoids only the lyophilisates of PP/A microwave as well as the pomace (start OG) were quantified because in the case of the lyophilisates of Tyr/A it was not necessary, knowing that there is only the tyrosol, which is not a flavonoid.

The total flavonoids in the lyophilisate of PP/A microwave and the starting olive pomace (start OG) were calculated according to aluminum chloride (AlCl_3) method (Dewanto et al., 2002). Briefly, the lyophilisate solutions and the starting olive pomace solution 1 mL (30 mg/mL) were

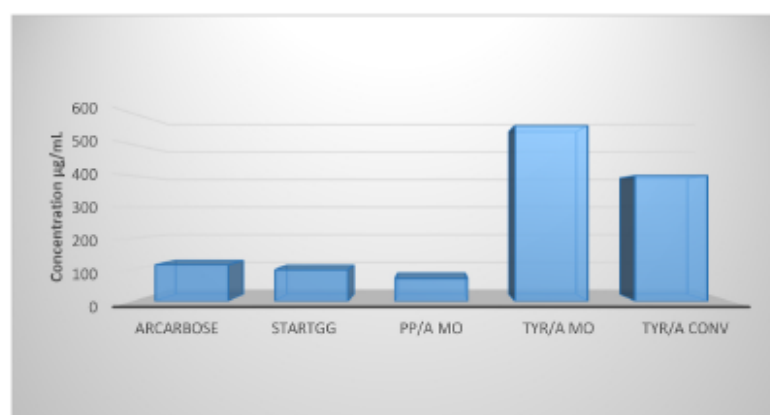


Fig. 4. Comparison of the antidiabetic activity of the samples with that of acarbose (alpha amylase inhibition).

mixed with 0.2 mL of AlCl_3 (10%), then addition of 0.2 mL of sodium acetate solution (5%) and distilled water (5.6 mL). After 30 min of incubation in the dark at r.t., the absorbance was recorded at 415 nm, against a blank using a UV-visible spectrophotometer. Flavonoids were totally determined as milligram equivalents of quercetin (QE) per gram of lyophilizate.

2.5. Identification of phenolic compounds in start GG and PP/A microwave samples by UPLC-DAD-MS method

Ultra-performance liquid chromatographic analysis (UPLC) was carried out at UMR SQPOV Avignon University - INRAE. System (Waters Corp., Milford, MA, USA) simultaneously connected this ACQUITY UPLC® to a 190–800 nm diode array detector (UPLC DAD, Waters, Milford, MA, USA) and to a spectrometer. mass Bruker Daltonics HCT Ultra Ion Trap MS equipped with an electrospray type ion source (UPLC DAD/ESI-MSn). An ACQUITY UPLC® BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm, i.d. 1.7 µm; Waters Corp., Milford, MA, USA) is used in the separation of phenolic compounds. The ion trap operates in Ultra Scan mode from m/z 100 to 800. The ICC target has been set at 100,000 with a maximum accumulation time of 50 ms. Nitrogen (99.99%) was used as the desolvation gas. Ionization was performed using an ESI source in negative mode. The ionization source parameters were set as follows: dry temperature 365 °C, nebulizer pressure 50 psi, dry gas flow rate 9 L min⁻¹, capillary voltage −2 kV. Chromatographic peaks were identified using commercial standards (standards) previously injected. The quantification was carried out by integration of the peaks in the DAD chromatogram. In the absence of an authentic standard, the concentration of the compound is expressed in standard equivalent. The injection conditions are summarized in Table 1.

2.6. Antioxidant activity assays

For evaluating the antioxidant activity of different sample (Tyr/A conv and Tyr/A microwave, start GG, PP/A microwave), two antioxidants complementarily tests were used DPPH[•] and ABTS assays.

The DPPH[•] scavenging effects of samples were determined according to (Huang et al., 2011). The N-centered DPPH[•] is generally used for the estimation of the radical scavenging capacity. For this aim, an aliquot (0.5 mL, 0.2 mM) of DPPH[•] was added to the sample solution (2.5 mL) (2000–40 µg/mL) and incubated for 30 min in the dark r.t. Finally, the absorbance of the sample was recorded at 517 nm. Blank sample contains ethanol, which used as solvent for DPPH radicals and reaction medium.

The ABTS^{•+} scavenging method is carried out according to the

method described by (Tuberosoa et al., 2013). The ABTS (2 mM) solution mixed with potassium persulfate solution ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$; 70 mM) oxidizing agent resulted in ABTS cation radicals ($\text{ABTS}^{•+}$). The initial absorbance (0.70). Finally, 0.2 mL of sample at various concentrations (2000–40 µg/mL) was mixed with 2 mL of $\text{ABTS}^{•+}$, and the remaining absorbance was spectrophotometrically recorded at 734 nm. Blank sample contains buffer solution.

All radicals (DPPH[•] and $\text{ABTS}^{•+}$) scavenging effects (RSC) were calculated as given follows: % RSC = $(1 - A_s/A_c) \times 100$, where A_c and A_s are the absorbances of the control and samples, respectively. The antioxidant activities expressed as the concentration of different lyophilizate (Tyr/A conv, Tyr/A microwave; start GG and PP/A microwave) that provides 50% inhibition (IC_{50}). This value estimated by modeling the inhibition degrees against the sample concentrations. Trolox has been used as positive controls. The test carried out in triplicate and IC_{50} values were reported as means ± SD.

2.7. Enzyme inhibition studies

2.7.1. α -Amylase activity

The inhibitory effects of the sample (Tyr/A conv, Tyr/A microwave, start GG and PP/A microwave) on α -amylase were measured according to (Xiao et al., 2006; Yoshikawa and Maruo, 1960) methods with slight modifications.

The substrate solution was prepared as follows: soluble starch (400 mg) was dissolved in 25 mL of NaOH (0.4 M) and heated for 5 min at 100 °C. After cooling, the solution adjusted to pH 7 with HCl (1M), and then the volume of the substrate solution is adjusted to 100 mL. 100 µL of 2U/mL α -amylase solution (20 mM acetate buffer with 6.5 mM NaCl, pH 6.9) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with 250 µL of samples at concentrations variables, followed by the addition of the same volume of the starch solution (600 µL, 0.2%), and incubated at 37 °C for 10 min. The end of the reaction was carried out by adding 250 µL of HCl (0.1M), followed by the addition of 100 µL of iodine reagent (1 mM). Absorbance was measured at 650 nm. Acarbose was used as the positive control. Results were expressed as percent inhibition and calculated using the formula next: $I (\%) = \{1 - (A_2 - A_1)/(A_4 - A_3)\} \times 100$

A1: absorbance of the sample (extract + substrate + enzyme); A2: absorbance of the sample blank (extract + substrate + buffer); A3: absorbance of the control (substrate + enzyme); A4: absorbance of the blank of the blank (substrate + buffer).

3. Statistical analysis

All tests were performed in triplicate and results were expressed as

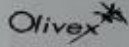
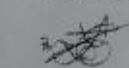
Document : Fiche de RESULTAT D'ANALYSE / ANALYSIS RESULT SHEET		
GROUPE GRAPHSUD Produit / Product: Extrait d'Olive titré en polyphénols / Olive Extract with a guaranteed content in polyphenols FT N° : 38 298 PHO NU N° Lot / Batch n° : L1R18 278 PHO		
Date d'analyse / Analysis date :	26/11/2018	
Date de fabrication / Manufacturing date :	05/10/2018	
Date d'expiration / Expiry date :	26/11/2020	
	RESULTATS / RESULTS	SPECIFICATIONS
Hydroxytyrosol (en équivalent Tyrosol) HPLC (%)	6,6	≥ 6,0
Tyrosol (en équivalent Tyrosol) HPLC (%)	0,9	≥ 0,8
Densité - Density	0,46	> 0,40
Humidité (%) - Moisture (%)	4,8	< 7,0
Teneur en solvant résiduel (Ethanol) (%)	0,045	< 0,1
Microbiologie - Microbiology :		
Flore totale (uflc/g) - Total viable aerobic organisms (cfu/g)	0	< 1 000
Levures et moisissures (uflc/g) - Yeasts and moulds (cfu/g)	0	< 100
Coliformes totaux - Total coliforms	Absence - None	Absence - None
Escherichia Coli * - Escherichia Coli *	Absence - None	Absence - None
Salmonelle * - Salmonella *	Absence - None	Absence - None
Métaux lourds (ppm) - Heavy metals (ppm)		
Plomb - Lead	0,051	< 3,00
Arsenic - Arsenic	< 0,01	< 2,00
Mercur - Mercury	< 0,005	< 0,10
Cadmium - Cadmium	0,061	< 1,00
HAP* - PAH*	Conforme - Conform	Conforme à la réglementation CE Conform to the EC regulation
Pesticides (ppm) - Pesticides (ppm)	Conforme - Conform	Conforme à la Pharmacopée Européenne Conform to the European Pharmacopoeia
*Dose 1 fois par an sur un lot moyen - *Checked once a year on an average batch		
Commentaires : Comments:		
Produit conforme aux spécifications Product conform to specifications		
Analysé par - Analysed by: Sandra DEBRAY  Contrôle Qualité - Quality Control	Approuvé par - Approved by: Nelly URBAN  Responsable Assurance Qualité - Quality Manager	

Photo 1. Technical sheet of olive pomace used in this study.

mean $\pm$ standard deviations. A difference in the mean values of ($p < 0.05$) was considered statistically significant. IC₅₀ was calculated using nonlinear regression analysis (GRAPHPAD PRISM 7).

4. Results and discussion

Phenolic compounds are renowned for their antioxidant property, also for their property of metal chelators as well as radical scavengers

(Benabdallah et al., 2016).

4.1. Chemical composition

Chromatographic analysis of the start GO and PP/A microwave samples by UPLC-DAD-MS identified the major phenolic compounds present in both samples: hydroxytyrosol, hydroxytyrosol glucoside, tyrosol and dihydrocaffeic acid (Fig. 1).

4.2. Phenol total content

The phenolic content of the start GG, Tyr/A conv, Tyr/A microwave and PP/A microwave samples obtained from the gallic acid calibration curve ($y = 0.010x + 0.002$, $R^2 = 0.99$) expressed in mg GAE/g lyophilized, are respectively: 49.40 ± 1.46 ; 29.91 ± 2.32 ; 26.73 ± 0.84 ; 7.96 ± 2.49 . As for the flavonoid content of our start GG and PP/A samples obtained from the quercetin calibration curve ($y = 0.022x + 0.006$; $R^2 = 0.99$), it remains very low, this can be explained by the fact that our samples are not rich in flavonoids, which corroborates the chromatographic analyses (Fig. 1), because the majority phenolic compounds are phenolic alcohols. Thus, the flavonoid content of the samples: start GG and of PP/A microwave expressed in mg QE/g lyophilized, are respectively: 2.62 ± 0.85 mg GAE/g GG; 0.87 ± 0.19 mg GAE/g lyophilized.

4.3. Antioxidant activities assays

The evaluation of the antioxidant capacity of our various samples was carried out by so-called indirect methods based on electron transfer (DPPH and ABTS), the IC₅₀ of which were then determined compared to that of Trolox. All our samples revealed interesting antioxidant properties. A low IC₅₀ value indicates a high antioxidant activity. The results are shown in Table 1 and the IC₅₀ was calculated to compare these results.

Indeed, in case of DPPH only the samples start GG and PP/A microwave revealed activity, IC₅₀ = 141.49 ± 0.59 µg/mL for start GG and IC₅₀ = 133.95 ± 0.27 for PP/A microwave. We did not observe any activity in the case of the sample's Tyr/A conv, Tyr/A microwave. The Trolox has IC₅₀ = 88.14 ± 1.33 µg/mL lower than the sample start GG and PP/A microwave. The effectiveness of the antioxidant activity of the samples (start GG and PP/A microwave) can be explained by the synergy between the phenolic compounds (hydroxytyrosol, hydroxytyrosol glucoside, tyrosol and dihydrocaffeic acid) present in the two samples (Table 2).

The ABTS^{•+} scavenging can be applicable for plant extracts including both hydrophilic and lipophilic compounds. In this assay, ABTS^{•+} has a maximum wavelength at 734 nm. All our samples have effectively reduced the ABTS^{•+} radical, we note respectively the IC₅₀ expressed in µg/mL of the various start GG samples, Tyr/A conv, Tyr/A microwave and PP/A microwave as well as that of the Trolox: IC₅₀ = 16.05 ± 2.31 ; IC₅₀ = 180 ± 0.83 ; IC₅₀ = 176.56 ± 0.23 ; IC₅₀ = 26.18 ± 0.44 ; IC₅₀ = 75.15 ± 1.10 (Table 2).

By comparing the IC₅₀ of the Tyrosol samples to that of the PP/A microwave sample, with both DPPH and ABTS (Figs. 2 and 3), PP/A microwave presents the best IC₅₀, and the explanation of the synergy of the molecules present in the sample PP/A microwave is also valid in this context as well.

Between the sample start GG and PP/A microwave there is not such a big difference between their IC₅₀, we can say that the encapsulation has well preserved the molecules, so that their antioxidant activity before encapsulation is almost equal to that obtained after encapsulation.

4.4. In vitro study of α-amylase inhibitory activity

α-Amylase and α-glycosidase exist on the cells lining the small intestine and hydrolyze polysaccharides to monosaccharide units for absorption through the intestine. For the body weight and control of the blood glucose level, specific inhibitors can inhibit the activities of both digestive enzymes (Kocak et al., 2016). However, in this study, we only experienced the inhibitory effect of our samples only on the α-Amylase enzyme. Another study will be dedicated to the inhibitory effect of our samples on the α-glycosidase enzyme.

The PP/A microwave sample shows the best inhibitory capacity of the α-Amylase enzyme (IC₅₀ = 72.28 ± 1.57 µg/mL) followed the start GG sample (IC₅₀ = 100.19 ± 3.50 µg/mL). His two samples have a more interesting activity compared to the acarbose (Fig. 4), which was used as

a standard. Indeed, the latter showed an inhibitory effect of (IC₅₀ = 116.25 ± 2.04 µg/mL), on the other hand it is more interesting than those of the tyrosol samples (Tyr/A conv IC₅₀ = 400 ± 0.40 µg/mL; Tyr/A microwave IC₅₀ = 559.57 ± 1.88 µg/mL) (Table 2).

This activity can be explained by the synergy of the phenolic compounds present in the samples start GG and PP/A microwave. In addition to that for the sample PP/A microwave we can add the encapsulation which to participate in the protection of the phenolic compounds and to the improvement of their antioxidant activity.

5. Conclusion

The *in vitro* study of encapsulated and free polyphenols from olive waste, such as olive pomace, as an alternative to the treatment of diabetes, has been shown to be effective. Indeed, we observed interesting antioxidant and anti-diabetic activity with both encapsulated polyphenols and free polyphenols, although the encapsulated polyphenols were more effective than the free polyphenols. In addition, the encapsulation of polyphenols (PP/A µo) compared to the encapsulation of tyrosol (Tyr/A conv; Tyr/A µo) showed a better antioxidant activity and a better inhibitory effect of the α-amylase enzyme, we explained that by the phenomenon of synergy of the phenolic compounds because the tyrosol certainly exerts an interesting antioxidant activity and an effective inhibitory effect, this remains minimal compared to the activities of a set of phenolic compounds. In sum, the results obtained in this study show that olive waste, in this case olive pomace, is a rich source of phenolic compounds, which can be valued by encapsulation in order to protect their antioxidant activity as well as the biological activity, in this case the inhibitory effect of the α-amylase enzyme. Although its results are encouraging, all applications (nutraceuticals or others) require numerous investigations to validate the use of its phenolic compounds from olive waste.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Afaneh, L., Yateem, H., Al-Ramawi, F., 2015. Effect of olive leaves drying on the content of oleuropein. *Am. J. Anal. Chem.* 6 (3), 7.
- Allouche, N., Fki, L., Sayadi, S., 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.* 52, 267–273.
- Amos, A.F., McCarthy, D.J., Zimmet, P., 1997. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet. Med.* 14, 57–68.
- Amro, B., Aburaj, T., Al-Khalil, S., 2002. Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia* 73, 456–461.
- Benabdallah, A., Rahmouni, C., Boumendjel, M., Aissi, O., Messaoud, C., 2016. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild Mentha species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 760–766.
- Betz, M., Kulozik, U., 2011. Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. *Int. Dairy J.* 21, 703–710.
- Bianco, A., Buiarelli, F., Cartoni, G., Cocchi, F., Jasionowska, R., Margherita, P., 2003. Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetable waters. Part I. *J. Sep. Sci.* 26, 409–416, 2003.
- Bindon, K.A., Smith, P.A., 2013. Comparison of the affinity and selectivity of insoluble fibres and commercial proteins for wine proanthocyanidins. *Food Chem.* 136 (2), 917–928.
- Bonoli, M., Bendini, A., Cerretani, L., Lercker, G., Toschi, T.G., 2004. Qualitative and semi-quantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7026–7032.
- Boskou, D., 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 505–512.
- Boskou, D., 2012. Olive Oil—Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, first ed. InTech, Croatia.
- Le Bourvellec, C., Bouchet, B., Renard, C.M.G.C., 2005. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: study on model polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1725 (1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.004>.

- Brenes, M., García, A., García, P., Garrido, A., 2001. Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5609–5614.
- Carluccio, M.A., Siculella, L., Ancora, M.A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., D'Amato, A., De Caterina, R., 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 622–629.
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Planet, I., Dufour, E., De Freitas, V., 2006a. Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* 54 (23), 8936–8944.
- Carvalho, E., Póvoas, M.J., Mateus, N., de Freitas, V., 2006b. Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions. *J. Sci. Food Agric.* 86 (6), 891–896.
- Chandramohan, R., Pari, L., Rathinam, A., Sheikh, B.A., 2015. Tyrosol, a phenolic compound, ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* 229, 44–54.
- Damak, N., Bouaziz, M., Ayadi, M., Sayadi, S., Damak, M., 2008. Effect of the maturation process on the phenolic fractions, fatty acids, and antioxidant activity of the Chetoui olive fruit cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1560–1566.
- DeFronzo, R.A., 1999. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 131, 281–303.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3010–3014.
- Dobson, C.C., Mottawee, W., Rodrigue, A., Buzati Pereira, B.L., Hammami, R., Power, K.A., Bordenave, N., 2019. Impact of molecular interactions with phenolic compounds on food polysaccharides functionality. In: Isabel, L.B., Ferreira, C.F.R. (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 90. Elsevier Inc, Burlington, VT, pp. 135–181. <https://doi.org/10.1016/b.saf.2019.02.010>.
- Fang, Z., Rhandaria, B., 2010. Encapsulation of polyphenols. *Trends Food Sci. Technol.* 21 (10), 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.tfs.2010.08.003>.
- Fernandez-Bolanos, J., Rodriguez, G., Rodriguez, R., Heredia, A., Guillen, R., Jimenez, A., 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two phase olive oil processing or "Alperujo". *J. Agric. Food Chem.* 50, 6804–6811.
- Fernandez-Bolanos, J., Heredia, A., Rodriguez, G., Rodriguez, R., Guillen, R., Jimenez, A., 2002. Method for Obtaining Purified Hydroxytyrosol from Products and By-Products Derived from the Olive Tree. World Intellectual Property Organization. WO/2002/064537.
- Florentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parrella, A.E., Temussi, F., 2003. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular weight phenol components. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1005–1009.
- Frankel, E., Bakhouche, A., Lozano-Sanchez, J., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2013. Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5179–5188.
- De Freitas, V., Carvalho, E., Mateus, N., 2003. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem.* 81 (4), 503–509.
- Fung, W.Y., Yuen, K.H., Liong, M.T., 2011. Agrowaste-based nanofibers as a probiotic encapsulant: fabrication and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 59, 8140–8147.
- Galanakis, C.M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G.A., Gekas, V., 2013. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Int. J. Food Pres.* 16, 382–396.
- Giovannini, C., Straface, E., Modesti, D., Coni, E., Cantafora, A., De Vincenzi, M., Malorni, W., Masella, R., 1999. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 129, 1269–1277.
- Gonçalves, R., Mateus, N., De Freitas, V., 2011. Influence of carbohydrates on the interaction of procyanidin B3 with trypsin. *J. Agric. Food Chem.* 59 (21), 11794–11802.
- Grant, L.J., Mikkelsen, D., Phan, A.D.T., Kang, S., Ouwkerk, D., Klieve, A.V., Williams, B.A., 2020. Purified plant cell walls with adsorbed polyphenols alter porcine faecal bacterial communities during in vitro fermentation. *Food and Function* 11 (1), 834–845. <https://doi.org/10.1039/c9fo02428j>.
- Green, R.J., Murphy, A.S., Schulz, B., Watkins, B.A., Ferruzzi, M.G., 2007. Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (9), 1152–1162.
- Huang, T.H.W., Peng, G., Kota, B.P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D., Li, Y., 2005. Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: activation of PPAR- α and identification of an active component. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 160–169.
- Huang, B., Ke, H., He, J., Ban, X., Zeng, H., Wang, Y., 2011. Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo. *J. Chem. Toxicol.* 49, 185–190.
- Ilyasoglu, H., Ozcelik, B., Van Hoed, V., Verhe, R., 2011. Cultivar characterization of Aegean olive oils with respect to their volatile compounds. *Sci. Horticult.* 129, 279–282.
- Karadag, A., Ozcelik, B., Sener, S., 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods* 2, 41–60.
- Kardum, N., Glibetic, M., 2018. Polyphenols and their interactions with other dietary compounds: implications for human health. In: Toldrà, F. (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 84. Elsevier Inc, New York, pp. 103–144. <https://doi.org/10.1016/b.saf.2017.12.001>.
- Kocak, M.S., Sarikurucu, C., Kocak, S., Uren, M.C., Tepe, B., 2016. Salvia cadmica: phenolic composition and biological activity. *Ind. Crop. Prod.* 85, 204–212.
- Koloverou, E., Epistito, K., Giugliano, D., Panagiotakos, D., 2014. « the effect of mediterranean diet on the development of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 10 prospective studies and 136,846 participants ». *Metab., Clin. Exp.* 67 (7), 909–911.
- Leibovitz, H.E., 1997. Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 26, 539–551.
- Leger, C.L., Kadiri-Hassani, N., Descomps, B., 2000. Decreased superoxide anion production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5061–5067.
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigollet, J.C., Lorquin, J., Delattre, M., 2001. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem.* 75, 501–507.
- Liang, M., Liu, R., Qi, W., Su, R., Yu, Y., Wang, L., He, Z., 2013. Interaction between lysozyme and procyanidin: multilevel structural nature and effect of carbohydrates. *Food Chem.* 138 (2–3), 1596–1603.
- Lister, E., Wilson, P., 2001. Measurement of Total Phenolics and ABTS Assay for Antioxidant Activity (Personal Communication). Crop Research Institute, Lincoln, New Zealand.
- Lorenz, M., Jochmann, N., Krosigk, A. von, Martus, P., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V., 2007. Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *Eur. Heart J.* 28 (2), 219–223.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N.J., Grinamer, H.R., Warminski, E.E., Williamson, M.P., Haslam, E., 1994. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry* 37 (2), 357–371.
- Mankil, J., Moonsoo, P., Hyun, L., Yoon-Ho, K., Eun Seok, K., Sang Ki, K., 2006. Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr. Med. Chem.* 13, 1203–1218.
- Martínez-González, M.A., de la Fuente-Arillaga, C., Nunez-Cordoba, J.M., Bastera-Gortari, F.J., Benza, J.J., Vazquez, Z., Benito, S., Tortosa, A., Bes-Rastrollo, M., 2008. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. *BMJ* 336, 1348–1351.
- Mateus, N., Carvalho, E., Luis, C., de Freitas, V., 2004. Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Anal. Chim. Acta* 513 (1), 135–140.
- Miró-Casas, E., Covas, M.I., Farré, M., Fitó, M., Ortuño, J., Weinbrenner, T., Roset, P., de la Torre, R., 2003. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin. Chem.* 49, 945–952.
- Monfoulet, L.-E., Buffière, C., Istas, G., Dufour, C., Le Bourvellec, C., Mercier, S., Morand, C., 2020. Effects of the apple matrix on the postprandial bioavailability of flavan-3-ols and nutrigenomic response of apple polyphenols in minipigs challenged with a high fat meal. *Food and Function* 6 (11), 5077–5090. <https://doi.org/10.1039/d0fo00346h>.
- Morello, J.R., Romero, M.P., Motilva, M.J., 2004. Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6002–6009.
- Mullinacci, N., Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Giaccherini, C., Vincieri, F.F., 2001. Polyphenolic content in olive oil wastewaters and related olive samples. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3509–3514.
- Naczki, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111.
- Neilson, A.P., Hopf, A.S., Cooper, B.R., Pereira, M.A., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., 2007. Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechins dimers during in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.* 55 (22), 8941–8949.
- Ozawa, T., Lilley, T.H., Haslam, E., 1987. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry* 26 (11), 2937–2942.
- Pari, L., Saravanan, R., 2004. "Antidiabetic effect of diaminol, an herbal drug, on blood glucose, plasma insulin and hepatic enzymes of glucose metabolism in hyperglycaemic rats. *Diabetes Obes. Metabol.* 6, 286–292. <https://doi.org/10.1111/j.1462-8902.2004.0349.x>.
- 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. *Thromb. Res.* 78, 151–160.
- Phan, A.D.T., Williams, B.A., Netzel, G., Mikkelsen, D., D'Arcy, B.R., Gidley, M.J., 2020. Independent fermentation and metabolism of dietary polyphenols associated with a plant cell wall model. *Food and Function* 11 (3), 2218–2230. <https://doi.org/10.1039/c9fo02987g>.
- Ranalli, A., Lucera, L., Contesto, S., 2003. Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil millwastewater. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7636–7641.
- El Riachy, M., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, L., de Castro, M.D.L., 2011. Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 692–707.
- Romero, C., Brenes, M., García, P., Garrido, A., 2002. Hydroxytyrosol 4- α -D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3835–3839.
- Rubio, L., Valls, R.M., Macià, A., Pedret, A., Giral, M., Romero, M.P., de la Torre, R., Covas, M.I., Solà, R., Motilva, M.J., 2012. Impact of olive oil phenolic concentration on human plasma phenolic metabolites. *Food Chem.* 135, 2922–2929.
- Salas-Salvado, J., Bulló, M., Babio, N., Martínez-González, M.A., Ibarrola-Jurado, N., Basora, J., Estruch, R., Covas, M.I., Corella, D., Arós, F., Ruiz-Gutiérrez, V., Ros, E., 2011. « reduction in the incidence of type 2 diabetes with the mediterranean diet: results of the PREDIMED-reus nutrition intervention randomized trial ». *Diabetes Care* 34 (1), 14–19.
- Salas-Salvado, J., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Covas, M.I., Ibarrola-Jurado, N., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Romaguera, D., Lapetra, J., Lamuela-Raventós, R.M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M.A., Sorlí, J.V., Martínez-González, M.A., 2014. « prevention of diabetes with mediterranean diets: a subgroup Analysis of a randomized trial ». *Ann. Intern. Med.* 160 (1), 1–10.

- Saluceri, S., Burattini, S., Battistelli, M., Suontempo, F., Canonico, B., Martelli, A.M., Papa, S., Falcieri, E., 2015. Tyrosol prevents apoptosis in irradiated keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 80, 61–68.
- Shahidi, F., Naczk, M., 2004. *Phenolic in Food and Nutraceutical*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Soares, S.I., Gonçalves, R.M., Fernandes, L., Mateus, N., de Freitas, V., 2009. Mechanistic approach by which polysaccharides inhibit α -amylase/procyanidin aggregation. *J. Agric. Food Chem.* 57 (10), 4352–4358.
- Soares, S., Mateus, N., de Freitas, V., 2012. Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. *J. Agric. Food Chem.* 60 (15), 3966–3972.
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., 2020. Influence of food matrix on the bioaccessibility of fruit polyphenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 68 (5), 1315–1325. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07680>.
- Tsagaraki, E., Lazarides, H.N., Petrotou, K.B., 2007. Olive mill wastewater treatment. In: *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, vols. 133–157. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-35766-9_8.
- Tuberosa, C.I.G., Bohan, M., Bifulco, E., Budimir, D., Pirisio, F.M., 2013. Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: the case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chem.* 140, 686–691.
- Tuck, K.L., Hayball, P.J., 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.* 13, 636–644.
- Upendra, R.M., Sreenivasulu, M., Chengaiah, B., Jagannathan Reddy, K., Madhusudhana Chetty, C., 2010. Herbal medicines for diabetes mellitus: a review. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2, 1883–1892.
- Visioli, F., Caruso, D., Plasmati, E., Patelli, R., Mulinacci, N., Romani, A., Galli, G., Galli, C., 2001. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic. Res.* 34, 301–305.
- Visioli, F., Galli, C., Grande, S., Colonnelli, K., Patelli, C., Galli, G., Caruso, D., 2003. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J. Nutr.* 133, 2612–2615.
- Wang, X., Ho, C.-T., Huang, Q., 2007. Investigation of adsorption behavior of (–)-Epigallocatechin gallate on bovine serum albumin surface using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 55 (13), 4987–4992.
- Xiao, Z., Storms, R., Tsang, A., 2006. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Anal. Biochem.* 351, 146–148.
- Yang, C.S., Sang, S., Lambert, J.D., Lee, M.J., 2008. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (Suppl. 1), S139–S151.
- Yoshikawa, H., Maruo, B., 1960. Stimulation of amylase formation by an amine from *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 4 (45), 270–278.
- Zhao, G.-Y., Diao, H.-J., Zeng, W., 2013. Nature of pectin-protein-catechin interactions in model systems: pectin-protein-catechin interactions. *Food Sci. Technol. Int.* 19 (2), 153–165.

Extraction of the polyphenols from olive mill wastewater (margine) enriched with bioactive compounds from olive leaves by different techniques and influence on antioxidant activity

N'nabinty Sylla^{1*}, Hakima EL Hajji^{1*} and Kacem EL Kacemi

¹Materials, Nanotechnologies and Environment Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Mohamed V University, Morocco

Abstract. The maceration of the OMW with the OL and the distilled water heated in μ -wave and the heating mantle at 80°C, largely contribute to the increase in the content of phenolic compounds of our extracts. According to the obtained results, the TPC and TFC of the ext of OMW heated by the μ -wave and the Hm were higher than those ext obtained without heating at rt. TPC of ext obtained by μ -wave and Hm were found 186.27 ± 2.13 mg GAEq/gext and 185.65 ± 1.07 mg GA Eq/g ext respectively, whereas that obtained without heating at rt was 97.98 ± 3.98 mg GA Eq/gext. TFC were 104.79 ± 2.19 mg R Eq/g 114.79 ± 2.13 mg R Eq/gext, for those ext obtained by μ -wave and Hm respectively, whereas was 93.12 ± 1.79 mg R Eq/gext for that obtained without heating at rt. These values are proportional to its AA, so the AA obtained of the extract heated by the μ -wave was the greatest 305.14 ± 2.67 mg T Eq/gext, while for the ext heated by Hm was 294.57 ± 1.71 mg T Eq/gext and for that obtained without heating was 105.17 ± 2.47 mg T Eq/gext. According to these results, the heating of OMW by the μ -wave and Hm with existence of OL are the most suitable techniques for the increasing of the extraction of PP contents from OMW. The coR study carried out by the Pearson method revealed a positive significant coR and a negative significant coR.

Key word: olive mill wastewater; olive leaves; μ -wave; conventional heating; polyphenols; antioxidant activity

1. Introduction

The olive mill wastewater are the vegetable waters obtained during the extraction of olive oil (water added during grinding and crushing stages) (Galanakis and al., 2010). Due to its widespread production among olive producing countries it has been given many names: aqua reflue in Italy, alpechin in Spain, katsigaros in Greece, and zebar in Arab countries (Skaltsounis and al., 2015). The OMW are characterized by their reddish-brown color, but also by their cloudy appearance, which gives them a blackish appearance. This coloration is dependent on the state of degradation of the phenolic compounds and of the olives from which they are derived (Hamdi and Ellouz, 1993); (Zahari and al., 2014). OMW are also characterized by their acid pH which varies between 4 and 5 (Nefzaoui, 1988); (Eroğlu and al., 2008); (Hachichaa, and al., 2009); (Yaacoubi and al., 2009); (Yalcuk, and al., 2010). It has a very high electrical conductivity due to the presence of potassium, chlorides, calcium and magnesium ions (Salvemini, 1985); (Zbakh and Abbassi, 2012). They have a biological oxygen demand (BOD) varying between 45 and 55 kg / m³, the maximum of which is 100 kg / m³, a chemical oxygen demand (COD) varying between 100 and 220 kg / m³, the maximum of which is 300 kg / m³. Their polluting power is due to their acid pH, their high fat content as well as their great richness in phenolic compounds, which are difficulty biodegradable thus causing environmental pollution when they are rejected without pretreatment. The harmful effect of margines for the

environment derives largely from their richness in phenolic compounds; paradoxically its compounds with a great antioxidant power are on the other hand very beneficial for the organism by their antioxidant property. The phenolic compounds of the OMW are very diverse and their structure is very variable. Over 50 different phenolic compounds have been identified in the water sources (Obieds and al., 2005; Dermeche and al., 2013). They come from the enzymatic hydrolysis of carbohydrates and esters from olive pulp during the extraction process (trituration). Their solubilization in oil is, however, much lower than in vegetable water, which explains their high concentration detected in vegetable water (Ranalli, 1991; Achak and al., 2008). The content of phenolic compounds in vegetable water depends on the extraction system of olive oil (Annaki and al., 1997; Aissam and al., 2002). In general, it varies between 3 and 5 g / l (Balice and al., 1997; AL-Malah and al., 2000; Oukili and al., 2001; Garrido Hoyos and al., 2002; Tsioulpas and al., 2002; Casa and al., 2003; Fenice and al., 2003), and it can even exceed 9g / L (Klibanov and al., 1983; Borja and al.1995; Sayadi and Ellouz, 1993; Kissi and al., 2001; Aissam and al., 2002). It was reported in the study of Skaltsounis & al that the prevalent classes of hydrophilic phenols identified include phenyl alcohols (tyrosol Fig.1a p.4, and hydroxytyrosol Fig.1b p.4 are the major compounds (Bazoti and al., 2006), phenolic acids (hydroxycinnamic acid: example caffeic acid Fig.1c p.4 and benzoic acid: example gallic acid Fig.1d p.4), secoiridoid derivatives (example Oleuropein aglycone), flavonoids (example quercetin Fig.1e p.4), and lignans (example pinorésinol). Among the by-products of olive oil extraction we can mention the olive leaves, it was also reported in the study of Skaltsounis & al that olive leaves contain carbohydrates, oil, crude protein, crude fiber, inorganic compounds, and a number of secondary metabolites. Currently, this byproduct is either burned or ground together with the remainder of the OTP byproducts (branches), causing major economic costs and environmental concerns. Occasionally, this residue finds an application as animal feed or is directly discarded in the olive oil producing facility (Molina-Alcaide and Yáñez-Ruiz, 2008). However, the presence of interesting bioactive compounds in the olive leaf is well known. Oleuropein Fig.1f p.4 is the principal secondary metabolite in the olive tree leaves; its content in dry material can exceed 15% (w/w) (Agalias and al., 2005; Aouidi and al., 2012; Erbay and Icier, 2010). Along with ligstroside and its demethylated derivative, which are also found in olive leaves, it belongs to the category of secoiridoids having a phenolic moiety. Further phenolics identified are hydroxytyrosol, tyrosol, acteoside (verbascoside), caffeic acid, p-coumaric, acid and vanillic acid. In addition, olive leaves contain a significant amount of flavonoids, such as luteolin-7-O-glucoside, luteolin-7-O-rutinoside, apigenin-7-O-glucoside, diosmetin-7-O-glucoside, rutin, luteolin, diosmetin, and apigenin (Ahmad-Qasem and al., 2013; Ghanbari and al., 2012; Japón-Luján and al., 2006). In recent years, a growing interest has been observed with respect to the biological effects of natural antioxidants, included in the fight against oxidative stress generated by reactive oxygen species (ROS). These are involved in aging and in the onset as well as progression of several diseases including cancer, atherosclerosis, cardiovascular accidents (CVA), osteoporosis, inflammatory diseases and neurodegenerative diseases etc. In this context, a great deal of scientific research has been carried out on bioactive compounds, especially on polyphenols (PP), which are excellent inhibitors of oxidation by trapping free radicals, and have led to their use in the food, cosmetics and pharmaceutical (Goulas and al., 2010). The latter has various chemical structures and characteristics. They are ubiquitous in fruits, vegetables, seeds, and other parts of the plant.

This work is part of the valorization of the polyphenolic by-products of the olive oil extraction and vegetable industry, such as hydroxytyrosol and oleuropein with high antioxidant potential. These compounds can be isolated by different extraction techniques or converted into products with high added value. These could later be used to enrich olive oil with polyphenols or used as stabilizing additives for agri-food products.

The aims of this study is to optimize the extraction of phenolic compounds by combining several extraction techniques hence the originality of this study, referring to the studies of S. (Sabiha and al., 2016) and (Nkhili and al., 2009). The work of (Nkhili and al., 2009) consisted in carrying out kinetic studies to see the influence of conventional heating (80°C and 100°C) and microwave heating (power 480W, 80°C and 100°C), on the extraction and the rate of the polyphenolic extract of Moroccan green tea (Al Kafila name of the mark of the tea) . The polyphenols were characterized by the following wavelengths 280 nm (total polyphenols), hydroxycinnamic derivatives (330 nm) and flavonols (350 nm). (Sabiha and al., 2016) on the other hand studied enrichment of olive oil in phenolic compounds by maceration with olive leaves assisted by ultrasound (frequency 25 kHz and a power of 150 W). We combined these two methods in our work in order to highlight the influence of the two heating techniques (conventional and microwave) on the maceration of the OMW with olive leaves and its implication on the polyphenolic rate and the antioxidant power of the polyphenolic extract. A correlation, using the Pearson method, will be demonstrated between antioxidant activity and the content of total phenols and antioxidant activity and the content of flavonoids.

2. Materials and Method

Chemical products: Hexane, ethyl acetate, Folin- Ciocalteu, Sodium carbonate (Na_2CO_3), Sodium nitrite (NaNO_2), Aluminum trichloride (AlCl_3), sodium hydroxide (NaOH), DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), Trolox, gallic acid, rutine, all were purchased from Unilab Casablanca Morocco.

2.1. Preparation of vegetable matter

The olive mill wastewater (OMW) was supplied by the mejjate oil mill located in the rural commune of Oued Jedida belonging to the province of Meknes, Morocco. It was prepared using a semi-modern factory whose wheel is made from the stone and turned by electricity (three-phase system). The olives harvested during the season of 2014 between mid-October and mid-November.

The olive leaves were treated according to the method used by Sabiha Achat (Sabiha and al., 2016) with some modification; the leaves were washed to remove the impurities. Then, they were dried in an oven at 40 ° C for 1 hour.

Afterwards, the leaves were ground using an electric grinder mark "Moulinex AR110O10", until became a fine powder. The powder kept in a sealed container and stored away from light.

2.1.1. Maceration

The maceration was performed according to the method of Ez-zohra NKHILI (Nkhili and al., 2009) with some modification; 20 g of olive leaves was macerated in 100ml of olive mill wastewater and 200ml of distilled water for three days at room temperature. The mixture was filtered on low foam and stored until further treatments.

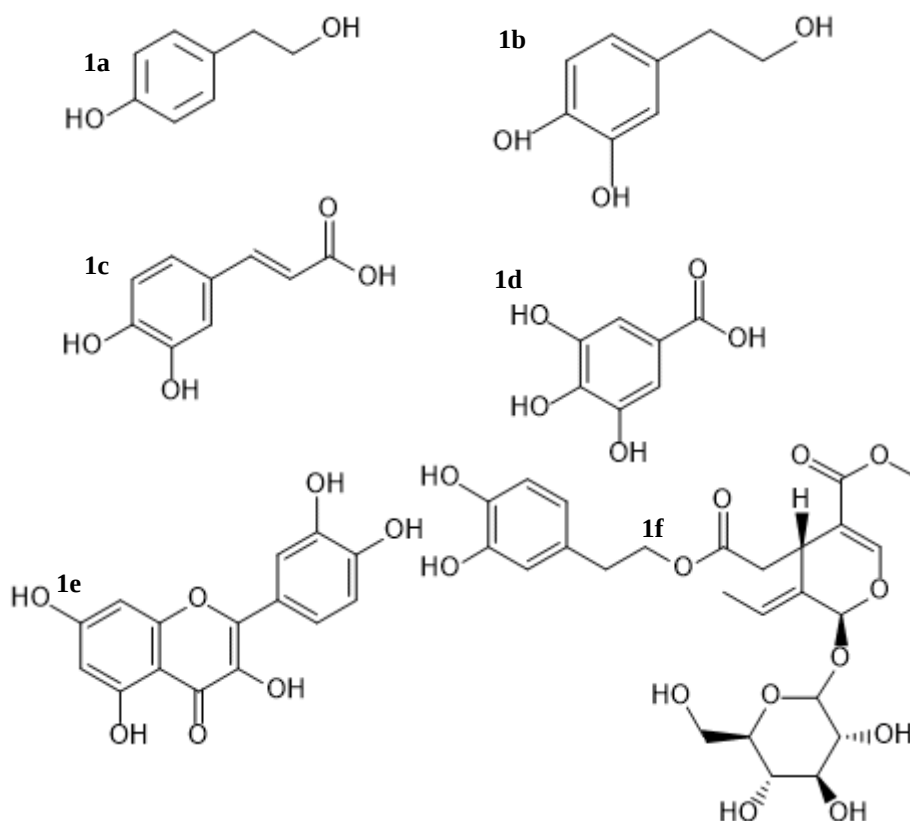


Figure 1: a) Chemical structure of tyrosol (2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol), b) Chemical structure of hydroxytyrosol (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethanol), c) Chemical structure of Caffeic acid, Chemical structure of gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid), d) Chemical structure of quercetin 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone, e) Chemical structure of oleuropein. All structures were taken ChemDraw Pro 12.0.

2.1.2. Microwave

It has been reported in the (Wong-Paz and al., 2017) study that the microwave process involves the interaction between solvent and plant material, where the absorbing properties are determined by the dielectric constant of the solvent. It is well known that solvents with high dielectric constant have the ability to absorb microwave energy and therefore produce a fast dissipation of energy into the solvent and solid plant matrix, which generates an efficient and homogeneous heating effect (Martins and al., 2010). It was also reported by (Wong-Paz and al., 2017) that various conventional methods have been developed for the extraction and the recovery of phenolic compounds from natural products, such as hydrodistillation (HD), Soxhlet (SX), and infusion extraction (IE), steam distillation (SD), maceration (MA), and so on (Lucchesi and al., 2004); (Sun and al., 2011); (Wang and al., 2008); however, these methods usually are time consuming and therefore the bioactive compounds may be degraded by long exposure times. In addition, these classical methods of extraction require large amounts of solvent. On the other hand, the nature of compounds and the operating factors in the extraction process impact the yields and kind of molecules to be extracted (Routray and Orsat, 2013).

Emerging technologies are more efficient methods for the extraction of bioactive compounds. This is because they allow the use of the most suitable

solvents in minor proportions, as well as reduced extraction times with respect to conventional techniques. The most notable of these emerging technologies are microwave-assisted extraction (MAE), supercritical fluid extraction (SFE), and ultrasound-assisted extraction (UAE) (Routray and Orsat, 2013). In MAE, the microwaves are combined with traditional solvent extraction (Hao and al., 2002). This methodology of extraction has been accepted as a potential alternative to conventional extraction methods for obtaining natural compounds (Yan and al., 2010). This is because it presents important advantages, such as short extraction time, less solvent, and a higher extraction rate thereby obtaining better products with lower cost (Ballard and al., 2010); (Hao and al., 2002); (Lucchesi and al., 2004).

Thereby, the heating of part of the microwave-assisted macerate was carried out in a modified microwave oven Fig. 2a and 2b p.5. A Thermometer follows the oven temperature.

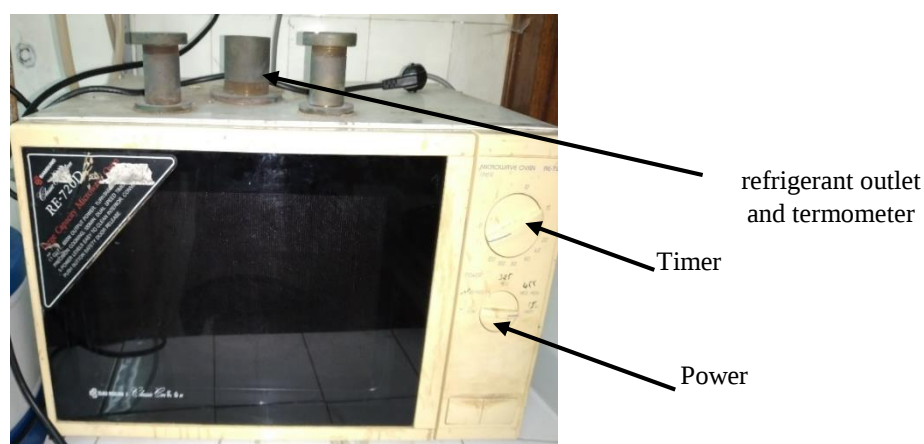


Figure 2a: Photo of the modified classic microwave used for the extraction of phenolic compounds



Figure 2b: Photo of the interior of the modified classic microwave used for the extraction of phenolic compounds

Otherwise, microwave energy is non-ionizing radiation used to heat solvents in contact with solid or liquid samples to extract compounds inside the walls of a food product (Jawad and Langrish, 2012). The principle of MAE is based

on the direct effect of microwaves on molecules by ionic conduction and dipole rotation. In general, polar solvents having a permanent dipole moment (e.g. water and methanol) and ionic solutions (usually acids) can strongly absorb microwave energy, while nonpolar solvent such as hexane do not heat up when exposed to microwave radiation (Katarzyna, 2009). The optimization of the extraction of target molecules by MAE is mainly attributed to its heating and rapid effect on the solvent, which increases the solubility of the compound of interest (Jawad and Langrish, 2012). However, MAE can be used without the addition of water or organic solvents in a process called microwave assisted solventless extraction, typically used to extract essential oils (Chemat et al., 2012). This method is based on the combination of microwave heating and distillation carried out at atmospheric pressure. When the water contained in the matrix is heated by microwaves, the glands containing the essential oil are broken, thus releasing the volatile oils which are then condensed in a cooling system placed outside the microwave oven (Chemat and al., 2012; Jacotet-Navarro and al., 2016). Thus, the extracts obtained do not have traces of toxic solvents and the products can be considered as undenatured and free from contaminants.

2.1.3. Experimental methods

- First fraction (Conventional heating): 100 mL (containing olive leaves) of the macerate was heated in heating mantle at 80°C for 60 min with stirring.
- Second fraction (Heating under μ -wave): 100 mL of macerate (containing olive leaves) was heated under μ -wave at 80°C for 60-min. The power of the microwave oven was set at 455 W so that the polyphenol degradation is minimized.

Samples were taken every five minutes (conventional heating and μ -wave heating). The kinetic study was followed by UV-Visible spectroscopy over a period of one hour. The UV-Visible spectrum of the macerate extract has been characterized by three wavelengths which are $\lambda = 280$ nm (Fig. 5a), $\lambda = 330$ nm (Fig. 5b) and $\lambda = 350$ nm (Fig. 5c) which correspond respectively to total phenols, hydroxycinnamic derivatives and finally flavonols. The absorbances at these wavelengths have been measured as a function of time. Extraction of polyphenols from macerates by heating under μ -waves is compared to that of conventional heating at the same temperature.

- The third fraction was not heated; the extraction was carried out cold: 100 mL of vegetable water (containing olive leaves) was used. This fraction was a witness for to see the influence of heat on the polyphenolic extract during maceration with olive leaves.
- Sample: was also a witness: to see the cold influence of the maceration by olive leaves on the polyphenolic extract. 100 mL of no macerated OMW or margine (without olive leaves) and without heating (untreated).

2.1.4. Preparation of extracts

The samples obtained from the three methods were washed with hexane (v/v) in order to remove the lipid fractions, the washing repeated three times for a total time of 30 min. Then, the extraction of phenolic compounds carried out with ethyl acetate (v/v), the extraction was repeated five times for a total time 75 min. Afterwards the organic phases obtained were combined and evaporated using a rotavapor at 60 °C. The mass obtained was recovered by a small volume of methanol (1mL) and then stored at 4 °C until utilization.

3. Analytical methods

3.1. Determination of total phenols

The determination of total phenols (TPC) was carried out by the Folin-Ciocalteu method, this method is based on the oxidation in basic medium of the oxidizable functions of polyphenols by a mixture of phosphotungstic acid ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) and phosphomolybdic acid ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) which is reduced, during the oxidation of phenols, to a mixture of blue oxides of tungsten (W_8O_{23}) and molybdenum (Mo_8O_{23}) (Lister and Wilson, 2001).

The blue coloration produced has a maximum absorption at approximately 765 nm. It is proportional to the rate of phenolic compounds. 0.5 mL of each extract solution at a concentration of 30 mg / mL was mixed with 2.5 mL of the Folin-Ciocalteu reagent diluted 10 times. After three minutes, 4 mL of 7.5% sodium carbonate solution was added. The mixture was immediately shaken and then incubated at a temperature of 40 ° C for 30 minutes. The optical density of the complex formed was measured at 765 nm. The contents of total phenols were expressed in mg Eq Gallic acid /g of extract.

The standard used was gallic acid (GA). The concentrations in the samples are expressed in mg GA equivalent / g of extract. The calibration curve is illustrated in Fig. 3.

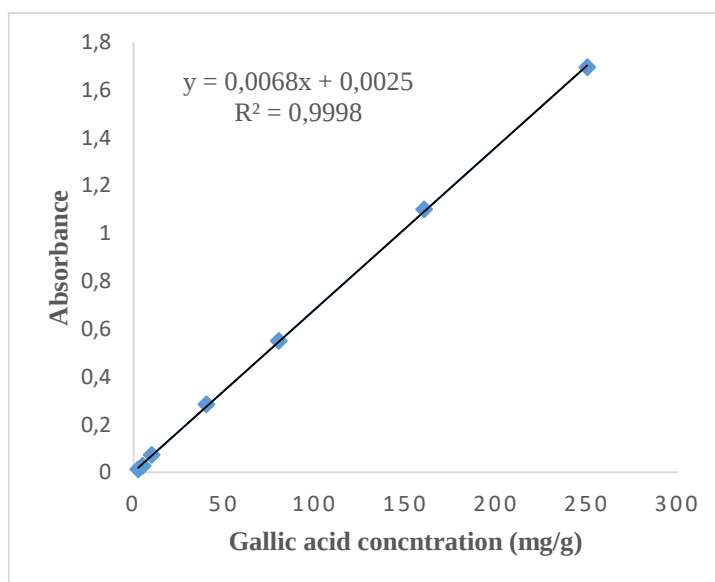


Figure 3: Gallic acid calibration curve

3.2. Total flavonoids content

The flavonoid contents of the extracts were determined using the aluminum trichloride colorimetric method (Huang and al., 2011). A quantity of 1 mL of the extract (30 mg/mL) was mixed with 6.4 mL of distilled water and subsequently with 0.3 mL of 5% (w / v) sodium nitrite (NaNO_2) solution. After 5 min, 0.3 mL of aluminum trichloride solution (AlCl_3 at 10% w / v) was added. 2 mL of sodium hydroxide (1M Na_2CO_3) was added to the mixture after standing for 6 minutes.

The final mixture was stirred with a vortex and allowed to stand for 30 minutes. The absorbance was measured at 510 nm. The rutin was used as standard
Fig. 4 p.8.

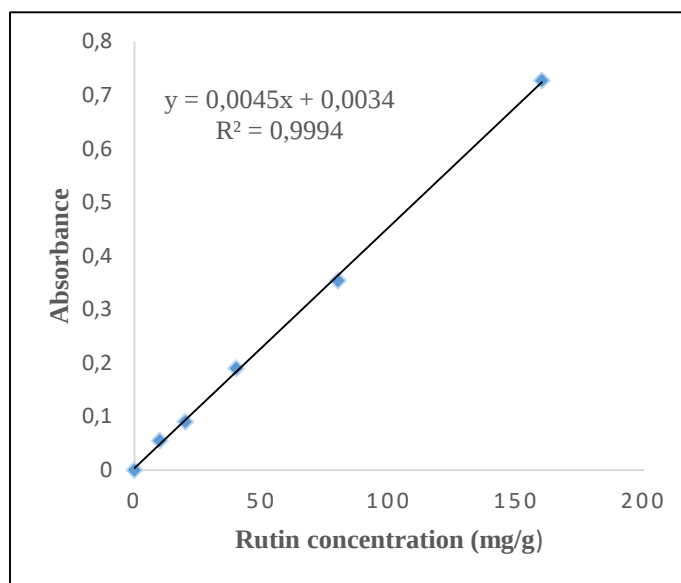


Figure 4: Rutin calibration curve

3.3. Antioxidant activity

Antioxidant activity was determined by the diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) degradation method according to Dewanto and al. (Dewanto and al., 2002). A volume of 2.5 mL of the extract (30 mg/mL) was mixed with 0.5 mL of DPPH (0.2 mM or 3.9 mg / mL) freshly prepared, and then the mixture was stored in the dark for 30 min. The absorbance was measured using a spectrometer at 517nm. The standard curve was prepared with Trolox solution (0.2–2 mg/mL), and the scavenging ability of the DPPH radical in the samples was estimated in terms of the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in mg/mL Trolox/g of extract.

3.4. Correlation between TPC, TFC and AA

Statistical analysis was performed on the samples using Pearson correlation or linear correlation, which involves measuring the linear relationship or proportionality between the values of two variables. GraphPad Prism 7 is the software that was used.

4. Results and discussion

4.1. Kinetic study of UV-Visible extraction

The results obtained at the end of the kinetic analysis (Fig.5a, 5b p.9 and 5c p.10) show in this study that there is not a big difference between the two types of heating (conventional and μ -wave heating) used in the quantitative extraction of the three families of polyphenols, unlike the study carried out by (Nkhili and al., 2009) where it was signified that the best extraction of the three families of phenolic compounds was obtained under heating assisted by μ -wave at 100°C.

On the other hand, in our case as well in the heating under microwave as in the conventional heating, the three families of polyphenols are extracted after 20 min, however in the study of (Nkhili and al., 2009) this was observed only in the case of heating under microwave at 100°C. It was also reported in the (Nkhili and al., 2009) study that the maximum extraction of the three families

of phenolic compounds was reached after 20 min only under μ -assisted heating at 100°C, as in this study, this was observed for both types of heating (conventional heating and heating under μ -wave at 80°C).

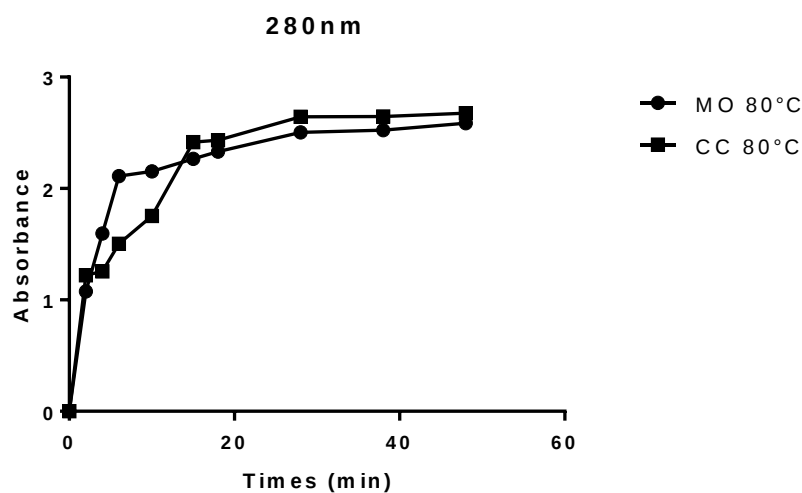


Figure 5a: kinetics of samples (OMW + olive leaves + distilled water) heated under μ -wave (MO) and the heating mantle (CC) at 80 ° C, absorbance reading at 280 nm.

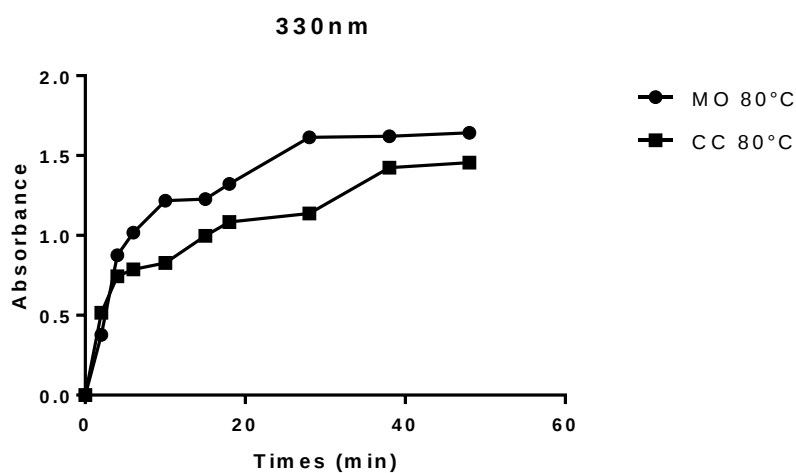


Figure 5b: kinetics of samples (marginine + olive leaves + distilled water) heated under μ -wave (MO) and the heating mantle (CC) at 80 ° C, absorbance reading at 330nm.

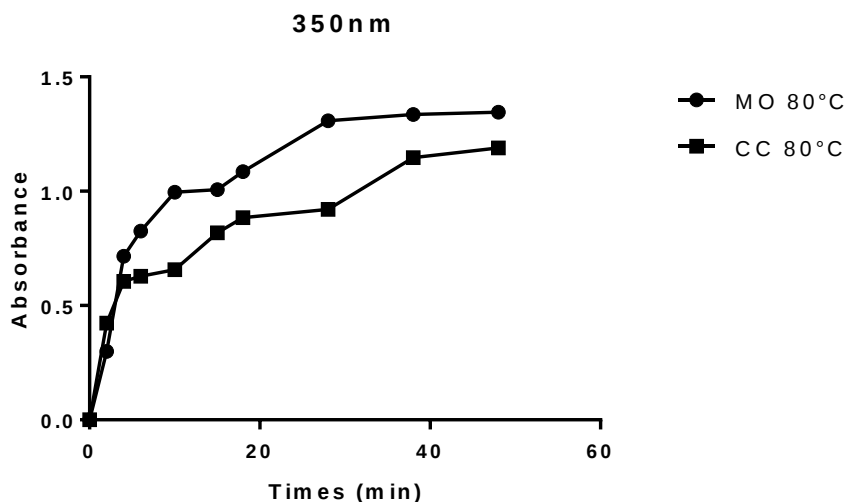


Figure 5c: kinetics of samples (margine + olive leaves + distilled water) heated under μ -wave (MO) and the heating mantle (CC) at 80 °C, absorbance reading at 350 nm.

4.2. Effect of olive leaves on total polyphenols and total flavonoid

The influence of olive leaves on the extraction of polyphenols was performed on two samples of olive mill wastewater, one was macerated with olive leaves, and the other was without olive leaves at room temperature.

4.2.1. Total Phenolic content (TPC)

The results obtained show that total polyphenols contents extracted by the maceration with olive leaves were higher than those extracted without olive leaves. The TPC were found to be 97.19 ± 3.98 mg GAE / g extract for extract with olive leaves and 54.50 ± 0.32 mg GAE / g extract for extract without olive leaves (Table 1 p.10).

4.2.2. Total flavonoid content (TFC)

For TFC was in the same effect on TPC, the TFC for the maceration with olive leaves were found 93.12 ± 1.79 higher than those for without olive leaves 50.18 ± 0.12 mg RE/g extract (table 1).

Table 1. Effect of olive leaves on extraction of TPC and TFC at room temperature.

Extract	TPC (mg GAE/g extract)	TFC (mg RE/g extract)
OMW	54.50 ± 0.32	50.18 ± 0.12
OMW + OL	97.19 ± 3.98	93.12 ± 1.79

OMW: Olive Mill Wastewater, OL: olive leaves, RE: rutin equivalent, GAE: gallic acid equivalent

4.3. Effect of temperature on extraction of TPC and TFC with olive leaves

4.3.1 Total Phenolic content

The results summarized in the (Table 2), show that the TPC extracted from OMW with the heating by μ -wave and heating mantle were higher and more efficient than in the case of the extract obtained without heating. TPC values for the extracts heated by μ -wave and heating mantle were close, these values were found to be 186.27 ± 2.13 mg GAE/g extract and 182.98 ± 2.92 mg GAE/g extract respectively, while was 97.19 ± 3.98 mg GAE/g extract for the extract obtained without heating.

These results were compared to those results were performed by (Putnik and al., 2014), who reported that olive leaves contributed to the optimization of total polyphenols, an average of 41.13 ± 0.58 to 62.99 ± 0.043 mg Gallic Equivalent / g of dry material. Moreover, in the study by (Putnik and al., 2014), reported that (Ahmad-Qasem and al., 2013), obtained an average of 54 ± 17 mg / g of dry matter.

Table 2. Effect of temperature on extraction of TPC and TFC by the different techniques.

Extract	Extraction techniques	Temp (°C)	TPC (mg GAE/g extract)	TFC (mg RE/g extract)
OMW+OL	μ -wave heating	80	186.27 ± 2.13	104.96 ± 2.19
OMW+OL	Heating mantle	80	182.98 ± 2.92	114.79 ± 2.13
OMW+OL	without heating	at room temp	97.19 ± 3.98	93.12 ± 1.79

Temp: temperature

4.3.2. Total flavonoid

For the TFC values of the extracts obtained by heating mantle and by microwave heating (Table 2) were found to be the highest compared to the extract obtained without heating. However, by comparing (OMW+OL without heating) to (OMW+OL heating mantle) and (OMW+OL μ -wave heating), it is observed that there is not a marked improvement in the level of flavonoids despite the heating, this can be explained by a probable degradation of the flavonoids by temperature. This deserves chromatographic analyzes of the different extracts (and the determination of the TFC and TPC and AA of the hot extract of the olive vegetable water), study which will be carried out in a future article. The TFC values were found to be 104.96 ± 2.19 mg RE /g extract and 114.79 ± 2.13 mg RE/g extract for the treatment by microwave heating and by heating mantle respectively, whereas was 93.12 ± 1.79 mg RE /g extract for the treatment without heating. It was observed a slight difference between the extracts obtained by heating mantle and by microwave heating. On the other hand, the two types of heating were more efficient than in the case of the extract obtained without heating and without adding olive leaves, which indicates that the olive leaves have also contributed to the optimization of flavonoid extracts. In fact, in the studies by (Putnik and al., 2014) and (Goulas and al., 2010) reported that olive leaves provide 13 to 27% of flavonoids. The average amount of flavonoid is 16.51 ± 0.11 mg quercetin equivalent / g of dry matter. The same amount has been practically reported by (Nashwa and Abdel Aziz, 2014) and (Abaza and al., 2011).

4.3.3. Total antioxidant activity (AA)

The antioxidant activities of extracts were summarized in the (table 3), the results show that the extracts obtained by heating mantle and microwave have high antioxidant activity compared to the extract obtained by without heating and without addition of olive leaves. However the flavonoids having, previously supposed, been degraded by heating, thus generate phenolic degradation products (no flavonoid) with strong antioxidant power also. So the increase in antioxidant power can also be explained by the likely strong presence of flavonoid breakdown products.

It was observed a strong relationship between the total polyphenols, total flavonoids and the antioxidant activity. These results can be attributed to the strong contribution of total polyphenols and total flavonoids to the antioxidant activity of the extracts.

Table 3. Total antioxidant activity of the extracts with olive leaves using different extraction techniques.

Extract	Extraction techniques	Temperature °C	AA (mg TE/g extract)
OMW+ OL	μ-wave	80	305.14 ± 2.67
OMW+ OL	mantle heating	80	294.57 ± 1.71
OMW+ OL	Without heating	at room temp	105.84 ± 2.47
OMW		at room temp	94.69 ± 1.68

TE: trolox equivalent

4.3.4. Correlation between TPC, TFC and AA

Statistical analysis revealed the existence of a significant correlation between total polyphenols contents and antioxidant activity in the case of all extracts (Table 4). A significant correlation have also been noted between the content of total flavonoids (Table 5) and antioxidant activity.

There is a strong correlation between the antioxidant activity and the content of the total flavonoids of the all extracts. (Stagos and al., 2012) also reported a correlation between polyphenol content and antioxidant activity in the study. It was also reported in the (Wong-Paz and al., 2017) study existence a positive linear correlation between antioxidant capacity and total phenolic compounds, flavonoids and phenylpropanoids (Luyen and al., 2014).

Table 4. Correlation between TPC and AA.

Extract	Pearson r	r ²
TPC, TAA (MO)	-0.89	0.79
TPC, TAA (HM)	-0,85	0,71
TPC, TAA (WH)	-0.97	0.94
OMW	0.99	0.98

MO: Microwave; HM: heating mantle; WH: without heating.

This strong correlation in our study can be explained by the following:

- The contribution of olive leaves to the increase in the content of TPC and TFC of polyphenolic extracts MO, HM and WH,
- The contribution of flavonoid degradation products to the increase in antioxidant activity of polyphenolic extracts MO and HM.

Table 5. Correlation between TFC and AA.

Extract	Pearson r	r ²
TFC, TAA (MO)	0.85	0.79
TFC, TAA (HM)	0.95	0.71
TFC, TAA (WH)	-0.98	0.94
OMW	0.98	0.96

5. Conclusion

Olive mill wastewater have a bad reputation because of their highly polluting characteristics for the environment; paradoxically, they are very rich in phenolic compounds, very beneficial for the organism because of their strong antioxidant effect.

In fact, in this study, it was a question of optimizing the content of phenolic compounds in olive growing water with a view to their use as a nutraceutical by using techniques such as encapsulation.

Thus, the results obtained are: first, the efficiency of two types of heating (conventional and μ -waves) has been compared, the content of TPC as well as TFC in the case of these two types of heating are almost identical. Secondly, the contribution of olive leaves in optimizing the content of phenolic compounds has been also highlighted, by comparing the content of phenolic compounds (TPC and TFC) in the fraction of unheated macerate with that of a sample of unmacerated and unheated olive mill wastewater. We can conclude that olive leaves are also a rich source of phenolic compounds, as reported by (Sabiha and al., 2016) and many other authors.

Statistical software Graphpad Prism 7 carried out a correlation study, choosing the Pearson correlation or the linear correlation, the results obtained showed the existence of significant correlation between the antioxidant activity and the total polyphenols as well as the total flavonoids of the different extracts.

In view of these results, it can be concluded that the objective of this study has been achieved. However, it is important to emphasize that its results may be different in other cases, since the amount of polyphenols can vary depending on a number of factors (cultivar, maturation stage, climatic conditions, harvest period), but also technological processes for obtaining water from olive vegetation which can also significantly affect the polyphenol content.

References

- A. Agalias, E. Melliou, P. Magiatis, S. Mitaku, E. Gikas, A. Tsarbopoulos, Quantitation of Oleuropein and Related Metabolites in Decoctions of Olea europaea Leaves from Ten Greek Cultivated Varieties by HPLC with Diode Array Detection (HPLC-DAD), *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 28 (2005), pp. 1557–1571, <https://doi.org/10.1081/JLC-200058355>.
- A. Annaki, M. Chaouch, M. Rafiq, Influence de la durée du stockage des olives sur l'évolution de la composition des margines, *l'eau.l'indust. les nuis.*, 218 (1999), pp. 24-28.
- A. Nefzaoui, In *l'économie de l'olivier : Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits*, ed. by CIHEAM, Paris (France), (1988), pp. 153-173.

- A. Yalcuk, N.B. Pakdil, S.Turan, Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands, *Desalination*, 262(1-3) (2010) , pp. 209-214, [10.1016/j.desal.2010.06.013](https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.06.013).
- A. Zahari, A. Tazia, A. Azzi, optimization of treatment conditions of olive oil mill wastewater by super oxidant K3FexMnyO8, *J.Mater.Environ.Sci*, 5(2014), pp. 484-489.
- A.Achak, N. Ouazzni, A. Yaacoubi et L. Mandi, Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essai de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium, *Rev.des Scien.de l'Eau*, 21(2008), pp. 53-657, <https://doi.org/10.7202/017930ar>.
- A.Jawad and T.A.A. Langrish, Optimisation of Total Phenolic Acids Extraction from Mandarin Peels Using Microwave Energy: The importance of the Maillard Reaction, *Journal of food Engineering*, 1009 (1) (2012), pp.162-174.
- A.L. Skaltsounis, A. Argyropoulou, N.Aligiannis, N. Xynos, In *Recovery of High Added Value Compounds from Olive Tree Products and Olive Processing Byproducts: Olives and Olive Oil*; ed. by B. Dimitrios; AOCS Press, Urbana, Illinois, (2015), pp. 338.
- A.M. Klibanov, T.M. tu, K.P. Scott, Peroxidase catalyzed removal of phenol from coal-conversion wastewater's, *Scien.*, 22 (1983), pp. 259-261.
- A.Ranalli, the effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation, *Olivae.*, 37 (1991), pp. 30-39. Corpus ID: 114711133.
- A.Sabiha, N. Rakotomanomana, K. Madani and O. Dangles, Antioxidant activity of olive phenols and other dietary phenols in model gastric conditions: Scavenging of the free radical DPPH and inhibition of the haem-induced peroxidation of linoleic acid, *food chem.*, (2016), pp.135-142, [10.1016/j.foodchem.2016.06.076](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.076).
- A.Tsioulpas, D. Dimou, D. Iconomou, G. Aggelis, Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, 84(2002), pp. 251-257, [10.1016/S0960-8524\(02\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00043-3).
- A.Yaacoubi, A. Chahlaoui, M. Rhamani, M. ELYachioui, Y. Oulhote, Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol, *Agrosolutions*, 20 (2009), pp. 1.
- B.Huang, H. Ke, J. He, X. Ban, H. Zeng, Y. Wang, Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo, *F. ChemToxicol.*, 49 (2011), pp. 185-90. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.015>.
- B.T.T.Luyen, B.H. Tai, N.P. Thao, S.H. Lee, H.D. Jang, Y.M. Lee, Y.H. Kim, Evaluation of the antiosteoporosis and antioxidant activities of phenolic compounds from *Euphorbia maculata*, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 57 (2014), pp. 573–579. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4157-2>.
- C.M.Galanakis, E.Tornberg, V.Gekas , A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction, *LWT Food Sci, Techno*, 43 (2010), pp. 1009–1017, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.005>.
- D. Stagos, N. Portesis, C. Spanou, D. Mossialos, N. Aligiannis, E. Chaita, C. Panagoulis, E. Reri, L. Skaltsounis, A. M. Tsatsakis, D. Kouretas, Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (2012), 4122, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.033>.

E. Lister , P. Wilson, Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity (personal communication), Crop Research Institute, Lincoln, New Zealand, (2001).

E. Molina-Alcaide, D. R. Yáñez-Ruiz, Potential Use of Olive By-Products in Ruminant Feeding: A Review. *Anim. FeedSci. Technol.*, 147 (2008), pp. 247–264. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.021>.

E. Nkhili, V. Tomao, H. EL Hajji, E. EL Boustani, F. Chemat and O. Dangles, Microwave-assisted Water Extraction of Green 3 Tea Polyphenols, *Phytochem Anal.*, 20(5) (2009), pp.408-15, <https://doi.org/10.1002/pca.1141>.

E.Eroğlu, I.Eroğlu, U.Gündüz, M.Yücel, Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater, *BioresourTechnol*, 99(15) (2008), pp. 6799-808.

F. Aouidi, N. Dupuy, J. Artaud, R. Roussos, Msallem M., I. PerraudGaime, M. Hamdi, Rapid Quantitative Determination of Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea*) Using Mid-Infrared Spectroscopy Combined with Chemometric Analyses, *Ind. CropProd.*, 37 (2012), pp. 292–297, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.024>.

F. Chemat, M. Abert Vian and G. Cravotto, Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7) (2012), pp.8615-8627.

F. N. Bazoti; E. Gikas; A. L. Skaltsounis; A. Tsarbopoulos, Development of a Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI MS/MS) Method for the Quantification of Bioactive Substances Present in Olive Oil Mill Wastewaters, *Anal. Chim. Acta*, 573–574 (2006), pp. 258–266, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.075>.

F. Salvemini, Composizione chimica e valutazione biologica di un margine ottenuto essicandotermicamente le acque di vegetazione delle olive, *Riv Ital. Sostanze Grasse*, LXII (1985), pp.559-564.

F.S. Nashwa, Morsy M.E.and Abdel-Aziz. Efficiency of olive (*Olea europaea* L.) leaf extract as antioxidant and anticancer agents, *J. Agroaliment. Process. Technol.*, 20 (2014), pp.46–53. Corpus ID: 21724268.

H. Aissam, E. Errachidi, M. Erzouki, H. Benlemli, Identification des levures isolées des margines et études de leur activité catalase, *cahier de l'association scientifique européenne pour l'Eau et la Santé*, 7 (2002), pp. 23-30, <https://doi.org/10.1051/asees/20020701023>.

H. Obieds, M. Allen, D. Bedgood, P. Prenzler, K. Robards and R. Stockmann, Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill wastewater, *J. of agricul. Food chem.*, 53 (2005), pp. 823-837, <https://doi.org/10.1021/jf048569x>.

H. Zbakh and A. El Abbassi, Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages, *Journal of Functional Foods*, 4(1) (2012), pp. 53-65, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.002>.

J. E. Wong-Paz, D. B. Muñiz-Márquez, P. Aguilar-Zárate, J.A. Ascacio-Valdés, K.Cruz, C. Reyes-Luna, R. Rodríguez, C. N. Aguilar, In *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food: Chapter 5 - Extraction of Bioactive Phenolic Compounds by Alternative Technologies*, Ed. by A. MihaiGrumezescu ,A. M. Holban, *Handbook of Food Bioengineering*, (2017), pp. 237.

- J. Wang, B. Sun, Y. Cao, Y. Tian, X. Li, Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran, *Food Chem.*, 106 (2008), pp. 804–810, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.062>.
- J.-Y. Hao, W. Han, S.-D. Huang, X. Deng, Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L, *Sep. Purif. Technol.*, 28 (2002), pp. 191–196, [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(02\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(02)00043-6).
- K. AL-Malah, M.O.J Azzam, N.I. Abu-Lail, Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay, *Sep. and Purif. Technol.*, 20 (2000), pp. 225–234, [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(00\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(00)00114-3).
- L. Abaza, N. Ben Youssef, H. Manai, F. Mahjoub Haddada, K. Methenni, M. Zarrouk Chétoui, olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities, *Grasas y Aceites.*, 62 (2011), pp. 96–104, <https://doi.org/10.3989/gya.044710>.
- M. Fenice, G. Giovannozzi Sermanni, F. Federici, A. D’Annibale, Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panustigrinus* on olive mill wastewater-based media, *J. Biotechnol.*, 100(1) (2003), pp. 77–85, [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00241-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00241-9).
- M. H. Ahmad-Qasem, J. Cánovas, E. Barraón-Catalán, V. Micol, J. A. Cárcel, J. V. García-Pérez, Kinetic and Compositional Study of Phenolic Extraction from Olive Leaves (Var. Serrana) by Using Power Ultrasound, *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, 17 (2013), pp. 120–129.
- M. Hamdi, P. Ellouz, Treatment of toxified olive mill wastewater’s by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes, *Environ. Technol.*, 1993, 14, 183–188, <https://doi.org/10.1080/09593339309385278>.
- M. Jacotet-Navarro, N. Rombaut, S. Deslis, A.-S. Fabiano-Tixier, F.-X. Pierre, A. Bily and F. Chemat, Towards a “dry” bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products, *Green Chemistry*, 10 (2016).
- M. Kissi, M. Mountadar, O. Assobhei, E. Gargiulo, G. Palmieri, P. Giarina, G. Santa, Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxication of olive mill waste water, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57(1-2) (2001), pp. 221–226, <https://doi.org/10.1007/s002530100712>.
- M.E. Lucchesi, F. Chemat, J. Smadja, Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *J. Chromatograph. A.*, 1043 (2004), pp. 323–327.
- M. Katarzyna, Microwave-Assisted and cloud-Point Extraction in Determination of Drugs and Other Bioactive Compounds, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28 (4) (2009), pp. 436–446.
- M.M. Yan, W. Liu, Y.J. Fu, Y.G. Zu, C.Y. Chen, M. Luo, Optimization of the microwave-assisted extraction process for four main astragalosides in *Radix Astragali*. *Food Chem.*, 119 (2010), pp. 1663–1670.
- O. Oukili, M. Chaouch, M. Rafiq, M. Hadji, M. Hamdi, M. Benlemlih, Bleaching of olive mill wastewater by clay in the presence of hydrogen peroxide. *Ann. Chim. Sci. Mat.*, 26 (2001), pp. 45–53.
- P. Putnik, F.J. Barba, I. Spanic, Z. Zoric, V. Dragovic-Uzelac, D.B. Kovcevic, Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europaea*). *Food and Bioprocess Processing*, 106 (2017), pp. 19–28, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.004>.
- R. Borja, C.J. Banks, J. Alba, A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic

constituents of olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture, *Environ.Sci.Health A.*, 30 (1995), pp. 607-626.

R. Casa, A. D'Annibale, F. Pieruccetti, S.R. Stazi, G. GiovannozziSermanni, B. Cascio, Reduction of the phenolic components in olive(mill wastewater by an enzymatic treatment and ist impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability, *Chemosph.*, 50(8) (2003), pp. 959-66.

R. Ghanbari, F. Anwar, K. M. Alkharfy, A. H. Gilani, N. Saari, Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.), A Review. *Int. J.Mol. Sci.*, 13 (2012), pp. 3291–3340, <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>.

R. Japón-Luján, J. M. Luque-Rodríguez, M. D. Luque De Castro, Multivariate Optimisation of the Microwave-Assisted Extraction of Oleuropein and Related Biophenols from Olive Leaves. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006), pp. 753–759, <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0419-0>.

S. Dermeche, M. Nadour, C. Larroche, F. Moulti-Mati and P. Michaud, Olive mill wastes: Biochemical characterisations and valorisation strategies, *Process Biochemistry*, 48 (2013), pp. 1532-1552.

S. Martins, C.N. Aguilar, I. De la Garza, S. Mussatto, J.A. Teixeira, Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larreatridentata* by microwave-assisted extraction, *J. Chem.Technol. Biotechnol.*, 85 (2010), pp. 1142–1147, <https://doi.org/10.1002/jctb.2412>.

S. Sayadi, R. Ellouz, Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters, *J. Chem.Biotechnol.*, 57 (1993), pp. 141-146, <https://doi.org/10.1002/jctb.280570208>.

S.E. Garrido Hoyos, L. Martineznieto, F. Camachorubio, A. Ramos cormenzana, Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*, *Pro. Biochem.*, 37 (2002), pp. 1169-1176, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00332-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00332-6).

S.Hachichaa, J.Cegarrab, F. Sellamia, R. Hachichaa, N. Drirac, K.Medhiouba, E. Ammar, Elimination of polyphenols toxicity from olive mill wastewater sludge by it's co-composting with sesame bark, *Journal of Hazardous Materials*, 161 (2009), pp. 1131–1139.

S.T. Ballard, P. Mallikarjunan, K. Zhou, S. O'Keefe, Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem.*, 120 (2010), pp. 1185–1192, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.063>.

V. Balice, C. Carrieri, G. Carrieri, Tattamento chimico-fisicoseguito dal biologic delle aque di vegetazione delle olive, *Ricerca.*, 2 (1997), pp. 50-53.

V. Dewanto, X. Wu, K.K. Adom, R.H. Liu, Thermal processing enhances thenutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002), pp. 3010-3014, <https://doi.org/10.1021/jf0115589>.

V. Goulas, V.T. Papoti, V. Exarchou, M.Z. Tsimidou, and I.P. Gerothanassis, Contribution of flavonoids to theoverall radical scavenging activity of olive (*Olea europaea* L.) leaf polar extracts, *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010), pp. 3303–3308, <https://doi.org/10.1021/jf903823x>.

W. Routray and V. Orsat, Preparative extraction and separation of phenolic compounds. In: Ramawat, G.K., Mérillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products:*

Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Springer, Berlin, Heidelberg, (2013), pp. 2013–2045.

Y. Sun, Z. Liu, J. Wang, Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim, Sep.Purific. Technol., 78 (2011), pp. 49–54, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.01.017>.

Z. Erbay, F. Icier, The Importance and Potential Uses of Olive Leaves, Food Rev. Int., 26(2010), pp. 319–334, <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2010.496021>.