



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID - TLEMCEM

Faculté des sciences

Département de Chimie

Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses

- COSNA -



## *Extraction et Synthèse de l'Hydroxytyrosol*

Mémoire présentée par

**Amouri Amina**

En vue de l'obtention du diplôme de

**Master de chimie**

**Spécialité: chimie bio-organique et thérapeutique**

Soutenue publiquement le 26 Juin 2012 devant le jury composé de :

Mr. Z. Arrar	Président	UAB-Tlemcen
Mme. W. Drici	Examineur	UAB-Tlemcen
Mr A. Atmani	Examineur	UAB-Tlemcen
Mr. M. DIB	Examineur	UAB-Tlemcen
Mr. H. Allali	Examineur	UAB-Tlemcen
Mr. B. Benbadji	Examineur	UAB-Tlemcen
Mr. D. Bendiabdellah	Examineur	UAB-Tlemcen
Mr. J. Kajima Mulengi	Directeur de mémoire	UAB-Tlemcen

# SOMMAIRE

*Introduction générale*

Introduction .....1

1. La maladie d'Alzheimer .....1

    1.1. Généralités.....1

    1.2. Les stratégies thérapeutiques .....2

        1.2.1. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.....2

        1.2.2. Inhibition de la formation du peptide A $\beta$  .....3

        1.2.3. Anti-inflammatoires.....3

        1.2.4. Autres voies de recherches.....3

    1.3 Approche thérapeutique.....3

2. Les polyphénols naturels.....4

3. Hydroxytyrosol .....5

    3.1. Structure et l'intérêt de l'hydroxytyrosol.....5

    3.2. Propriétés biologiques.....5

        3.2.1. Activité Antioxydante.....5

        3.2.2. Capacité de cardioprotectrice.....6

        3.2.3. Activité anticancéreuse.....6

        3.2.4. Activité antimicrobienne .....6

        3.2.5. Activité antidiabétique.....6

        3.2.6. Activité neuroprotective.....6

    3.3. L'origine de l'hydroxytyrosol.....7

4. Présentation du travail.....7

Références.....8

*Chapitre 1 : Données bibliographiques*

A. Extraction de l'hydroxytyrosol.....11

    1. Généralités sur la culture d'olive.....11

    2. Extraction d'huile d'olive.....11

        2.1. Opérations préliminaires.....11

2.2. Broyage .....	11
2.3. Malaxage .....	11
2.4. Séparation des phases .....	12
3. Les caractéristiques des margines d'olive.....	12
• Les composés phénoliques.....	12
4. Méthodes d'extraction de l'hydroxytyrosol.....	13
4.1. Extraction par fluide supercritique .....	13
4.2. Extraction avec un solvant organique.....	14
B. Synthèse de l'hydroxytyrosol .....	14
1. Synthèse organique.....	14
2. Synthèse enzymatique .....	15
Références.....	16

*Chapitre 2 : Extraction et synthèse de l'hydroxytyrosol*

A. Extraction de l'hydroxytyrosol en continue .....	18
B. Synthèse organique de l'hydroxytyrosol.....	19
1. Méthoxylation de la vanilline.....	19
2. Estérification de l'acide bromoacétique.....	20
3. Condensation de <i>Darzens</i> .....	22
4. Réduction de la fonction aldéhyde.....	24
5. Déprotection des fonctions hydroxyle.....	26
Références.....	27
<i>Conclusion et perspectives</i> .....	28
<i>Partie expérimentale</i> .....	30

# Introduction générale

### **Introduction**

Les maladies dégénératives, se traduisant par la dégénérescence d'un type cellulaire donné, sont très nombreuses et ont un impact de plus en plus important sur la qualité de vie des personnes affectées. Leur fréquence s'est vue augmentée principalement à cause de l'allongement de l'espérance de vie.

Les maladies les plus fréquentes dues au vieillissement du système nerveux central comprennent :

- la maladie d'Alzheimer
- la maladie de Parkinson
- la sclérose latérale amyotrophique

Ces maladies peuvent également toucher des adultes jeunes (20-40 ans) ; c'est notamment le cas de la sclérose en plaques. A l'inverse des autres maladies, pour la sclérose en plaques, la dégénérescence des cellules nerveuses est secondaire. La cause première de la maladie est un processus inflammatoire.

Les maladies du système nerveux central, qu'elles soient à composantes dégénératives et/ou inflammatoires se caractérisent par une dégénérescence nerveuse progressive pour aboutir à une mort des différentes catégories de cellules nerveuses. Dans la grande majorité des cas, ces pathologies dégénératives sont essentiellement associées au vieillissement du système nerveux central mais peuvent également être dues à des agents infectieux. Elles peuvent également être associées à des phénomènes inflammatoires comme dans le cas de la sclérose en plaques.

Ces neuropathies dégénératives peuvent être principalement classées en deux catégories :

- les pathologies provoquant des démences séniles et/ou des troubles moteurs comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson.
- les maladies neurologiques entraînant des paralysies comme la sclérose latérale amyotrophique ou la sclérose en plaques. <sup>(1)</sup>

Dans cette partie, nous allons détailler plus précisément une maladie du système nerveux central, c'est la maladie d'Alzheimer.

### **1 - La maladie d'Alzheimer**

#### **1-1) - Généralités**

La maladie d'Alzheimer doit son nom au psychiatre allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915), qui a décrit, pour la première fois en 1906, les symptômes de la maladie. Cette affection n'a été reconnue qu'en 1963 comme maladie en tant que telle et non comme un processus normal de vieillissement du cerveau.

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative. Cette démence se traduit par une perte fonctionnelle progressive des cellules nerveuses. Les premières lésions apparaissent dans

les zones corticales du cerveau, zones impliquées dans la fonction de la mémoire. Au fur et à mesure de son évolution, la maladie va affecter de nouvelles régions du cerveau, ce qui va se traduire par des difficultés du langage, de raisonnement, des capacités gestuelles mais aussi par des troubles du comportement. <sup>(2)</sup>

Cette maladie est fortement liée à l'âge et au sexe. De manière générale, les femmes sont plus touchées que les hommes et les personnes de plus de 65 ans (environ 5%) sont moins exposés que les personnes de plus de 85 ans (environ 30%).

La maladie d'Alzheimer existe sous deux formes. Une forme dite sporadique, qui est la plus courante (90 à 95% des cas), et la forme familiale autosomique dominante moins répandue où le gène autosomique dominant est transmis d'une génération à l'autre et où les premiers symptômes de la maladie apparaissent en général bien avant 65 ans.

### 1-2) - Les stratégies thérapeutiques

Actuellement, il n'existe pas de thérapie efficace contre la maladie d'Alzheimer. Les médicaments disponibles permettent uniquement un traitement symptomatique en retardant l'aggravation des troubles cognitifs. Les approches thérapeutiques envisageables et intéressantes pour le traitement de la maladie sont entre autres :

- de pallier à la diminution du taux de différents neurotransmetteurs.
- d'empêcher la mort neuronale et/ou d'augmenter leur survie.
- de protéger les cellules nerveuses de métabolites toxiques.
- de diminuer la formation des dégénérescences neurofibrillaires.
- d'inhiber la réaction inflammatoire au niveau des plaques séniles. <sup>(1)</sup>

#### 1-2-1)- Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Les maladies neurodégénératives sont souvent accompagnées d'une perturbation de la neurotransmission. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, une diminution de la quantité d'acétylcholine (60 à 90%) dans le cerveau est observée. L'acétylcholine est un neurotransmetteur impliqué dans la mémoire, les facultés d'apprentissage et de raisonnement. Aussi, pallier ce déficit en acétylcholine représente une approche thérapeutique très intéressante. Celle-ci repose sur l'utilisation de molécules permettant de bloquer l'activité de l'enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase, et ainsi compenser le déficit de ce neurotransmetteur. <sup>(1)</sup>

Depuis plusieurs années, quatre inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Tacrine<sup>(3)</sup>, Donézépil<sup>(4)</sup>, Rivastigmine<sup>(5)</sup> et Bromhydrate degalantamine<sup>(6)</sup>) sont commercialisés en France. Tous ces médicaments permettent de retarder la progression de la maladie et d'améliorer la sémiologie, mais en aucun cas de stopper la dégénérescence nerveuse. Par ailleurs, ils présentent des effets secondaires assez importants du genre hépato-toxicité, douleurs musculaires,....

### 1-2-2)- Inhibition de la formation du peptide A $\beta$

Une autre approche thérapeutique intéressante consiste à diminuer, voire empêcher la formation du peptide A $\beta$  dans la mesure où la synthèse de ce peptide est l'élément central de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Pour ce faire, une des voies de recherche engagées repose sur l'utilisation d'inhibiteurs des sécrétases impliquées dans la métabolisation de l'APP (Amyloïd Precursor Protein) et donc dans la formation de la protéine A $\beta$ . Des inhibiteurs sélectifs de la  $\beta$ -sécrétase (Bafilomycin A<sup>(7)</sup>) ainsi que de la  $\gamma$ -sécrétase(DAPT<sup>(8)</sup>).

### 1-2-3)- Anti-inflammatoires

Des études épidémiologiques menées chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde ont montré un effet protecteur de la prise d'anti-inflammatoires contre la survenue de la maladie d'Alzheimer. Cependant, leur utilisation en thérapie s'est avérée décevante. Ils permettent de retarder l'apparition des symptômes en début de maladie, mais deviennent inefficaces au cours de l'évolution de cette dernière. <sup>(1)</sup>

### 1-2-4) - Autres voies de recherches

D'autres voies de recherches concernant le traitement des troubles cognitifs de la maladie d'Alzheimer sont explorées. Des études d'inhibiteurs de la phosphorylation de la protéine Tau sont également en cours. Les dégénérescences neurofibrillaires sont dues à une hyperphosphorylation<sup>(9)</sup> de cette protéine. Ainsi, une inhibition de cette phosphorylation anormalement élevée semble être une stratégie thérapeutique prometteuse.

Une autre voie de recherche explorée est l'immunothérapie. <sup>(10,11)</sup> Des études ont montré que l'immunisation contre le peptide Amyloïde- $\beta$  permet de faire baisser notablement la charge amyloïde cérébrale. <sup>(10)</sup> Cependant, les effets secondaires rencontrés chez des patients traités par vaccination<sup>(12)</sup> (5% embolie pulmonaire sévère), par un peptide A $\beta$  entier a été abandonnée. Par ailleurs, de nombreux moyens sont déployés pour la recherche de composés dits « neuroprotecteurs ». Les cibles principales de ces composés sont la perturbation de l'homéostasie calcique, la peroxydation lipidique et l'induction de l'apoptose.

### 1-3) -Approche thérapeutique

Ces dernières années, de nombreux travaux ont été effectués afin de combattre la source des diverses neuropathies dégénératives, à savoir, la dégénérescence neurale. Cette voie de recherche s'est développée avec la découverte de la présence de cellules souches dans le cerveau adulte permettant de régénérer les cellules nerveuses. Une nouvelle approche thérapeutique consistant à combattre la dégénérescence nerveuse tout en régénérant les différents types cellulaires du système nerveux central à partir de cellules souches neurales. <sup>(1)</sup>

Cependant, il ne s'agit pas uniquement de régénérer les cellules nerveuses lésées ou mortes au cours de ces différentes pathologies, mais de les protéger des phénomènes inflammatoires et immunitaires ainsi que du stress oxydatif présent lors du développement des différentes pathologies neurologiques. Les aspects de régénération nerveuse et de neuroprotection semblent complémentaires et indissociables. Aussi, une approche thérapeutique consisterait à développer des composés cumulant ces aspects.<sup>(1)</sup>

En effet, de plus en plus d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives).

## 2) - Les polyphénols naturels

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes un point commun, la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 atomes de carbone, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH).

Les représentants les plus nombreux (plus de 5000 molécules isolées) et les plus connus sont les « flavonoïdes ». Sous cette qualification un peu abusive, se cachent en fait trois familles de molécules de structures voisines : les flavonoïdes *stricto sensu* : il s'agit de pigments végétaux jaune-orangé (leur nom venant du mot latin flavus : jaune), les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet et un groupe de tanins, les proanthocyanidines, molécules incolores et très hydrosolubles<sup>(13)</sup>.

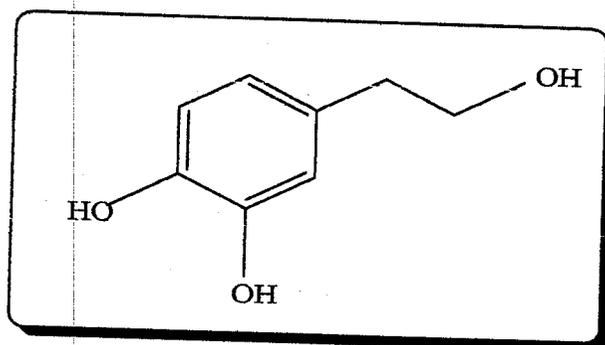
Néanmoins, de nombreuses autres structures existent, tels que les acides phénols (dérivés de l'acide cinnamique, par exemple), les tanins hydrolysables, les coumarines, les lignanes, les quinones et autre phloroglucinols. Il est à noter que certains composés appartenant à ces groupes chimiques ne comportent en fait aucun hydroxyle libre, de même qu'on peut signaler la présence de fonctions phénoliques chez des composés naturels appartenant à d'autres groupes photochimiques (terpènes, alcaloïdes)<sup>(14)</sup>. Cette grande variété structurale est à la base d'une certaine difficulté à connaître l'intérêt des polyphénols.

Les polyphénols sont classés parmi les antioxydants naturels. Leurs propriétés antioxydantes, mais aussi antibactériennes, antifongiques, antivirales, ..., ont été démontrées *in vitro*<sup>(15,16)</sup>.

**3) -Hydroxytyrosol [1]** : un polyphénol aux vertus thérapeutiques variées et intéressantes

### 3-1) - Structure et l'intérêt de l'hydroxytyrosol

L'hydroxytyrosol (HT), 3,4-dihydroxyphényléthanol ou DHPEA, est l'un des composants hydroxyaromatiques de secoïridoïdes<sup>(17,18)</sup>. L'hydroxytyrosol est un composé phénolique simple ayant une chaîne latérale de type alcool en position 1 du cycle aromatique, ainsi que deux substituants hydroxyle en position 3 et 4 dudit cycle. Ce composé appartient à la famille des ortho-diphénols, composés généralement connus pour avoir des propriétés antioxydantes intéressantes<sup>(19)</sup>.



**HYDROXYTYROSOL [1]**

De nombreuses recherches effectuées sur l'hydroxytyrosol ont montré l'intérêt de ce composé en tant qu'antioxydant. L'activité antioxydante de l'hydroxytyrosol lui confère des propriétés d'agent conservateur des corps gras et des denrées alimentaires de manière générale. Il est également connu pour ses propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques.

Ce composé est donc considéré comme un très bon complément et additif alimentaire de la famille des conservateurs et enfin, comme un agent utile pour renforcer la protection cellulaire vis-à-vis du stress oxydant et des pathologies qu'il engendre.

En raison de cet intérêt, notamment pour les industries alimentaire et cosmétique, l'hydroxytyrosol et, plus généralement, les polyphénols d'olives ont été et sont encore l'objet de diverses tentatives de valorisation des sous-produits de l'industrie des olives, en particulier celle des eaux de végétation<sup>(19)</sup>.

### 3-2) - Propriétés biologiques

A ce jour, les principales activités biologiques du hydroxytyrosol répertoriées sont les suivantes :

#### 3-2-1) - Activité Antioxydante :

L'activité antioxydante de l'hydroxytyrosol a été étudiée de manière exhaustive à l'aide de différentes techniques. Ces dernières ont été appliquées dans les systèmes abiotiques du modèle où sont générés l'espèce réactif d'oxygène (ROS) et les autres radicaux par une variété des agents.

Suite à une comparaison de son activité à celle des autres composés phénoliques, y compris le tyrosol, l'hydroxytyrosol a montré un caractère antioxydant de loin supérieur et plus efficace que celui des autres composés étudiés<sup>(20)</sup>.

### **3-2-2) - Capacité de cardioprotectrice :**

Les influences positives de l'huile d'olive sur la santé cardiovasculaire sont grandement attribuées à sa teneur élevée en acide gras monoinsaturé, mais également à la présence, dans sa composition, de composés phénoliques comme l'hydroxytyrosol. Dans ce sens, une étude d'EUROLIVE avait recruté 200 volontaires mâles sains, et les avait soumis à une consommation contrôlée d'huile d'olive. A la fin de l'étude, il a été prouvé que la consommation de trois variétés d'huile d'olive vierge avec un contenu phénolique différent avait permis une augmentation du cholestérol HDL et réduit les dégâts dus à l'oxydation lipidique et, d'une manière dose dépendante.<sup>(21)</sup>

### **3-2-3) - Activité anticancéreuse :**

Les études épidémiologiques menées à ce jour apportent la preuve que la consommation de l'huile d'olive peut réduire le risque du cancer de sein.<sup>(22)</sup> En outre, quelques études menées pour évaluer la capacité cytoprotectrice de l'huile d'olive ont montré réduction importante des dégâts oxydatifs de DNA après consommation de l'huile d'olive vierge. Cela a suggéré que ce produit, ou ses composants, possédait un bon profil de protection contre certains types de cancers.<sup>(23)</sup>

### **3-2-4) - Activité antimicrobienne**

L'hydroxytyrosol peut inhiber ou retarder le développement d'une gamme des bactéries, microfungi et les bactéries pathogéniques humaines.<sup>(24)</sup> Par conséquent, c'est une substance qui est à la fois antimicrobienne et antifongique.<sup>(25)</sup>

### **3-2-5) - Activité antidiabétique**

Le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline. Une hypothèse a été émise selon laquelle les antioxydants diététiques pourraient diminuer le risque du diabète. Par conséquent, les stratégies diététiques particulières peuvent contribuer à l'amélioration de l'homéostasie du glucose et à la prévention de cette maladie. Ainsi, on observe une relation inverse entre l'induction du diabète et l'application d'un régime alimentaire du type méditerranéen.<sup>(26)</sup> L'hydroxytyrosol est impliqué dans la protection contre le stress oxydatif. En effet, sa consommation par un rat au diabète induit diminue sensiblement le stress oxydatif et l'hyperglycémie<sup>(27,28)</sup>.

### **5.2.6- Activité neuroprotective**

L'importance de l'huile d'olive comme composant principal du régime méditerranéen à neutraliser les maladies dégénératives liées à l'âge comme les maladies d'Alzheimer et Parkinson a

**Références**

- [1] Frédérique, H. Composés hybrides resvératrol/ $\omega$ -alcanols: Modulateurs de l'activation microgliale et inducteurs de la différenciation cellulaire. Thesis, Université Louis Pasteur : Strasbourg, octobre 2006.
- [2] Braak, H.; Braak, E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.*, 1998. 53, 127.
- [3] Crismon, M. L. Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease. *Ann. Pharmacother.*, 1994. 6, 744.
- [4] Bryson, H. M.; Benfield, P. Donezepil., *Drugs Aging*, 1997. 10, 234.
- [5] Enz, A.; Amstutz, R.; Boddeke, H.; Gmelin, G.; Malanowski, J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease., *Prog. Brain Res.*, 1993. 98, 431.
- [6] Hirsch, C. Galantamine was effective in mild-to-moderate Alzheimer disease., *ACP J. Club*, 2006. 145, 50.
- [7] Haass, C.; Capell, A.; Citron, M.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J. The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein., *J. Biol. Chem.*, 1995. 270, 6186.
- [8] Dovey, H. F.; John, V.; Anderson, J. P.; Chen, L. Z.; Miller, F. D.; Audia, J. E. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain., *J. Neurochem.*, 2001. 76, 173.
- [9] Imahori, K.; Hoshi, M.; Ishiguro, K.; Uchida, T. Possible role of protein kinases in pathogenesis of Alzheimer's disease., *Neurobiol. Aging*, 1998. 19, 93.
- [10] Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandeventer, C.; Walker, S.; Woquilis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse., *Nature*, 1999. 400, 173.
- [11] DeMattos, R. B.; Bales, K. R.; Cummins, D. J.; Dodart, J. C.; Paul, S. M.; Holtzman, D. M. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001. 98, 8850.

- [12] Gilman, S.; Koller, M.; Black, R. S.; Jenkins, L.; Griffith, S. G.; Fox, N. C.; Eisner, L.; Kirby, L.; Rovira, M. B.; Forette, F.; Orgogozo, J. M. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in a interrupted trial., *Neurology*, **2005**, *64*, 1553.
- [13] Kris-Etherton PM, Bonamone A, et al Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*, **2002**; *113*:71S-88S.
- [14] Ribéreau-Gayon P Lzs composés phénoliques des végétaux .Dunod,Paris,**1968**.
- [15] Rodrigo, R.; Bosco, C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review., *Comp. Biochem. And Physiol.*, **2006**. Part C, *142*, 317.
- [16] Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents., *Med. Res. Rev.*, **2003**. *23*, 519.
- [17] Berr, C., Portet, F., Carriere, I., Akbaraly, T. N., Feart, C., Gourlet, V., et al. Olive oil and cognition: Results from the three-city study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*,**2009**, *28*(4), 357.
- [18] Scarmeas, N., Stern, Y., Tang, M. X., Mayeux, R., &Luchsinger.Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, J. A. **2006**, *59*(6),912.
- [19] Visioli et al."Waste waters from olive oil production are rich in natural antioxidant"*Experientia*,**1995**, *51*:32.
- [20] De Pinedo, A., Peñalver, P., & Morales, J. C. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure-activity relationship. *Food Chemistry*,**2007**,*103*(1), 55.
- [21] Covas, M. I., Nyyssonen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H. J., Kiesewetter, H., et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*,**2006**,*145*(5), 333.
- [22]Trichopoulou, A., &Dilis, V.Olive oil and longevity. *Molecular Nutrition and Food Research*,**2007**,*51*(10), 1275.
- [23]Machowetz, A., Poulsen, H. E., Gruendel, S., Weimann, A., Fitó, M., Marrugat, J., et al. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *The FASEB Journal*, **2007**,*21*(1), 45.
- [24] Fleming, H. P., Walter, W. M., &Etchells, J. L. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Appl. Microbiol.*, **1973**,*26*(5), 777.

- [25] Yangui, T., Dhoub, A., Rhouma, A., & Sayadi, S. Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chemistry*, **2009**, *117*(1), 1.
- [26] Pauwels, E. K. J. The Mediterranean diet, part III: Compounds, components and considerations in relation to the risk of type 2 diabetes. *Drugs Future*, **2009**, *34*(11), 903.
- [27] 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. *Chemico-Biological Interactions*, **2009**, *180*(3), 421.
- [28] Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agricultural and Food Chem.*, **2009**, *57*(19), 8798.
- [29] Berr, C., Portet, F., Carriere, I., Akbaraly, T. N., Feart, C., Gourlet, V., et al. Olive oil and cognition: Results from the three-city study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, **2009**, *28*(4), 357.
- [30] Scarmeas, N., Stern, Y., Tang, M. X., Mayeux, R., & Luchsinger. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, J. A. , **2006**, *59*(6), 912.
- [31] Wu, Y. T., Lin, L. C., & Tsai, T. H. Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatography A*, **2009**, *1216*(16), 3501.
- [32] Bazoti, F. N., Bergquist, J., Markides, K., & Tzarbopoulos, A. Noncovalent interaction between amyloid- $\beta$ -peptide (1-40) and oleuropein studied by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc., Mass Spectrometry*, **2006**, *17*(4), 568.
- [33] R. Capasso, A. Evidente, C. Visca, *Agrochimica* **1994**, *38*, 165;
- [34] R. Capasso, A. Evidente, S. Avolio, F. Solla, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47* 1745.
- [35] Bouzid, O. (Proc.) *Biochem.* **40**, **2005**, (1855-1862) EP – 1623960.

# Chapitre I

## Données bibliographiques

### A -Extraction de l'hydroxytyrosol

Notre travail est basé sur l'extraction et la synthèse de l'hydroxytyrosol, produit qui se retrouve sous forme libre dans les eaux de végétation d'olive.

Il existe plusieurs procédés basés qui permettent une extraction directe de l'hydroxytyrosol à partir de l'huile d'olive, de feuilles d'olivier, ou à partir des eaux de végétation provenant de la production de cette huile. La production de l'huile d'olive a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. Les méthodes d'extraction ont évolué mais, le processus d'extraction d'huile d'olive reste sensiblement le même.

#### 1)- Généralités sur la production de l'huile d'olive

L'huile d'olive vierge peut être considérée comme le jus de fruit d'olive directement consommable, obtenue par des procédés mécaniques et physiques et dans des conditions appropriées pour ne pas altérer l'huile. Pour cela l'industrie d'huile d'olive reste une activité économique importante de plusieurs pays, particulièrement, ceux du bassin méditerranéen. En revanche cette industrie génère des quantités importantes d'effluents liquides (margines), qui présentent un véritable souci environnemental.

#### 2)-Extraction d'huile d'olive

Le processus d'extraction d'huile d'olive inclut quatre opérations principales : les opérations préliminaires, le broyage, le malaxage et la séparation des phases liquides ; huile et eau. <sup>(1)</sup>

##### 2.1) -Opérations préliminaires

Elles consistent en un effeuillage des olives ; ce dernier se fait généralement par aspiration, suivie par le lavage afin d'éliminer les matières étrangères (saletés, moisissures...). Ces matières peuvent d'une part, altérer les propriétés organoleptiques de l'huile (couleur, odeur, goût) et d'autre part, user les broyeurs métalliques. <sup>(2)</sup>

##### 2.2)- Broyage

Cette opération consiste en la dilacération du tissu des olives pour libérer les gouttelettes d'huile contenues dans les vacuoles à l'intérieur des cellules d'olives. <sup>(2)</sup>

##### 2.3)- Malaxage

Il consiste en un broyage lent et continu de la pâte d'olive préalablement chauffée. Il a pour but de libérer le maximum d'huile en brisant les vacuoles qui sont restées intactes durant la phase précédente et d'amasser les gouttelettes d'huile en gouttes plus grosses. <sup>(2)</sup>

### 2.4) - Séparation des phases

Cette opération consiste à :

– **Séparer les phases liquides-solides** : Le broyage et le malaxage aboutissent à la formation d'une pâte qui contient de la matière solide et des fluides. La matière solide, appelée grignon, est formée de débris de noyaux, d'épiderme, de parois cellulaires... etc., alors que la partie fluide est composée d'huile et d'eau de végétation appelée margine.

– **Séparer les phases liquides-liquides** : La séparation de la phase aqueuse de la phase huileuse se fait essentiellement par simple décantation ou par centrifugation. Elle est basée sur la différence de densité entre l'huile d'olive et l'eau de végétation. <sup>(2)</sup>

### 3) - Les caractéristiques des margines d'olive

Les margines ont un aspect trouble, une coloration brun-rougeâtre à noire. Cette couleur est fonction de l'état de dégradation des composés phénoliques et des olives dont ils dérivent. <sup>(3)</sup> Leur odeur rappelle celle de l'huile d'olive, mais elle peut devenir gênante lors des phénomènes de rancissement ou de fermentation anaérobie. <sup>(4)</sup> Les composés fondamentaux des margines sont l'eau (83.2 %), les substances organiques (15 %) et les substances minérales (1.8 %). <sup>(5)</sup> Les variations des caractéristiques des margines résultent du type du procédé d'extraction de l'huile, de la qualité et de la variété des olives et de la conduite des opérations d'extraction. <sup>(6)</sup>

- **Les composés phénoliques**

La richesse des margines en polyphénols, de nature humique, <sup>(7)</sup> plus grande que celle de la phase huileuse, résulte des propriétés amphiphiles, mais essentiellement hydrophiles de ces composés. <sup>(8)</sup> L'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM) des extraits de différents échantillons de margine permet d'identifier une grande variété de composés phénoliques dont plusieurs ont été identifiés pour la première fois. <sup>(9)</sup> La composition phénolique des margines a été étudiée dans différents travaux récents. <sup>(10)</sup> Servili a montré que la composition phénolique est très différente de celle du fruit d'olive : ainsi, les margines contiennent une concentration élevée en hydroxytyrosol. <sup>(11)</sup> Cette fraction phénolique est caractérisée par une grande complexité, celle-ci a été démontrée par Bianco qui a identifié 20 biphenols en utilisant la HPLC-SM. <sup>(12)</sup> D'autres chercheurs ont identifié plusieurs composés phénoliques des margines entre autres, les dérivés suivants :

- de l'acide cinnamique : acide caféique, acide coumarique et acide férulique.
- des dérivés de l'acide benzoïque : acide protocatéchique, p-hydroxybenzoïque, acide gallique et acide vanillique.
- dérivés  $\beta$ -3,4-dihydroxyphényl éthanol : p-tyrosol et hydroxytyrosol. <sup>(13)</sup>

Parmi les composés phénoliques existant dans les margines on cite aussi l'acide syringique, la vanilline, l'acide phénylacétique et la catéchine. <sup>(14)</sup>

D'une manière générale, les caractéristiques physico-chimiques, et la teneur en polyphénols des margines dépendent essentiellement de :

- la variété et du degré de maturité des fruits.
- des conditions climatiques et de culture d'olivier.
- la période de moisson (récolte).
- le temps de conservation (durée de stockage avant l'extraction).
- techniques d'extraction utilisées (procédés technologiques). <sup>(15)</sup>

### 4) - Méthodes d'extraction de l'hydroxytyrosol

Les eaux de lavage du broyat et la phase aqueuse récupérées à l'issue du pressage sont appelées eaux de végétation ou encore des margines. Ces eaux représentent environ 60% du poids de l'olive, elles sont très riches en composés phénoliques antioxydants. Le composé phénolique antioxydant particulièrement recherché est l'hydroxytyrosol ; il est présent à hauteur de 0,1 à 2g/l dans les margines. <sup>(16)</sup> Parmi les procédés généralement utilisés pour l'extraction de l'hydroxytyrosol directement à partir des eaux de végétation on peut citer:

#### 4.1) - Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique (SFE) est une technique d'extraction qui sépare les composants d'un solide ou d'un liquide en utilisant un fluide supercritique comme dissolvant extrayant. La limite supercritique est employée pour décrire n'importe quel fluide qui existe à l'état liquide à une température et à une pression au-dessus de son point critique.

Une méthode d'obtention de concentrat riche en hydroxytyrosol, notamment à partir d'eaux de végétation comporte au moins deux variantes:

- ❖ Une extraction de l'hydroxytyrosol et d'autres composés bioactifs à l'aide d'un fluide supercritique.
- ❖ Une osmose inverse.

L'extraction par fluide supercritique nécessite l'utilisation de pressions très élevées (supérieures à 74 bars lors de l'utilisation de CO<sub>2</sub> comme fluide supercritique). C'est donc un procédé complexe et également coûteux à mettre en œuvre. En outre, l'osmose inverse est un procédé qui conduit à la concentration d'un extrait par élimination d'eau. L'osmose inverse en particulier ne permet pas un enrichissement sélectif en composés phénoliques de faible poids moléculaire. <sup>(16)</sup>

### 4.2)-Extraction avec un solvant organique

Un procédé d'obtention d'une composition riche en hydroxytyrosol à partir des eaux de végétation d'olive comprend les étapes suivantes:

- ❖ Production d'une eau de végétation à partir d'olives dénoyautées.
- ❖ Ajout d'une quantité suffisante d'acide, de préférence de l'acide citrique, pour atteindre un pH compris entre 1 et 5.
- ❖ Incubation des eaux de végétation acidifiées pendant au moins 2 mois afin que l'oleuropéine soit hydrolysée en hydroxytyrosol.

Le procédé peut en outre comprendre une étape d'extraction de l'hydroxytyrosol avec un solvant organique, ou une extraction par fluide supercritique. <sup>(16)</sup>

Bien qu'il conduise à des compositions enrichies en hydroxytyrosol, ce procédé, lorsqu'il met en œuvre une extraction par fluide supercritique, est trop coûteux pour être utilisé à l'échelle industrielle. En outre, l'extraction liquide-liquide utilise des solvants organiques toxiques qui ne sont pas compatibles avec une utilisation de l'extrait obtenu dans les industries cosmétiques ou alimentaires.

## B -Synthèse de l'hydroxytyrosol

Depuis plusieurs années les études se sont multipliées pour tenter de trouver un procédé moins coûteux de la purification d'hydroxytyrosol, mais ces tentatives se sont révélées dans l'ensemble sans grand succès. D'autres voies de production basées sur des méthodes chimiques incluent la synthèse d'hydroxytyrosol, il existe plusieurs protocoles indiquent cette synthèse parmi les il y a :

### 1) – Synthèse organique

Cette synthèse est réalisée en trois étapes, en partant du 3,4-dihydroxyphénylacétate de méthyle comme réactif de départ. La première étape consiste à protéger les deux fonctions hydroxyle vicinales du 3,4-dihydroxyphénylacétate de méthyle pour éviter leur participation au cours de la réaction. Cette protection est réalisée par l'orthofomiate de triméthyle et la réaction se déroule dans le benzène avec un reflux de 6h.

L'étape suivante consiste à faire une réduction de la fonction ester en alcool par l'hydrure de lithium aluminium ( $AlLiH_4$ ), en utilisant comme un solvant le tétrahydrofurane (THF). Et finalement, la dernière étape consiste à déprotéger les fonctions hydroxyles par le méthanol (MeOH). (Schéma 1).

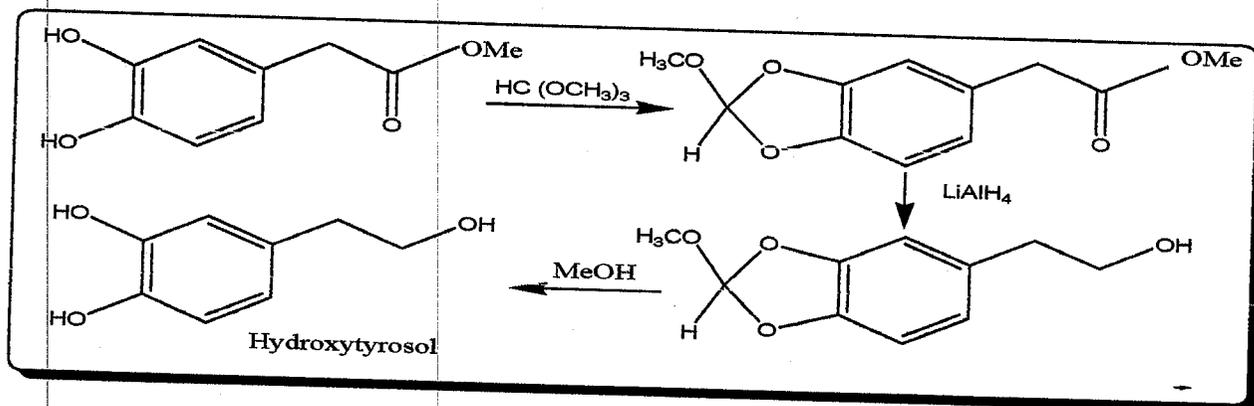


Schéma 1

## 2) – Synthèse enzymatique

Cette synthèse consiste à utiliser des enzymes et elle est très courte, le produit de départ est oleuropéine qui est dégradée en glucose et oleuropéine aglycone par un enzyme  $\beta$ -glucosidase. Ensuite, l'oleuropéine aglycone est dégradée en acide oléique et hydroxytyrosol à partir d'un estérase. (Schéma 2)

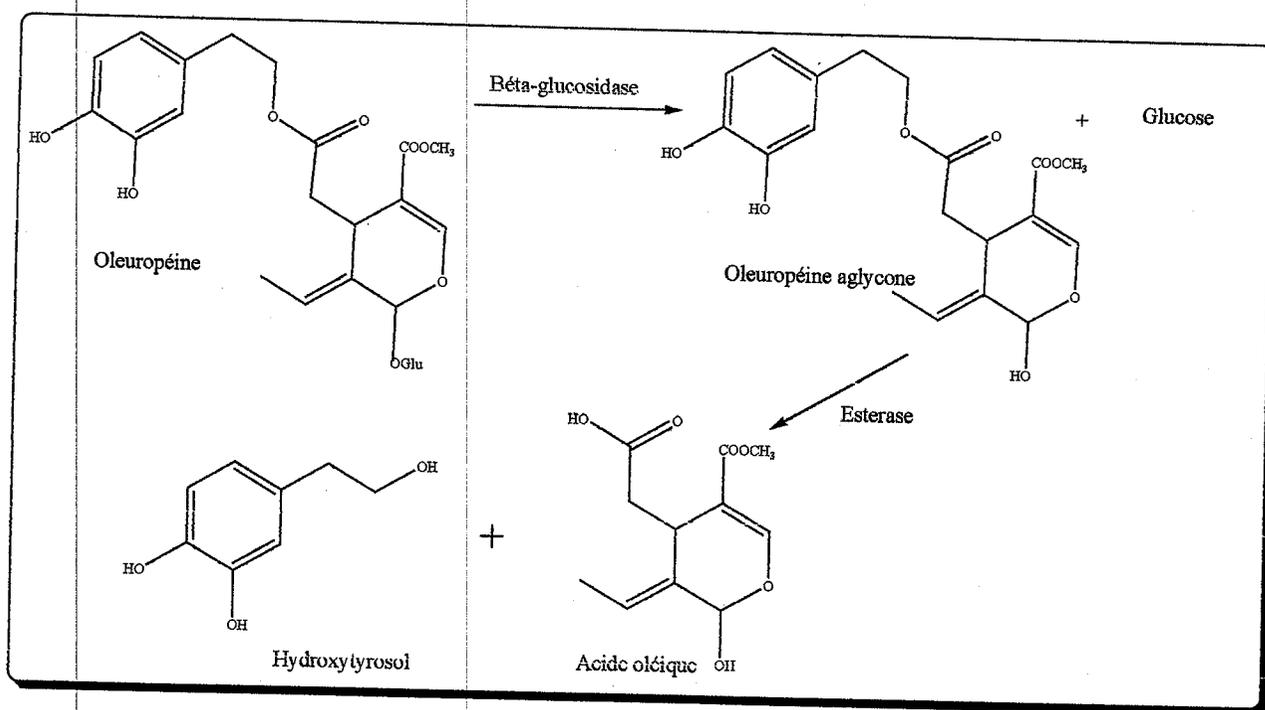


Schéma 2

### Références

- [1] Chimi, H. Sous produits de la transformation des olives: possibilités de valorisation et de traitement des margines. Cours international sur l'amélioration de la qualité de l'huile d'olive. Novembre 1997.
- [2] Halah, A. Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah : juin 2003.
- [3] Hamdi M. et Ellouz R. Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes. *Environmental Technology*, 1993, 14: 183.
- [4] Ranalli A. L'effluent des huiles d'olives : propositions en vue de son utilisation et son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. *Olivae*, 1991, 39, 18.
- [5] Fiestas J.A. et Borja R. Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*, 1992, 43, 101.
- [6] Mouncif M., Tamoh S., Faïd M. et Achkari B. A., 1993. A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill wastewater in Morocco. *Grasas y Aceites*, 1993, 44: 335.
- [7] Hamdi M., Garcia J-L. Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse nouveau doctorat, France, 1991.
- [8] Graille J. Lipides et corps gras alimentaires. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, 2003, pp : 86.
- [9] Belaid C., Kallel M., Elleuch B. Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive. *Déchets Sciences et Techniques*, 2002, 27, 30.
- [10] De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 2007, 104, 858.
- [11] Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A., Montedoro G. High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters and pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic Resonance characterization. *J. Am. Oil Chemists Soc.*, 1999, 76, 873.
- [12] Bianco A., Buiarelli F., Cartoni G., Coccioli F., Jasionowska R., Margherita P. Analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I. *Journal of Separation Science*, 2003, 26, 409.
- [13] Lasage-Meesen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J-C., Lorquin J., Delattre M. Simple phenolic content in olive oil residues as function of extraction systems. *Food Chem.*, 2001, 75: 501.
- [14] Noubih A., Abderrabba M., Provost E. Temperature and addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *J. Chem. Thermodynamics* 2007, 39, 297.

[15]Khoufi S., Aloui F., Sayadi S. Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Research*, 2006, 40, 2007.

[16]Urban,N..Dornier,M.;Pallet,D. ;Ranyes,M. ;Procédé d'extraction de composés polyphénols d'olive et de raisin. WO 094860,26 aout 2010.



# **Chapitre 2**

## **Extraction et synthèse de l'hydroxytyrosol**

### Travail effectué

#### A. Extraction de l'hydroxytyrosol en continue

L'extraction est parmi les méthodes les plus utilisées en analyse pour séparer les mélanges. Elle repose sur la différence d'affinité d'un soluté entre deux phases non-miscibles entre elles. Nous donnons ici le principe de l'extraction liquide-liquide qui permet de transférer un soluté d'une phase liquide à une autre phase liquide non-miscible à la première.

Lorsque les deux phases liquides sont en contact, il s'établit l'équilibre de partage, ce dernier est caractérisé par une constante thermodynamique  $K_p$  appelée le coefficient de partage <sup>(1)</sup>

$$K_p = [A_{org}] / [A_{aq}]$$

L'extraction sera d'autant plus efficace que le coefficient de partage est grand. On choisit, lorsque cela est possible, un solvant d'extraction dans lequel le soluté est très soluble.

Pour atteindre l'équilibre, on doit agiter de manière suffisante les deux phases non miscibles. Pour ces deux phases, l'utilisation d'une ampoule à décanter se traduit parfois par un coefficient de partage faible pour récupérer notre produit dans la phase organique. C'est pourquoi nous avons utilisé l'extraction en continue dans laquelle le solvant organique extrait progressivement le composé organique contenu dans la phase aqueuse par une répétition de cycles d'extraction.

Nous avons utilisé l'acétate d'éthyle qui est moins dense que la solution à extraire, à savoir l'eau de lavage d'huile d'olive. Les vapeurs du solvant d'extraction se condensent dans le réfrigérant et le liquide ainsi formé traverse la solution à extraire de bas en haut en se chargeant de soluté au passage. Quand le niveau de liquide dans le ballon d'extraction atteint le coude, le solvant d'extraction retourne dans le ballon d'ébullition où il est à nouveau vaporisé, et le cycle se répète de telle manière que le ballon de départ s'enrichit progressivement de soluté. Nous avons laissé cette extraction pendant 6h, puis on sèche le contenu de ballon sur sulfate de magnésium. Ensuite, on filtre puis on chasse le solvant à l'évaporateur rotatif.

Comme nous avons mentionné dans la partie théorique que la quantité de l'hydroxytyrosol dans les eaux de lavage est très faible et pour cela notre extraction n'a pas été retenue comme méthode rentable de récupération de l'hydroxytyrosol des eaux de végétation dont nous disposons.

### B. Synthèse organique de l'hydroxytyrosol

Comme nous l'avons signalé précédemment, notre synthèse de l'hydroxytyrosol est réalisée en cinq étapes en partant de la vanilline et l'acide bromoacétique. Les étapes suivies sont les suivantes:

- méthylation de la vanilline.
- estérification d'acide bromoacétique.
- condensation de *Darzens* (ester glycidique).
- réduction de la fonction aldéhyde.
- déprotection des fonctions hydroxyle.

Pour atteindre l'hydroxytyrosol à partir de la vanilline et de l'acide bromoacétique, il est nécessaire de protéger les fonctions réactives présentes dans les deux réactifs. Plusieurs groupements protecteurs existent et ils sont spécifiques pour chaque type de fonction ; de plus, chacun présente des avantages et des inconvénients relatifs aux conditions opératoires et aux réactions parasites qu'ils peuvent subir.

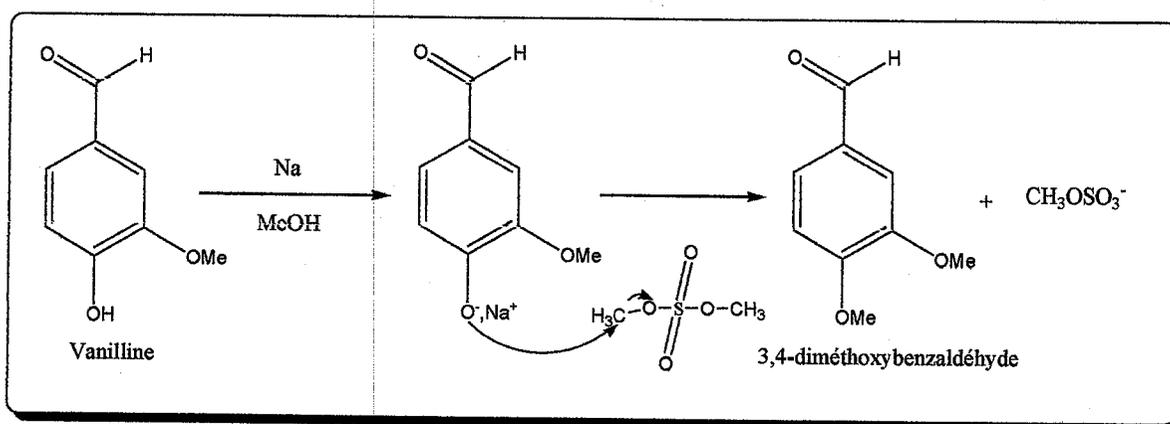
#### 1)-Méthylation de la vanilline

Le produit de départ de notre synthèse est la vanilline ; ce dernier possède une fonction hydroxyle que nous avons protégé avec le diméthylsulfate afin de la convertir en groupe méthoxy.

Nous avons suivi deux procédés pour la méthylation de la vanilline : pour le premier, nous avons utilisé le sodium dans le méthanol comme solvant afin de former le méthanolate de sodium, véritable base qui arrache les protons phénoliques pour obtenir l'anion phénate, susceptible d'attaquer le diméthylsulfate ( $\text{Me}_2\text{SO}_4$ ). Le produit obtenu, après extraction, lavage et évaporation des solvants a été isolé sous forme de cristaux en aiguilles jaunes avec un rendement de 61%.

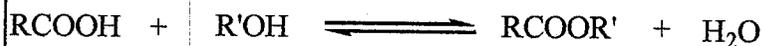
Pour le deuxième essai méthode, nous avons utilisé le KOH comme base et le diméthylsulfate comme agent alkylant. Le produit obtenu, après filtration sous vide a été isolé sous de cristaux en aiguilles jaunes avec un rendement de 28%. Cette différence entre les rendements, elle vient de la modification des modes opératoires.

### • Mécanisme de la formation de 3,4-diméthoxybenzaldéhyde



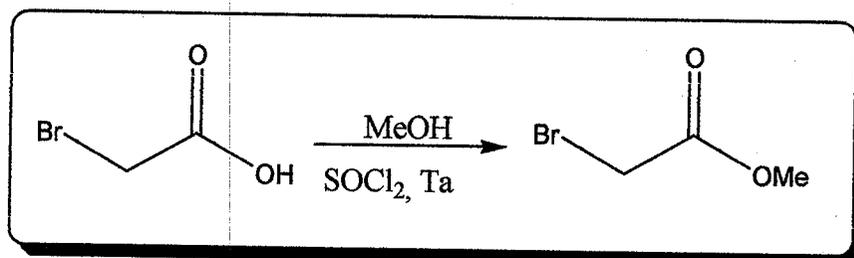
## 2)-Estérification de l'acide bromoacétique

Les acides carboxyliques sont généralement protégés sous forme d'esters. La réaction des acides sur les alcools primaires et secondaires ou estérification est une réaction équilibrée qui est l'inverse de la réaction d'hydrolyse. <sup>(2)</sup>



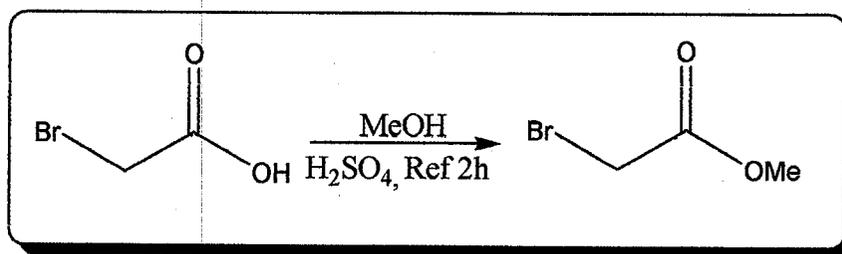
Il existe deux techniques permettant de mener la réaction à son terme, l'une consiste à utiliser un excès d'alcool, ce qui est faisable dans le cas des alcools simples et relativement peu coûteux, et l'autre consiste à faire avancer la réaction par élimination irréversible de l'eau, en utilisant par exemple la distillation azeotropique. <sup>(3)</sup>

Cette étape de notre synthèse consiste à estérifier l'acide bromoacétique sous forme ester méthylique. Nous avons procédé à trois essais : le premier consiste à préparer un chlorure d'acide, en utilisant le chlorure de thionyle, que nous additionnons goutte à goutte sur un mélange de l'acide et un large excès du méthanol sec à froid, puis on laisse le mélange sous l'agitation à température ambiante pendant 2h. (Essai 1)

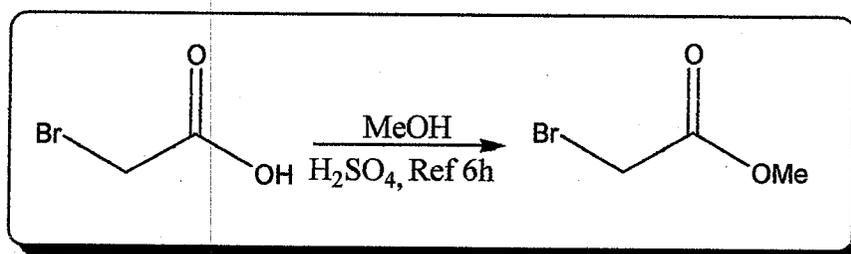


## Chapitre 2 : Extraction et synthèse de l'hydroxytyrosol

Quant au deuxième essai, il a consisté à introduire l'acide sulfurique dans une solution contenant l'acide bromoacétique et le méthanol sec en excès, suivi d'un reflux de 2h sous agitation. (Essai 2)



Finalement, le dernier essai semblable au deuxième, sauf qu'il en diffère par la quantité de catalyseur et la durée de reflux. (Essai 3)

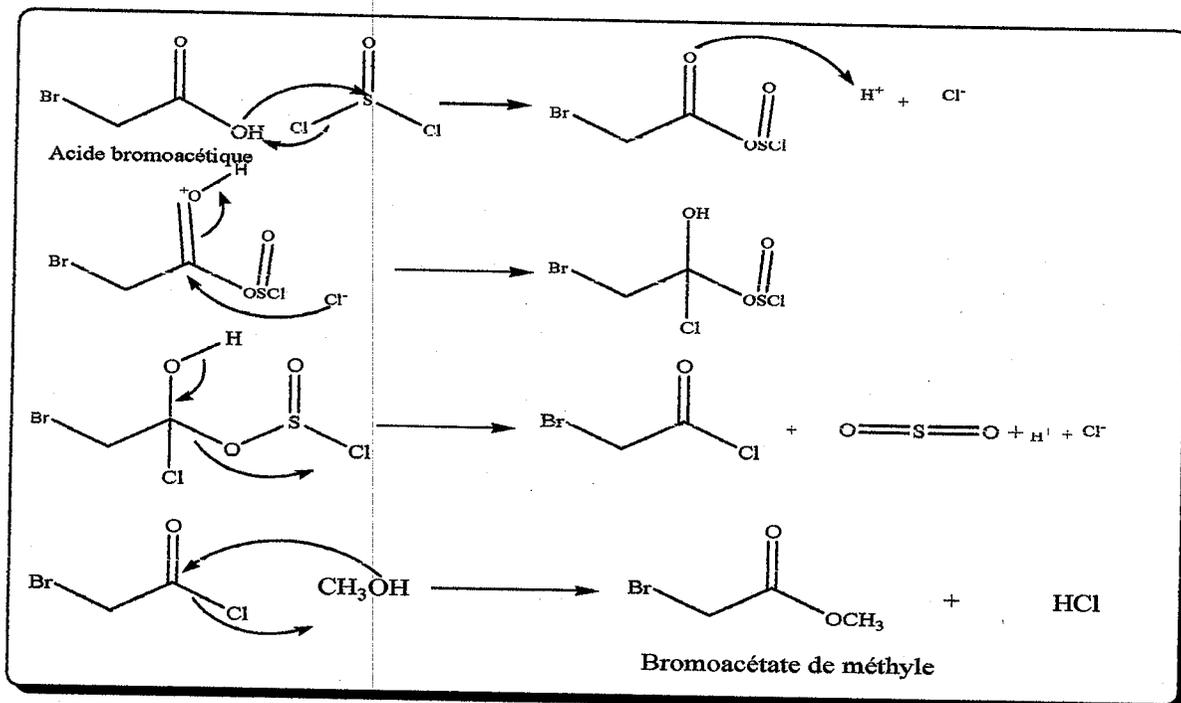


Le produit obtenu après extraction, lavage, évaporation des solvants a été isolé sous forme d'un liquide incolore qui n'est pas pur pour les essais 1 et 2, au contraire de celui obtenu dans l'essai 3 avec un rendement de 18,3%.

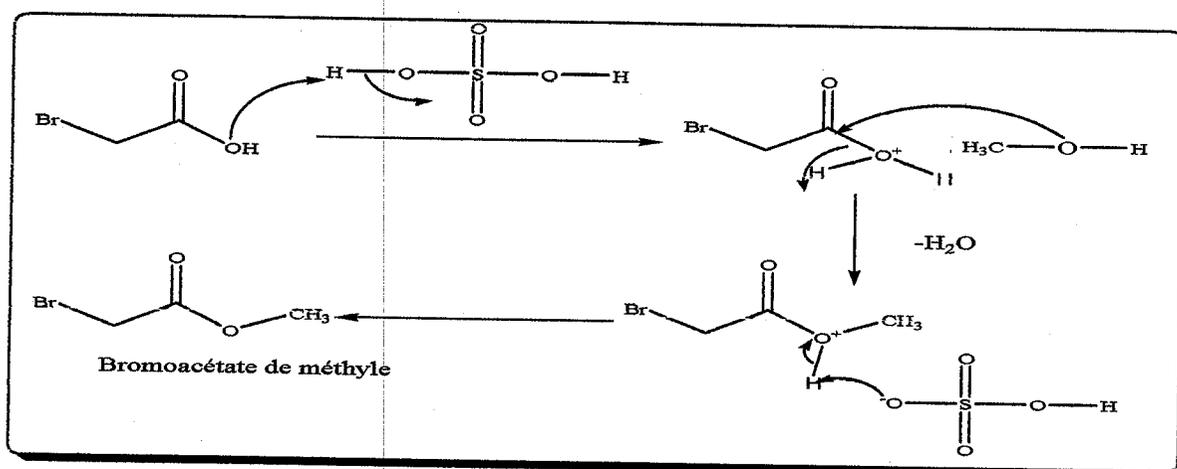
La modification des conditions opératoires influence considérablement le rendement ainsi que la pureté du produit final, cependant le produit pur a été obtenu en maintenant la réaction à reflux de 6h.

- **Mécanisme de la formation de bromoacétate de méthyle**

L'utilisation le chlorure de thionyle SOCl<sub>2</sub> dans le premier essai permet de convertir l'hydroxyle de l'acide en un bon groupe partant. Le mécanisme de l'estérification déroule comme suite :



Le mécanisme de l'estérification avec acide sulfurique est le suivant :



### 3)- Condensation de Darzens

En présence d'une base comme un alcoolate ou un amidure alcalin, les ester  $\alpha$ -halogénés se condensent avec les aldéhydes et les cétones pour former des esters glycidiques ( $\alpha, \beta$  époxyesters) dérivés de l'oxirane. La réaction de Darzens débute comme une réaction de Knoevenagel. Le carbanion formé effectue ensuite une réaction de substitution intramoléculaire S<sub>N</sub>2 qui conduit à une cyclisation en oxirane.

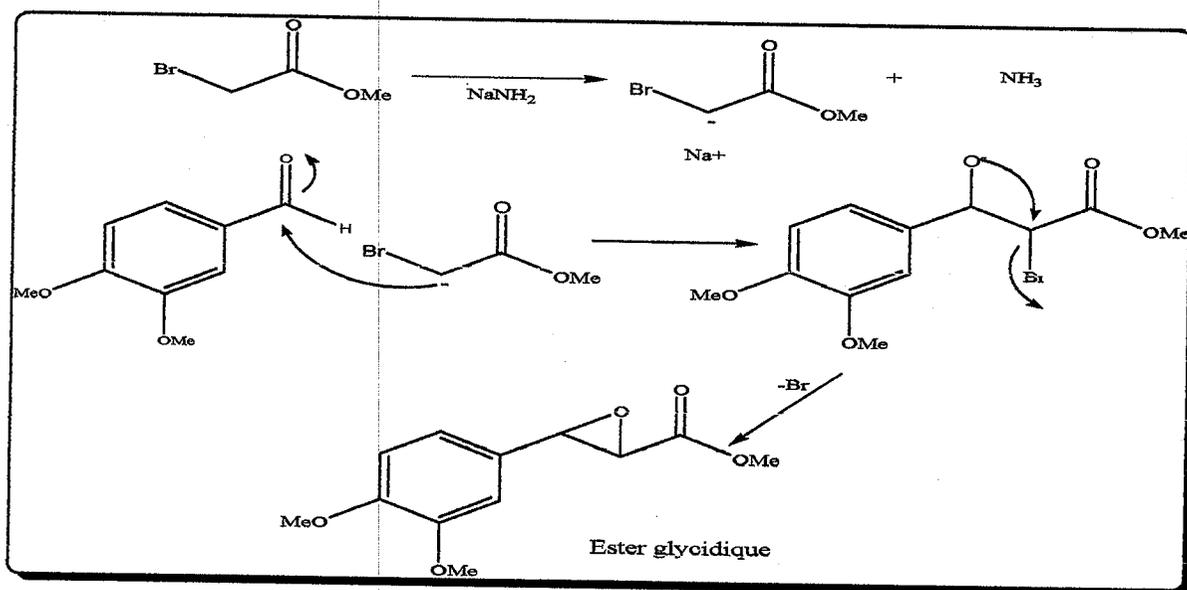
Les aldéhydes aromatiques réagissent bien tandis que les aldéhydes aliphatiques donnent de mauvais rendements. La réaction parasite souvent rencontrée est l'aldolisation des aldéhydes. L'hydrolyse alcaline des esters glycidiques conduit au sel de l'acide correspondant. S'il est chauffé en milieu acide, il se forme un aldéhyde suite à une décarboxylation et à une ouverture du cycle.<sup>(4)</sup>

## Chapitre 2 : Extraction et synthèse de l'hydroxytyrosol

Comme nous l'avons signalé, la réaction de *Darzens* est réalisée selon deux étapes. La première consiste en la formation d'ester glycidique, qui est accomplie par introduction du 3,4-diméthoxybenzaldéhyde dans le bromoacétate de méthyle en présence d'une base forte, dans notre cas, l'amidure de sodium. La réaction avec un refroidissement externe pendant une période de 2h sous agitation. Puis, le mélange est maintenu à température ambiante sous agitation pendant une nuit. Le produit obtenu après l'extraction, lavage, évaporation des solvants été isolé sous forme liquide huileux orange avec un rendement de 35%.

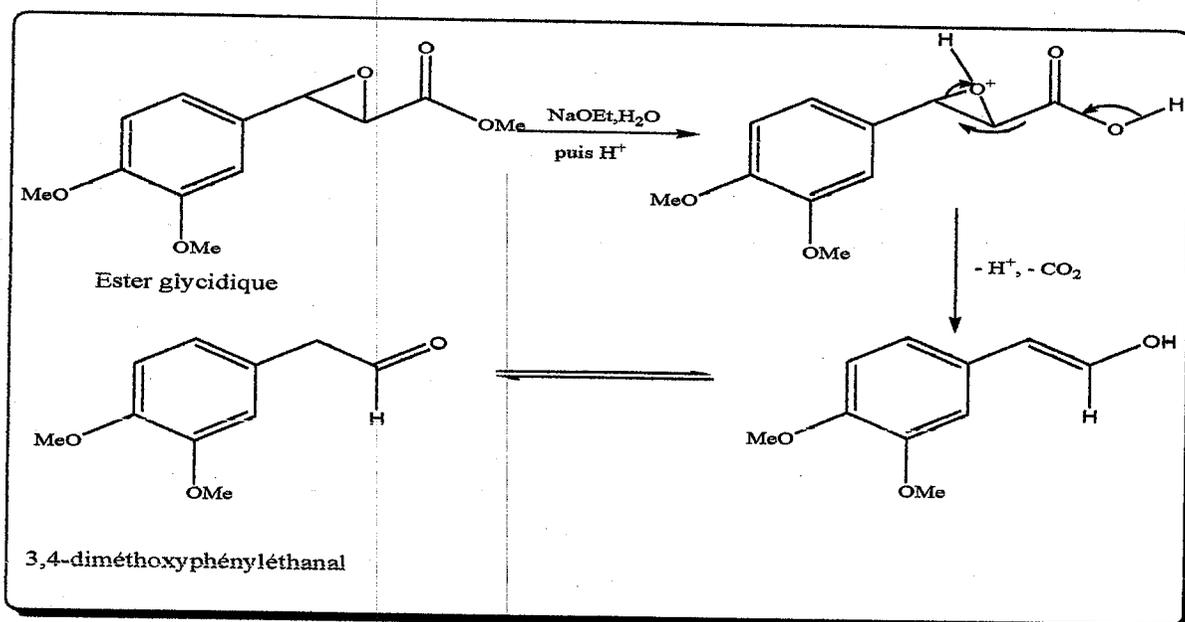
### • Mécanisme de la formation de l'ester glycidique

Le processus commence par la formation d'un carbanion sur le site halogéné de l'ester bromoacétique à l'aide d'une base forte ( $\text{NaNH}_2$ ). Ce carbanion est stabilisé sous forme d'énolate grâce à la fonction ester. Cette structure nucléophile attaque alors un carbonyle en formant une nouvelle liaison carbone-carbone. Ces deux étapes sont similaires à la réaction d'aldolisation. L'anion oxygéné effectue alors une  $\text{S}_\text{N}2$  intramoléculaire, l'halogène jouant le rôle de nucléofuge pour conduire ainsi l'époxyde.



La deuxième étape, c'est hydrolyse de l'ester glycidique, on introduit lentement l'ester glycidique dans un mélange de sodium-éthanol sous agitation puis on ajoute de l'eau. Ensuite, on acidifie le milieu par acide chlorhydrique pour obtenir un aldéhyde. Après l'extraction, lavage, séchage, et évaporation des solvants, on a obtenu un aldéhyde sous forme liquide huileux orange avec un rendement de 72%.

### • Mécanisme de la formation d'un aldéhyde



### 4)-Réduction de la fonction aldéhyde

La réduction des aldéhydes et les cétones simples (ne possédant pas d'autres fonctions dans leur structure) peut être effectuée par hydrogénation catalytique en présence d'un catalyseur (platine, palladium). Les alcools correspondants, primaires pour les aldéhydes, et secondaires pour les cétones, sont obtenus. <sup>(5)</sup>

La réduction catalytique par l'hydrogène présente un grand inconvénient lorsque la molécule contient des doubles ou triples liaisons carbone-carbone, car elles sont réduites avant les fonctions carbonyles. C'est pourquoi on lui préfère d'autres méthodes de réduction, chimiques. La plus importante est celle qui utilise l'hydrure de lithium aluminium (AlLiH<sub>4</sub>), dans un solvant aprotique anhydre, comme le THF, dans lequel il a la particularité d'être soluble. L'emploi de AlLiH<sub>4</sub> possède l'avantage d'être utilisable avec tous les aldéhydes et les cétones.

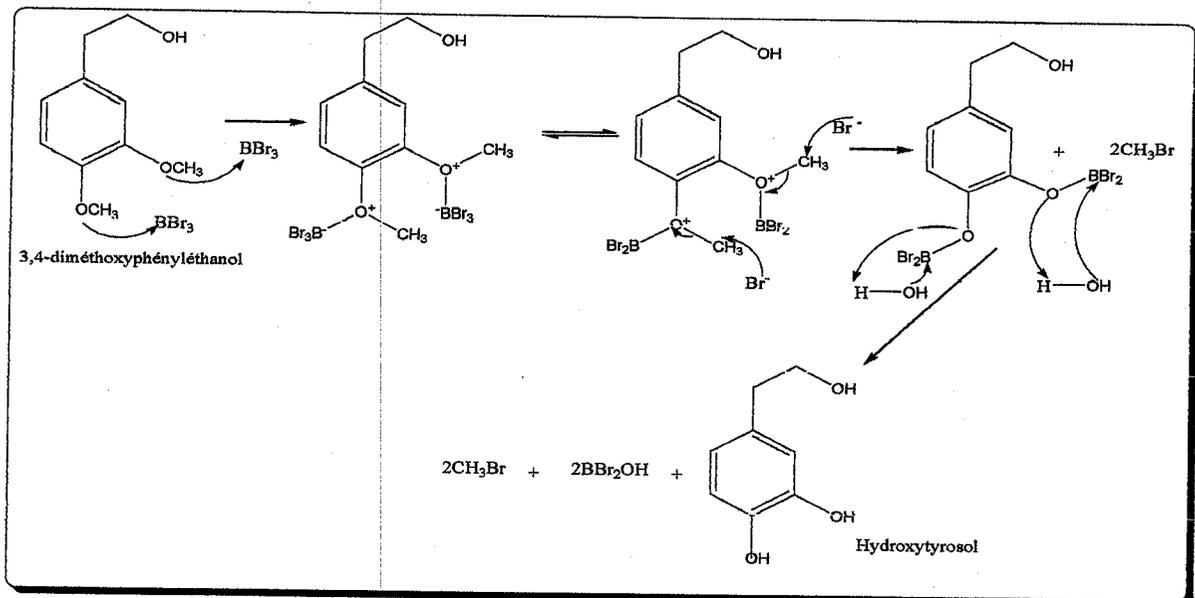
Un autre hydrure très utilisé est le borohydrure de sodium, NaBH<sub>4</sub>, qui a l'avantage sur AlLiH<sub>4</sub> de pouvoir être utilisé dans l'eau ou les alcools (solvants protiques polaires), ce qui augmente le nombre des molécules réductibles et en particulier celles insolubles dans l'éther ou THF, ne pouvant donc pas être réduites dans ces conditions par AlLiH<sub>4</sub>.

Cette étape de notre synthèse consiste à réduire la fonction aldéhyde. Pour cela, nous avons retenu deux méthodes. Dans la première, on a utilisé le AlLiH<sub>4</sub>, et le 3,4-diméthoxyphényléthanal est dissous dans le THF. Ensuite, on ajoute l'hydrure de lithium aluminium lentement avec un refroidissement externe, et on laisse notre solution sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Ensuite, on a hydrolysé précautionneusement le mélange avec une solution à 5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Le produit obtenu après l'extraction, lavage, évaporation des solvants a été isolé sous forme liquide huileux orange, et après analyse spectrale on a constaté que la réduction n'avait pas eu lieu. Cela était sans doute dû à la dégradation du réacteur par l'humidité ambiante dans les lieux de stockage.

## Chapitre 2 : Extraction et synthèse de l'hydroxytyrosol

L'éther méthylique est difficile à déprotéger ; on peut alors utiliser HBr ou BBr<sub>3</sub> comme agents de déprotection. Cette étape n'a pas été réalisée dans notre cas, car la quantité de 3,4-diméthoxyphényléthanol est très faible. Le mécanisme de la réaction est le suivant :



### Références

- [1] D. Skoog, D. West, J. Holler, « Chimie analytique », 7ème éd. De Boeck Université ,1997.
- [2] Milcent, R., Chimie organique : Stéréochimie, entités réactives et réactions ; EDP Science Editions ; 2007 ; p.327.
- [3] Milcent,R., Chimie organique : Stéréochimie, entités réactives et réactions ; EDP Science Editions ; 2007 ; p.328.
- [4] Milcent, R., Chimie organique : Stéréochimie, entités réactives et réactions ; EDP Science Editions ; 2007 ; p.577.
- [5] Milcent, R., Chimie organique : Stéréochimie, entités réactives et réactions ; EDP Science Editions ; 2007 ; p.523.

# Conclusion et perspectives

### Conclusion et perspectives

L'hydroxytyrosol est un composé phénolique simple, il appartient à la famille des ortho-diphénol, ce composé est un outil thérapeutique très prometteur pour le traitement des différentes maladies du système nerveux central à composantes dégénératives et inflammatoires. De plus, sa consommation participerait à l'effet bénéfique du régime crétois sur la santé humaine. Il est également connu pour ses propriétés antioxydantes, antibactériennes, antidiabétiques, antivirales, antifongiques, etc....

Ce mémoire avait deux objectifs, le premier consistait à extraire l'hydroxytyrosol à partir des eaux de lavage de l'huile d'olive. Nous avons considéré cette extraction comme une approche rapide pour récupérer cette substance qui, en elle-même, pouvait servir de principe actif naturel, et d'autre part, être utilisée comme matière première pour des développements futurs. Malheureusement, la solubilité préférentielle du composé dans l'eau n'a pas permis son extraction quantitative, même en recourant à une extraction continue prolongée. Néanmoins, il reste vrai que nous devons poursuivre nos travaux afin de trouver la meilleure technique d'extraction, qui contribuerait à réduire la pollution de l'environnement par les eaux de végétation.

Néanmoins, Il apparaît probable qu'à l'avenir la lipophilisation biocatalysée de composés phénoliques est indubitablement amenée à progresser d'autant qu'elle permet l'obtention de biomolécules hautement spécifiques, à forte valeur ajoutée et très souvent multifonctionnelles.

Le deuxième objectif revenait à synthétiser l'hydroxytyrosol à partir de deux réactifs commerciaux disponibles au laboratoire, à savoir la vanilline et l'acide bromoacétique. Cette voie nous a donné un résultat satisfaisant. Il faut dire qu'après optimisation de la synthèse et application des techniques de purification adéquates, il est possible de disposer de l'hydroxytyrosol de très bonne qualité. Ce dernier peut être engagé dans une série de transformations afin d'obtenir de nouveaux dérivés utiles dans la prévention et le traitement de divers types de cancer et des phénomènes inflammatoires.

# Partie expérimentale

### A. Généralités

- **Purification des solvants**

La plupart des réactions sont réalisées avec des réactifs et des solvants commerciaux. Ces derniers ont été utilisés anhydres et dégazés à l'azote. Les autres solvants ont été distillés ou séchés avant usage. Ainsi MeOH: distillé avec un traitement de Mg, I<sub>2</sub>, et conservé sur un tamis moléculaire (4A°). Le THF, le benzène sont conservés sur sodium effilé,

- **Point de fusion (mp)**

Les températures de fusion des solides recristallisés et des poudres amorphes sont mesurées sur un fusionomètre digital de la série IA9200 d'Electromètre en utilisant des tubes capillaires.

- **Spectroscopie Infrarouge (IR)**

Les spectres d'absorption infrarouge (IR) ont tous été effectuée au Centre de Mesures du laboratoire COSNA à l'aide d'un spectromètre « Mattson Genesis II FTIR » Tous les échantillons étaient traités soit en solution dans le chloroforme, ou sous forme de pastilles de KBr. Les principales fréquences d'absorption sont données en nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>).

## B. Extraction continue de l'hydroxytyrosol

On réalise un montage d'extraction liquide-liquide en continue (schéma1) qui consiste à faire passer hydroxytyrosol dissous dans une phase liquide (Eau de lavage d'huile d'olive), appelé le soluté, dans une seconde phase liquide non miscible, on utilise l'acétate d'éthyle et on laisse cette extraction se poursuivre pendant 6h. Puis on sèche le contenu de ballon sur sulfate de magnésium. Ensuite on filtre, puis on chasse l'acétate d'éthyle à l'évaporateur rotatif.

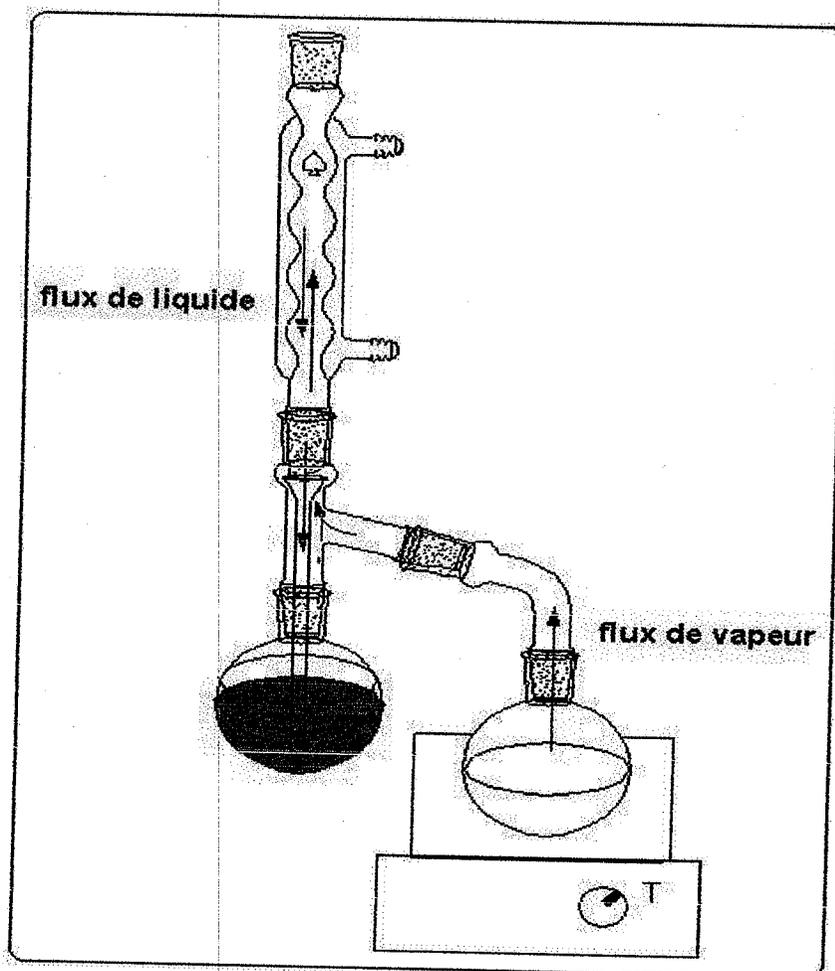


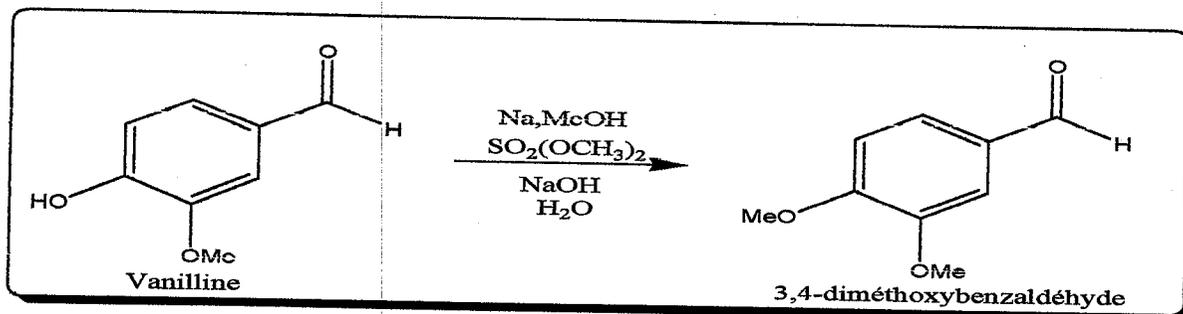
Schéma1

**Remarque :** pas de résultats notables à cause de la faible quantité de hydroxytyrosol dans l'eau de lavage d'huile

## Synthèse de l'hydroxytyrosol

## 1)-Méthoxylation de la vanilline

## Procédé A



## Mode opératoire

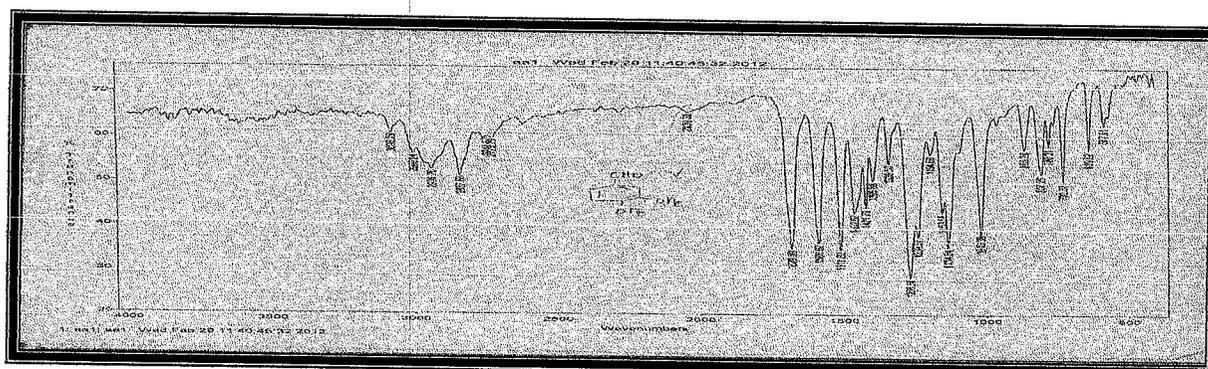
La vanilline commerciale (5g, 32.89mmol) est dissoute dans 34 mL de méthanol sec dans un bicol surmonté d'une ampoule à pression constante et d'un réfrigérant avec une garde à  $\text{CaCl}_2$ . On ajoute ensuite 1.17g du Na sous agitation. Le mélange est porté au reflux pendant 20mn, puis on ajoute lentement du  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  goutte à goutte dans la solution jusqu'à l'obtention d'un pH acide, et on laisse la solution refroidir. Ensuite, on ajoute une solution aqueuse de NaOH à 30% jusqu'à l'obtention pH basique, puis on ajoute de l'eau distillée et l'éther, on prend la partie étherée par décantation. On extrait deux fois la phase aqueuse avec l'éther et on réunit les phases organiques. On traite la phase organique avec une solution saturée de NaCl, puis on sèche sur sulfate de magnésium. Ensuite, on filtre puis on chasse l'éther à l'évaporateur rotatif.

## Caractéristiques physico-chimiques

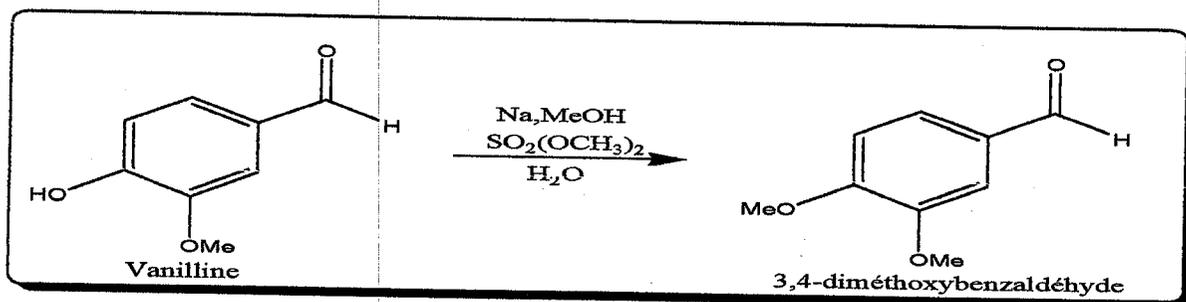
Produit	Masse molaire (g/mol)	Rendement(%)	Aspect	T <sub>fus</sub> (°C)
3,4-diméthoxy-benzaldéhyde	166,18	61	cristal en aiguille jaune	45

## Données spectrales

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1679, 69(C=O); 1462, 62-1586, 02(C=C aro); 2837, 63-2741, 57(C-H aldéhyde).



**Procédé B**



**Mode opératoire**

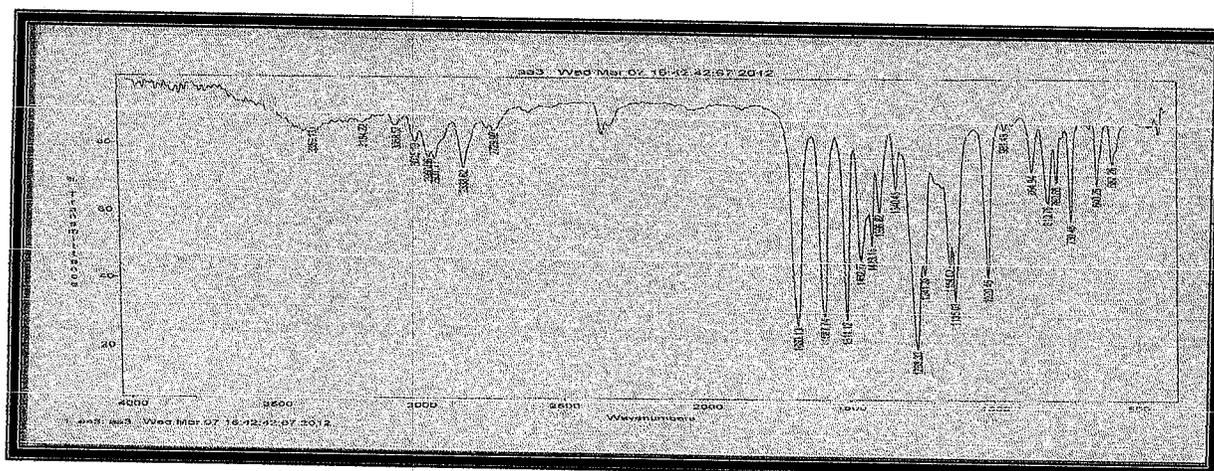
On place dans un bicol, équipé d'un agitateur et une ampoule à pression constante et d'un réfrigérant avec une garde à CaCl<sub>2</sub>, 50 mL du méthanol sec et 1.89g du Na, et on ajoute 5g (32.89mmol) de vanilline commerciale. On chauffe au reflux pendant 20mn, puis on ajoute lentement Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> goutte à goutte dans la solution, on laisse la solution refroidir. Ensuite, on ajoute de l'eau distillée et l'éther, on sépare la partie étherée par décantation. On extrait deux fois la phase aqueuse avec 30mL d'éther et on réunit les phases organiques. On traite la phase organique avec une solution saturée de NaCl, puis on sèche sur sulfate de magnésium. Ensuite, On filtre puis on chasse l'éther à l'évaporateur rotatif.

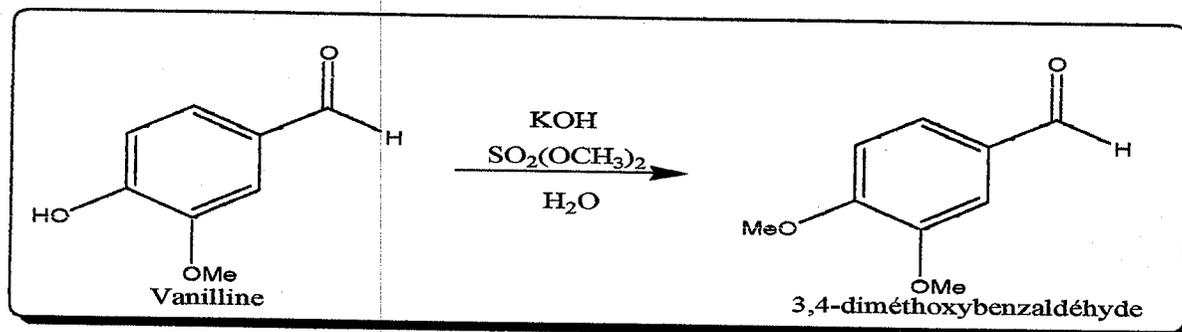
**Caractéristiques physico-chimiques**

Produit	Masse molaire (g/mol)	Rendement(%)	Aspect	T <sub>fus</sub> (°C)
3,4-diméthoxybenzaldéhyde	166,18	28	crystal en aiguille jaune	42

**Données spectrales**

IR (cm<sup>-1</sup>):1680, 13(C=O); 1462, 77-1587, 74(C=C aro); 2729, 63-2838, 62(C-H aldéhyde).



**Procédé C****Mode opératoire**

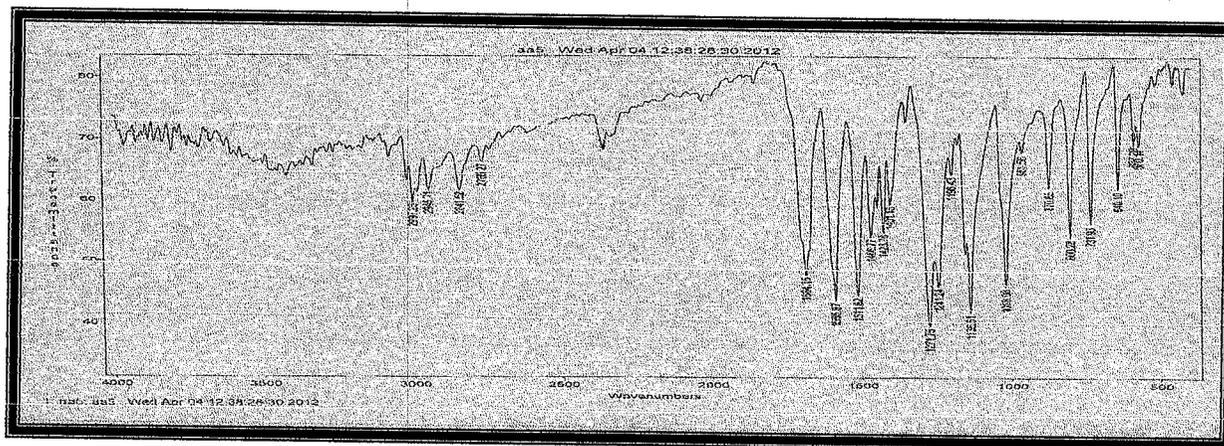
Dans un bicol muni d'un réfrigérant à reflux, une agitation magnétique et deux ampoules à pression constante, dont l'une est placée au dessus du réfrigérant à reflux, on introduit 5g (32.89mmol) de vanilline commerciale. On fait fondre la vanilline sur bain d'eau et on agite vigoureusement. On introduit dans l'ampoule qui se trouve sur le ballon 3g de KOH dissous dans 5mL d'eau et dans l'autre 3.24mL (34.2m mol) de  $\text{Me}_2\text{SO}_4$ . On ajoute la solution de KOH à une vitesse de 2 gouttes par seconde, puis 20 secondes après, on ajoute le  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  au même rythme. A ce point, on arrête le chauffage lorsque l'addition de tous les réactifs est finie, on verse le mélange jaune dans petit béccher et on laisse reposer toute une nuit. Ensuite, on ajoute de l'eau glacée et on filtre la masse solide et on la sécher dans un dessiccateur à vide. Afin d'éviter l'oxydation de l'aldéhyde à l'air, on le garde dans un flacon bien fermé sous atmosphère d'azote.

**Caractéristiques physico-chimiques**

Produit	Masse molaire (g/mol)	Rendement(%)	Aspect	T <sub>fus</sub> (°C)
3,4-diméthoxybenzaldéhyde	166,18	28	cristal en aiguille jaune	44

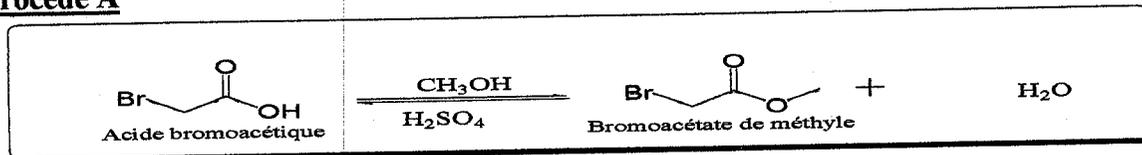
**Données spectrales**

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1684, 15(C=O); 1466, 77-1585, 87(C=C aro); 2765, 27,-2841, 52(C-H aldéhyde).



## 2)-Esterification d'acide bromoacétique

### Procédé A



### Mode opératoire

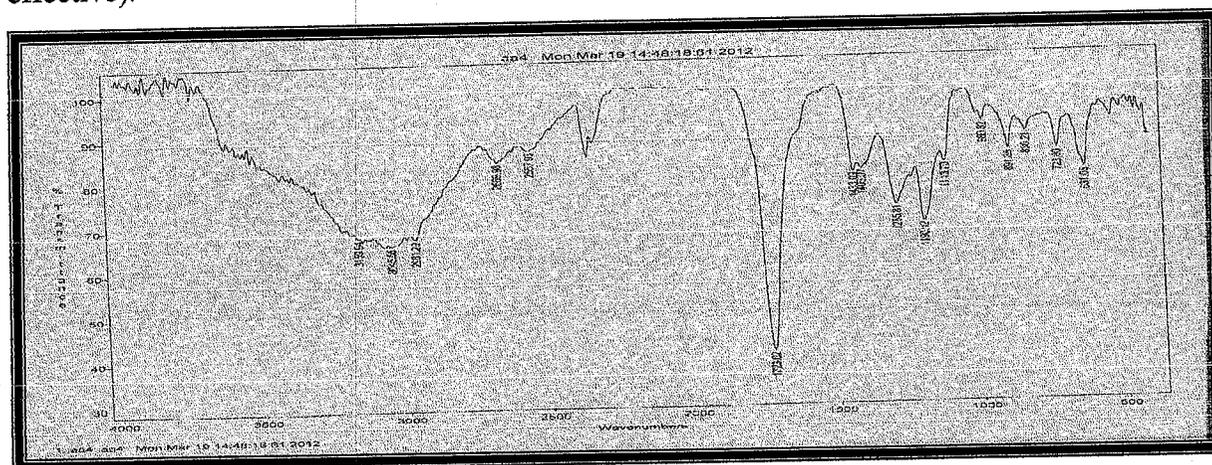
On place dans un bicol, équipé d'un agitateur et d'un réfrigérant avec une garde à  $\text{CaCl}_2$ , 10g (71.99mmol) d'acide bromoacétique et 20.5 mL du méthanol sec, on laisse bien réagir. Entre temps, on prépare un mélange acide sulfurique - méthanol (1 :1), puis on laisse refroidir. Ensuite, on ajoute notre mélange à la première solution, et on chauffe au reflux pendant 1h. Puis, on évapore l'excès du méthanol. Ensuite, on ajoute de l'eau distillée glacée et l'éther, on récupère la phase étherée par décantation. On extrait deux fois la phase aqueuse avec 30 mL d'éther et on réunit les phases organiques. On traite la phase organique avec une solution de bicarbonate de sodium, puis avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$ , et on sèche sur sulfate de magnésium. Ensuite, on filtre puis on chasse l'éther à l'évaporateur rotatif.

### Caractéristiques physico-chimiques

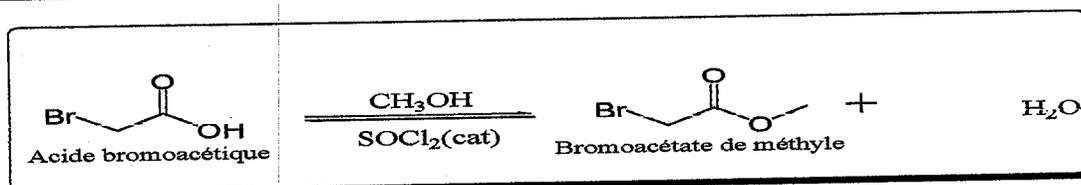
Produit	Masse molaire (g/mol)	Rendement(%)	Aspect
Bromoacétate de méthyle	152.9	45	Liquide incolore

### Données spectrales

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1723, 02(C=O acide); 631, 05-723, 80(C-Br), 2961.29-3159.94 (O-H) (réaction pas effective).



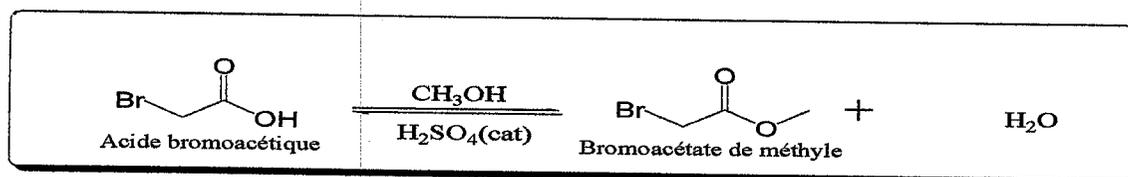
### Procédé B



**Mode opératoire**

On place dans un bicol, équipé d'un agitateur et d'un réfrigérant avec une garde à  $\text{CaCl}_2$ , 10g (71.99mmol) de l'acide bromoacétique et 96 mL du méthanol, on le laisse bien réagir. Ensuite, on additionne goutte à goutte le chlorure de thionyle à l'aide d'un refroidissement externe, puis on laisse le mélange sous agitation pendant 2h. Ensuite, on évapore l'excès du méthanol puis on ajoute de l'éther à notre solution, on recueille la partie étherée par décantation. On extrait deux fois la phase aqueuse avec 30 mL d'éther et on réunit les phases organiques. On traite la phase organique avec une solution de bicarbonate de sodium, puis avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$ , et on sèche sur sulfate de magnésium. Ensuite, on filtre puis on chasse l'éther à l'évaporateur rotatif.

**Procédé C**



**Mode opératoire**

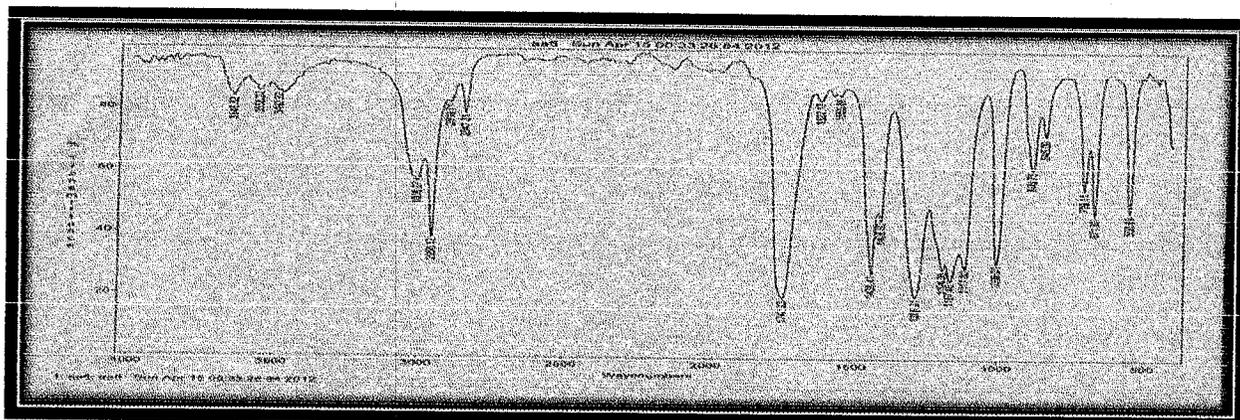
On place dans un bicol, équipé d'un agitateur et d'un réfrigérant avec une garde à  $\text{CaCl}_2$ , 30g (0,216mol) de l'acide bromoacétique et 50 mL du méthanol et 5 mL de l'acide sulfurique, on chauffe au reflux pendant 6h, puis on évapore l'excès du méthanol. Ensuite ajoute à notre solution l'éther, on prend la partie étherée par décantation. On extrait deux fois la phase aqueuse avec 30 mL d'éther et on réunit les phases organiques. On traite la phase organique avec une solution de bicarbonate de sodium, puis avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$ , et on sèche sur sulfate de magnésium. Ensuite, On filtre puis on chasse l'éther à l'évaporateur rotatif.

**Caractéristiques physico-chimiques**

Produit	Masse molaire (g/mol)	Rendement(%)	Aspect
Bromoacétate de méthyle	152,9	20	liquide incolore

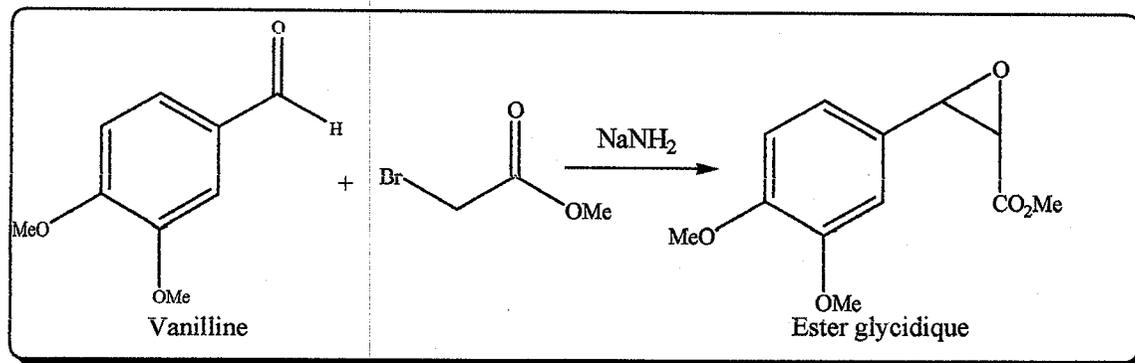
**Données spectacles**

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1742, 23(C=O ester); 671, 05-709, 11(C-Br); 1008, 01 (C-O)



### 3) –Condensation de Darzens

- Synthèse de l'ester glycidique



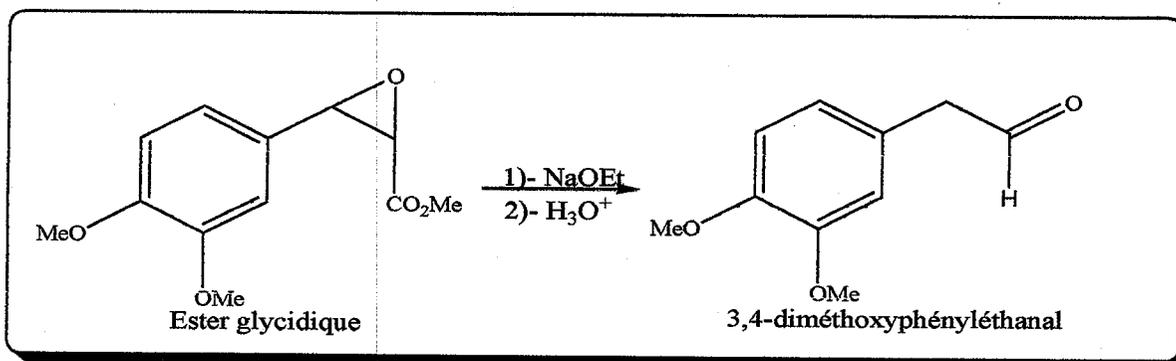
#### Mode opératoire

On place dans un bicol, équipé d'un agitateur et d'une garde à CaCl<sub>2</sub> et sous courant d'azote, 5,43g (32,7 mmol) de 3,4-diméthoxybenzaldéhyde et 5g d'acide bromoacétique et 20 mL de benzène. Puis, on additionne 1,53g (39,24 mmol) d'amidure de sodium pendant une période de 2h, et on laisse l'agitation toute la nuit à température ambiante. Ensuite, on ajoute de l'eau glacée à notre solution puis le benzène, et on sépare la phase organique puis on extrait deux fois la phase aqueuse avec 6 mL de benzène et on réunit les phases organiques. On traite la phase organique avec un mélange d'eau-acide acétique, puis avec une solution saturée de NaCl, et on sèche sur sulfate de magnésium. Ensuite, on filtre puis on chasse le benzène à l'évaporateur rotatif.

#### Caractéristiques physico-chimiques

Produit	Masse molaire (g/mol)	Rendement(%)	Aspect
Ester glycidique	238	35	Huile orange

- Synthèse de 3,4-diméthoxyphénylétanal



#### Mode opératoire

Le sodium (0,3g, 13,04mmol) est dissous dans 10 mL d'éthanol dans un bicol sec puis on ajoute de l'ester glycidique (2,71g, 11,4 mmol) lentement goutte à goutte sous agitation. Ensuite, on ajoute de l'eau et l'acide chlorhydrique dilué, et on chauffe le mélange doucement

## Partie expérimentale

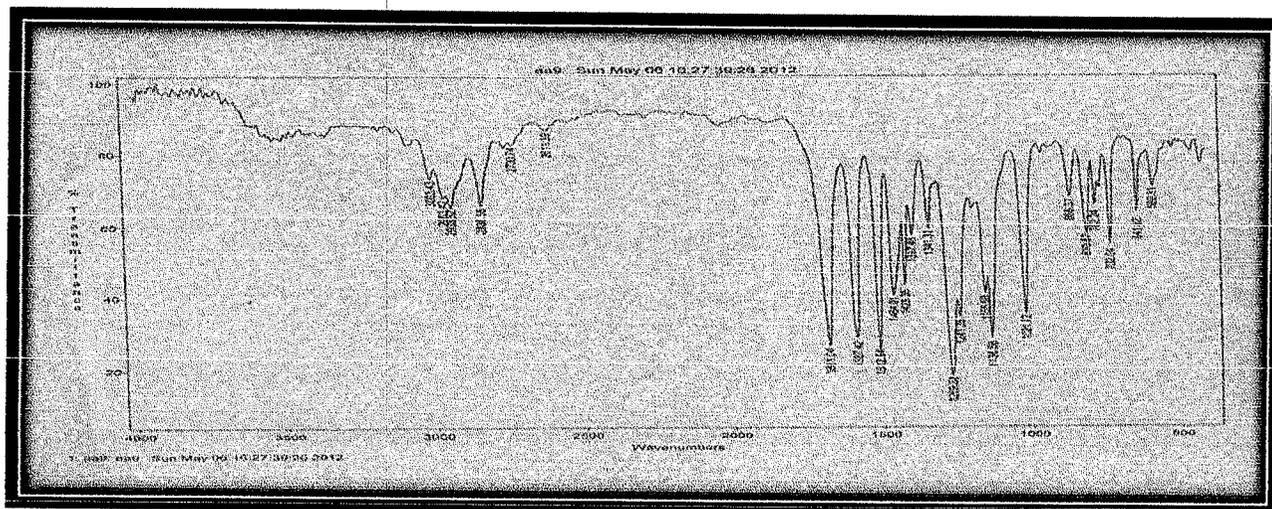
pendant 90 min. Après on refroidit la solution et on extrait avec le benzène maximum 2 fois et on réunit les phases organiques. On traite la phase organique par l'eau distillée, et on sèche sur sulfate de magnésium. Ensuite, On filtre puis on chasse le benzène à l'évaporateur rotatif.

### Caractéristiques physico-chimiques

Produit	Masse molaire (g/mol)	Rendement(%)	Aspect
3,4-diméthoxyphényléthanal	180	72	Huile orange

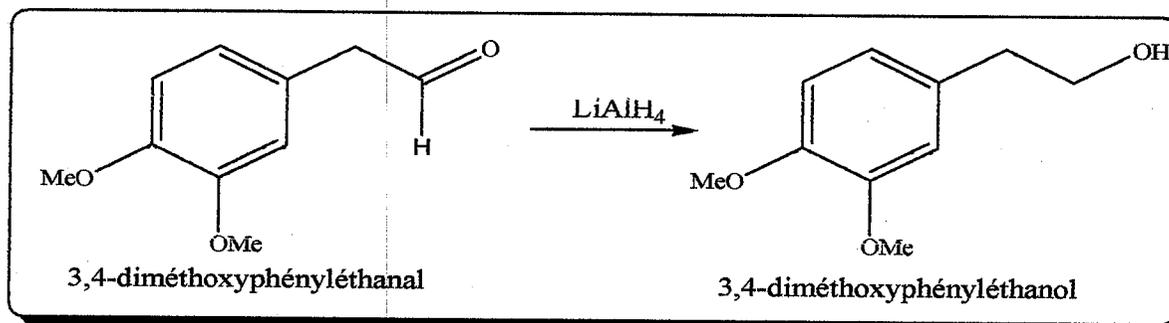
### Données spectacles

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1681, 04 (C=O aldéhyde); 1464, 01-1587, 42(C=C aro); 2730, 74, -2838, 58(C-H aldéhyde).



## 4)-Réduction de la fonction aldéhyde

### Procédé A



### Mode opératoire

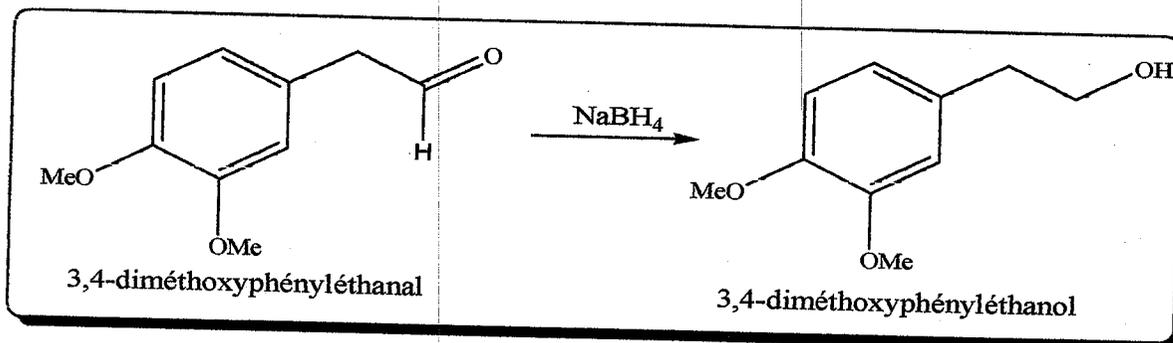
Le 3,4-diméthoxyphényléthanal (1,3 g, 7,2 mmol) est dissous dans 10 mL THF dans un bicol sec puis on a ajouté l'hydrure de lithium aluminium (1,04g, 27,51 mmol) lentement avec un refroidissement externe et on laisse notre solution sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Ensuite, on a acidifié le milieu par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 5%, et on extrait le contenu du ballon avec l'éther maximum 2 fois et on réunit les phases organiques. On traite la phase

## Partie expérimentale

organique avec une solution de bicarbonate de sodium, puis avec une solution saturée de NaCl, et on sèche sur sulfate de magnésium. Ensuite, on filtre puis on chasse les solvants à l'évaporateur rotatif.

**Remarque :** La réduction n'a pas marché

### Procédé B



### Mode opératoire

Le bromohydrure de sodium (0,64g, 16,67mmol) est dissous dans 10 mL THF dans un bicol sec puis on a ajouté de 3,4-diméthoxyphényléthanal (0,5g, 2,78 mmol) lentement goutte à goutte et on laisse notre solution sous agitation pendant 4 jours à température ambiante. Ensuite, on a acidifié le milieu par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 5%, et on extrait le contenu du ballon avec THF maximum 2 fois et on réunit les phases organiques. On traite la phase organique avec une solution de bicarbonate de sodium, puis avec une solution saturée de NaCl, et on sèche sur sulfate de magnésium. Ensuite, on filtre puis on chasse le THF à l'évaporateur rotatif.

### Caractéristiques physico-chimiques

Produit	Masse molaire (g/mol)	Rendement(%)	Aspect
3,4-diméthoxyphényléthanol	182	46	Huile jaune

### Données spectrales

IR (cm<sup>-1</sup>): 3200-3550 (O-H); 1462, 43-1589, 87(C=C aro).

