

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi - Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie – Microbiologie



THESE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat
En Sciences Biologiques
Option : Biochimie appliquée et biotechnologies

THEME :

***Extraction, caractérisation des polysaccharides et des polyphénols
issus des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides à
visée alimentaire***

Présentée par : Malika NADOUR

Soutenue publiquement le 17 octobre 2015

Devant le jury :

Président :

M^r Tahar AMROUCHE

Maître de Conférences Classe A à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Directeur de thèse :

M^{me} Farida MOULTI-MATI

Professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Examineurs :

M^r Djebbar ATMANI

Professeur à l'université Abderrahmane Mira de Béjaia

M^{me} Chahrazed BOUTEKEDJIRET

Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger

Invité : M^r Philippe MICHAUD

Professeur à l'université Blaise Pascal de Clermont Ferrand, France

Remerciements

Au terme de ce travail, c'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet de thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à ma directrice de thèse, Professeur Farida MOULTI-MATI de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour m'avoir proposé de faire une thèse sous sa direction, pour son amabilité, sa gentillesse, pour son soutien continu et pour avoir cru en moi. Je la remercie profondément pour ses conseils qu'elle m'a prodigués, ses encouragements et pour son encadrement et sa disponibilité pour m'écouter. Je lui dis que c'était un plaisir de travailler avec vous depuis la graduation jusqu'à cette importante étape de préparation de ma thèse.

J'adresse ma plus grande gratitude et mes plus chaleureux remerciements au Professeur Philippe MICHAUD, de l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand (France), pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir permis de mener mon travail expérimental dans les meilleures conditions. Je lui suis très reconnaissante pour son soutien, pour ses conseils et pour sa disponibilité. Je le remercie pour son encadrement et pour m'avoir fait découvrir le monde des polysaccharides. Je le remercie également pour ses nombreuses relectures et corrections de cette thèse. Sa rigueur m'a permis d'évoluer et ses conseils avisés ont toujours été très constructifs et ont participé grandement à ma formation. Je tiens également à le remercier d'avoir toujours été présent pour faciliter mon installation dans les meilleures conditions au cours de mes séjours à Clermont-Ferrand, malgré ses préoccupations.

J'adresse tous mes remerciements au professeur Abderrahmane MATI, Directeur du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de mes expérimentations. Je le remercie vivement pour tout son soutien, ses encouragements pour progresser dans nos recherches et pour tous ses précieux conseils.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail. Merci à Mr Tahar AMROUCHE, Maître de Conférences Classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je tiens à remercier le Professeur Djebbar ATMANI de l'Université Abderrahmane MIRA de Béjaïa pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je remercie également le Professeur Chahrazad BOUTEKDJIRET de l'Ecole Nationale Polytechnique (Alger) pour l'honneur qu'elle me fait d'être dans mon jury de thèse.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes avec lesquelles j'ai collaboré au cours de cette thèse, sous la responsabilité du professeur Philippe MICHAUD, et en particulier à Madame Céline LAROCHE, Maître de Conférences HDR à l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 de l'Université Blaise Pascal, je la remercie pour son aide et ses orientations. Mes remerciements les plus sincères s'adressent aussi à Guillaume PIERRE, Maître de Conférences à l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 de l'Université Blaise Pascal, pour m'avoir initiée à l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse et pour tout son soutien et son aide. Je remercie également Cédric DELATTRE, Maître de Conférences à l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 de l'Université Blaise Pascal, pour son aide apportée dans la réalisation des protocoles de l'étude des activités

antioxydantes des polysaccharides. J'exprime mes remerciements également à Monsieur Emmanuel PETIT, Maître de Conférences HDR du Laboratoire BIOPI de l'Université de Picardie Jules Verne pour la réalisation des analyses Sec-Malls.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 de l'Université Blaise Pascal en particulier Madame Christine GARDARIN, technicienne de laboratoire, pour son aide précieuse chaque jour et pour m'avoir initiée au fonctionnement de plusieurs instruments de laboratoire notamment la Dionex. Je la remercie également d'être très compréhensive au fait que mon séjour en France chaque année était court, et donc elle programmait en priorité mes analyses.

Mes remerciements vont également à Mr Boussad METNA, enseignant à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté dans l'analyse statistique de mes résultats.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire LABAB. Des remerciements particuliers et chaleureux s'adressent à mes amies, Madame Zennia-Si-Ahmed Saliha (Sara) et Samia Dermeche. Je leur dis infiniment merci pour votre soutien, votre compréhension et votre précieuse aide. Je vous suis très reconnaissante mes amies.

Enfin, je remercie ma famille pour son soutien. Je remercie vivement mon époux pour son soutien quotidien indéfectible et ses encouragements. Je le remercie pour sa compréhension, sa patience et de m'avoir toujours épaulée pendant toutes ces années de thèse. Merci de m'avoir fait confiance et cru en moi.

J'adresse mes remerciements particuliers à mes parents pour leur amour et leur soutien inconditionnel tout au long de cette thèse et durant toutes mes années d'études. Leurs encouragements étaient pour moi une force qui m'aidait à avancer et progresser. Je leur dis infiniment merci et je ne les remercierai jamais assez. Un grand merci aussi à mes sœurs (Zahia et Hayat) et à mes frères (surtout M'Hamed). Je remercie également ma belle famille notamment mes beaux-parents.

Table des matières

TABLES DES MATIERES

Résumé

Listes des figures et des tableaux

Abréviations

Introduction générale

1^{ère} Partie : Synthèse bibliographique

I-Industries oléicoles	3
1.1 Situation mondiale	3
1.2 Situation dans le bassin méditerranéen.....	5
1.2.1 Caractérisation du secteur de l'huile d'olive	5
1.2.1.1 Production et consommation	5
1.2.1.2 Les échanges mondiaux	7
1.2.2 Caractérisation du secteur des olives de table.....	8
1.2.2.1 Production et consommation	8
1.2.2.2 Exportations et importations	9
1.3 Le Secteur oléicole algérien	10
1.3.1 Surface oléicole.....	10
1.3.1.1 Superficie	10
1.3.1.2 Typologie des exploitations et âge du verger.....	13
1.3.2. Production et consommation.....	14
1.3.3 Le marché oléicole algérien	16
1.3.4 Perspectives.....	16
II-Procédés d'extraction de l'huile d'olive.....	17
2.1 Système discontinu d'extraction par presse.....	17
2.2 Système continu d'extraction par centrifugation.....	19
2.2.1 Système continu à trois phases	20
2.2.2 Système continu à deux phases.....	22
2.3 Méthode Sinolea	23
III- Caractérisation des sous-produits issus de l'extraction de l'huile d'olive.....	25
3.1 L'olive	25
3.2 La paroi cellulaire des dicotylédones : cas de l'olive.....	27
3.2.1 Les polymères de la paroi cellulaire	27
3.2.2 Les polysaccharides pariétaux de l'olive	32
3.2.3 Les interactions entre les différents composants de la paroi cellulaire.....	35
3.3 Composition chimique des sous-produits oléicoles.....	38

3.3.1 Composition générale	38
3.3.2 Composés phénoliques.....	39
3.3.2.1 Composés phénoliques des margines.....	40
3.3.2.2 Composés phénoliques des grignons.....	41
3.3.3 Polysaccharides	42
3.4 Impacts des sous-produits oléicoles sur l'environnement	44
3.5 Valorisation, utilisation et bioconversion des sous-produits oléicoles.....	46
3.5.1 Utilisations agricoles.....	46
3.5.2 Production de bioénergies.....	47
3.5.3 Extraction ou production de molécules d'intérêt en nutrition et en santé.....	47
3.5.4 Autres utilisations	48
IV-Les activités prébiotique et antioxydante	49
4.1 Activité prébiotique	49
4.1.1 Les prébiotiques	49
4.1.2 Métabolisme et fermentation des prébiotiques	51
4.1.3 Effets biologiques des prébiotiques	53
4.1.4 Prébiotiques et probiotiques.....	56
4.2 Activité antioxydante.....	57
4.2.1 Radicaux libres et antioxydants	57
4.2.1.1 Chimie et source des radicaux libres.....	57
4.2.1.2 Systèmes de défenses antioxydants.....	60
4.2.1.2.1 Systèmes antioxydants enzymatiques	60
4.2.1.2.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques	60
4.2.2 Le stress oxydant.....	62
2^{ème} Partie : Partie expérimentale	
I. MATERIEL ET METHODES.....	68
1.1 Matériel.....	68
1.2 Méthodes	71
1.2.1 Procédés d'extraction.....	71
1.2.1.1 Extraction des polysaccharides	71
1.2.1.1.1 Extraction du RIA à partir des margines.....	71
1.2.1.1.2 Extraction du RIA à partir des grignons	71
1.2.1.1.3 Extraction des fractions soluble et insoluble à partir des RIA	71
1.2.1.2 Extraction des composés phénoliques.....	72

1.2.2 Dosages colorimétriques	74
1.2.2.1 Dosage des oses neutres et des oses acides	74
1.2.2.1.1 Dosage des oses neutres par le résorcinol	74
1.2.2.1.2 Dosage des oses acides par méta-hydroxybiphényle	75
1.2.2.1.3 Détermination des concentrations en oses neutres et oses acides	76
1.2.2.2 Dosage des sucres réducteurs à l'acide bicinchoninique	76
1.2.2.3 Dosage des protéines	77
1.2.2.4 Dosage de l'azote total	78
1.2.2.5 Dosage des composés phénoliques totaux	79
1.2.3 Analyse des monosaccharides constitutifs des polysaccharidiques par chromatographie haute performance échangeuse d'anions	79
1.2.4 Etude de la fraction soluble extraite des margines.....	83
1.2.4.1 Analyse de la FSM par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	83
1.2.4.1.1 Dérivatisation par triméthylsilylation	84
1.2.4.1.2 Dérivatisation par acétylation	85
1.2.4.2 Fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique	87
1.2.4.2.1 Analyse de la FSM par une Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)	87
1.2.4.2.2 Analyse de la FSM par SEC-MALLS.....	88
1.2.4.3 Dessalage des fractions	89
1.2.4.3.1 Dialyse des solutions polysaccharidiques	89
1.2.4.3.2 Dessalage par ultrafiltration sur cellule Amicon.....	89
1.2.4.3.3 Dessalage sur Biogel P2.....	89
1.2.4.4 Fractionnement par chromatographie échangeuse d'anions	89
1.2.4.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	90
1.2.4.6 Hydrolyse de l'amidon	91
1.2.4.7 Déphénolisation des polysaccharides.....	92
1.2.4.7.1 Protocole de déphénolisation	92
1.2.4.7.2 Caractérisation des extraits phénoliques obtenus après déphénolisation par chromatographie sur couche mince.....	94
1.2.5 Etude des activités biologiques	95
1.2.5.1 Evaluation de l'activité prébiotique <i>in vitro</i> des extraits polysaccharidiques issus des margines	95
1.2.5.1.1 Test de digestibilité par le jus gastrique humain artificiel	95

1.2.5.1.2 Fermentation des extraits polysaccharidiques par des souches probiotiques.....	95
1.2.5.2 Quantification de l'activité antioxydante	98
1.2.5.2.1 Mesure de l'activité antioxydante par réactivité avec l'anion superoxyde.....	98
1.2.5.2.2 Mesure de l'activité antioxydante par réactivité avec le DPPH.....	99
1.2.5.2.3 Mesure de l'activité antioxydante par réactivité avec le radical hydroxyle	100
1.2.5.2.4 Pouvoir réducteur	100
1.2.5.2.5 Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène	101
1.2.5.2.6 Etude de l'activité antioxydante sur modèle cellulaire	102
1.2.5.2.6.1 Test d'hémolyse	102
1.2.5.2.6.2 Test de la peroxydation lipidique.....	104
1.2.5.2.6.3 Evaluation du stress oxydatif des protéines de la membrane érythrocytaire par SDS-PAGE.....	105
1.2.6 Analyse statistique	109
II Résultats et discussion	110
2.1 Extraction des polysaccharides et des composés phénoliques	110
2.1.1 Extraction des polysaccharides des sous-produits oléicoles.....	110
2.1.1.1 Composition générale des extraits polysaccharidiques.....	110
2.1.1.2 Composition en monosaccharides des extraits riches en polysaccharides.....	112
2.1.2 Extraction des composés phénoliques	115
2.2 Etude de la fraction soluble extraite des margines (FSM).....	115
2.2.1 Confirmation de la composition monosaccharidique de la FSM.....	115
2.2.2 Analyse de la FSM par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	116
2.2.3 Analyse de la FSM par chromatographie d'exclusion stérique	121
2.2.3.1 Chromatographie d'exclusion stérique sur support Superdex 200.....	121
2.2.3.2 SEC-MALLS.....	122
2.2.3.3 Purification des fractions F1, F2 et F3 collectées par superdex 200.....	123
2.2.4 Fractionnement de la FSM par chromatographie échangeuse d'anions	126
2.2.5 Spectroscopie Infrarouge de la FSM.....	132
2.2.6 Extraction et identification des composés phénoliques liés à la FSM.....	134
2.3 Activités biologiques des extraits polysaccharidiques	138
2.3.1 Etude de l'activité prébiotique	138
2.3.1.1 Hydrolyse des prébiotiques candidats par un suc gastrique artificiel	138

2.3.1.2 Etude de la fermentation des extraits polysaccharidiques des margines par les probiotiques.....	141
2.3.1.2.1 Sélection de souches capables de cataboliser les extraits polysaccharidiques des margines	141
2.3.1.2.2 Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> et <i>Lactobacillus casei</i> en culture sur des extraits polysaccharidiques issus des margines	143
2.3.2 Activité antioxydante de la FSM	151
2.3.3 Activités antioxydantes des composés phénoliques	155
2.3.3.1 Pouvoir réducteur et activités antiradicalaires	155
2.3.3.2 Etude sur les érythrocytes humains	158
2.3.3.2.1 Test d'hémolyse	158
2.3.3.2.2 Mesure de la résistance à la peroxydation lipidique	163
2.3.3.2.3 Evaluation de l'oxydation des protéines membranaires érythrocytaires.	167

Conclusion générale et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

La production industrielle d'huile d'olive dans les pays méditerranéens, à l'instar de l'Algérie, génère de grandes quantités de sous-produits qualifiés de margines et grignons. Les margines, par leur richesse en composés phénoliques (CP) peu biodégradables, causent un réel problème pour l'environnement. La valorisation de ces déchets par extraction de molécules d'intérêt tels que les polysaccharides constitue l'une des solutions pour leur traitement.

L'objectif de ce travail était l'extraction des polysaccharides et des CP et l'identification de leurs activités biologiques. Une caractérisation biochimique des extraits polysaccharidiques a été réalisée par dosages colorimétriques et par chromatographie. La fraction soluble extraite des margines (FSM) s'est révélée être une source intéressante de polysaccharides. Cette fraction a été étudiée par chromatographie échangeuse d'anion. La fraction FSM a été également fractionnée par chromatographie d'exclusion stérique et étudiée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). La composition en monosaccharides de cette fraction est également déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Les résultats indiquent que tous les extraits polysaccharidiques présentent une composition hétérogène en monosaccharides, le glucose étant le sucre majeur. La fraction FSM apparaît être composée de pectines, d'hémicellulose et de cellulose. Les résultats des analyses réalisées montrent la présence dans cette fraction de CP et de protéines. Les CP tels que l'acide caféique et l'acide férulique, sous forme de monomères, de dimères et/ou d'oligomères, pourraient être liés à la partie polysaccharidique du FSM par des liaisons esters ou éthers.

L'étude de l'activité biologique des extraits polysaccharidiques des margines est réalisée par des tests prébiotiques et des tests antioxydants (piégeage d'espèces radicalaires et pouvoir réducteur). Les résultats témoignent de l'activité prébiotique de l'extrait RIA et FSM par leur résistance à l'hydrolyse gastrique et leur stimulation de la croissance de certaines souches de lactobacilles. La fraction FSM a montré également une activité antioxydante intéressante notamment par le piégeage du radical DPPH et du radical hydroxyle.

L'activité antioxydante des CP de la pulpe d'olive (CPO) est déterminée par des tests chimiques et sur les hématies humaines. Les résultats montrent que ces extraits sont capables de neutraliser les radicaux DPPH et le peroxyde d'hydrogène et montrent un pouvoir réducteur intéressant. L'application des CPO sur les hématies montre un pouvoir anti-hémolytique important. En outre, ils protègent les lipides et les protéines membranaires érythrocytaires du stress oxydatif induit sous l'action d'un système oxydant générateur de radicaux hydroxyles.

Ainsi les sous-produits oléicoles, à l'exemple des margines, est une source de molécules à activité biologique et leur extraction peut constituer l'une des stratégies de valorisation de ce déchet.

Mots clés : Sous-produits oléicoles, polysaccharides, olive, composés phénoliques, prébiotique, antioxydant, érythrocyte.

Abstract

Industrial olive oil production in Mediterranean countries as Algeria, produces large quantities of olive oil by-products called olive mill wastewater (OMWW) and olive pomace. OMWW, rich in phenolic compounds (PC) with a low biodegradability, is harmful to the environment. The valorization of these by-products by extraction of molecules of interest as polysaccharides constitutes one of the solutions for their treatment.

The goal of this work was the extraction of polysaccharides and PC and identification of their biological activities. Biochemical characterization of polysaccharide extracts were achieved by colorimetric essays and by chromatography. The soluble fraction extracted from OMWW (WSF) appears to be a source of polysaccharides. This fraction was analyzed by anion exchange chromatography. WSF was also fractioned by size exclusion chromatography and studied with fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The monosaccharide composition of this fraction was determined also by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Results indicated heterogeneous monosaccharide composition of all polysaccharide fractions; glucose was the major sugar. The monosaccharide composition indicated that WSF seems to be composed of pectin, hemicellulose and cellulose. Results obtained from analysis showed the presence in this fraction of PC and proteins. The PC as caffeic and ferulic acid, in monomeric, dimeric and/or oligomeric form, could be linked to WSF with ester or ether linkages.

The study of biological activities of polysaccharide extracts from OMWW was evaluated by prebiotic and antioxidant tests (radical species scavenging and reducing power). The results revealed important prebiotic activity showed by their resistance towards artificial human gastric juice and growth promotion of some lactobacillus. WSF showed also a good antioxidant activity mainly by its scavenging capacity towards the DPPH and hydroxyl radicals.

The antioxidant activity of PCO was determined by chemical methods and tested on a cellular model. The results showed that this extract was able to scavenge DPPH radicals and hydrogen peroxide. PCO exhibit an important anti-hemolytic activity. Moreover, they protected lipids and proteins of erythrocyte membranes from oxidative stress induced by hydroxyl radicals generating system.

Thus, olive oil by-products as OMWW constitute a source of molecules with biological activities and their extraction could represent one of valorization option of this waste.

Key words: olive By-products, polysaccharides, olive, phenolic compounds, prebiotic, antioxidant, erythrocyte.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de la production et de la consommation mondiale d'huile d'olive et d'olives de table.	4
Figure 2 : Répartition de la production méditerranéenne d'huile d'olive	6
Figure 3 : Répartition de la production méditerranéenne des olives de table	9
Figure 4 : Aspect morphologique de l'olivier cultivé <i>Olea europaea</i> ssp. <i>europaea</i> var. <i>europaea</i>	13
Figure 5 : (A): Extraction de l'huile d'olive par presse. (B) unité de presse.	18
Figure 6 : Extraction d'huile d'olive par des systèmes continus.....	21
Figure 7 : Méthodes d'extraction de l'huile d'olive par les systèmes discontinu et continu. .	24
Figure 8 : Coupe transversale de l'olive.....	25
Figure 9 : Représentation de la structure de la paroi cellulaire primaire végétale. (A) Cellulose, (B) Hémicellulose, (C) Protéines structurales, (D) Pectine, (E) Acides phénoliques, (F) Lignine.....	28
Figure 10 : Structure simplifiée des pectines	30
Figure 11 . Structure du xyloglucane.	32
Figure 12 : Structure du xyloglucane de l'olive.	34
Figure 13 : Liaisons de l'acide férulique aux polysaccharides. (A): Liaison au Gal de la chaîne latérale des pectines. (B): formation d'un dimère d'acide férulique entre les résidus d'Ara de la chaîne latérale des pectines. (C): mécanisme probable de la formation de la liaison éther entre polysaccharide et acide férulique	37
Figure 14 : Structure des principaux composés phénoliques des sous-produits issus de l'extraction de l'huile d'olive. Me : groupement CH ₃	41
Figure 15 : Structure proposée d'un arabinane isolé à partir de grignons d'olives.....	44
Figure 16 : Extraction et composition des polysaccharides des sous-produits oléicoles.	45
Figure 17 : Les voies métaboliques des ERO.....	62
Figure 18 : Les principales réactions de la peroxydation lipidique	63
Figure 19 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.	64
Figure 20 : Mécanisme de formation de groupements carbonylés.....	65
Figure 21 : Protocole d'extraction du RIA à partir des margines.	72
Figure 22 : protocole d'extraction du RIA à partir des grignons.	73
Figure 23 : Extraction des fractions soluble et insoluble à partir des sous-produits oléicoles.	74
Figure 24 : Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe d'olive. ...	75
Figure 25 : Système HPAE-PAD pour l'analyse des monosaccharides.	80
Figure 26 : Représentation schématique d'une bille de résine échangeuse d'anions pour la colonne CarboPac PA1.....	80
Figure 27 : Diagramme des potentiels appliqués à l'électrode d'or d'un détecteur ampérométrique pour la détection des sucres.	81
Figure 28 : Schéma d'une source à ionisation par impact électronique.....	84
Figure 29 : Réaction de triméthylsilylation.	85
Figure 30 : Préparation d'acétates d'alditols.....	86

Figure 31 : Schéma du principe de l'analyse par spectroscopie d'absorption infrarouge.....	91
Figure 32 : Protocole de déphénolisation de la FSM.	93
Figure 33 : Quelques étapes de l'auto-oxydation de pyrogallol.....	98
Figure 34 : Structure du DPPH [•] et sa réduction par l'antioxydant RH.....	99
Figure 35 : Réactions mises en jeu dans le test au ferrocyanure de potassium.	101
Figure 36 : Réaction de formation du chromophore entre MDA et TBA	104
Figure 37 : Mécanisme de polymérisation entre l'acrylamide et le bisacrylamide.....	106
Figure 38 : Chromatogramme de la fraction FSM hydrolysée à L'H ₂ SO ₄ et analysée par HPAEC.....	114
Figure 39 : Profil CPG-SM-EI des triméthylsilyl-O-glycosides issus du FSM.....	117
Figure 40 : Spectres de masse (EI) du 1,2,3,4,6-pentakis-O-triméthylsilyl-D-glucopyranose (a) et du 1,2,3,5-tétrakis-O-triméthylsilyl-L-arabinofuranose (b).....	118
Figure 41 : Profil CPG-SM-EI des acétates d'alditols issus de la FSM.....	119
Figure 42 : Chromatogramme de la FSM après élution sur colonne Superdex 200.	121
Figure 43 : Chromatogramme de la FSM élue en SEC MALLS sur colonnes shodex SB-806, 804, 803. (a) Détections réfractométrique (DRI), par diffusion de la lumière (LS) et détection UV à 280 nm et (b) Signal RI et répartition des masses molaires (MM) en fonction du volume d'élution.	122
Figure 44 : Chromatogrammes de fractionnement des fractions F2 (a, a') et F3 (b, b') sur Biogel P2.	124
Figure 45 : Profil d'élution de la FSM en chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Resource Q (gradient G1 : paliers successifs de NaCl (0 M ; 0,125M ; 0,25 M ; 0,50 M et 1 M) dans le tampon phosphate).	127
Figure 46 : Chromatographie d'exclusion stérique (colonne Superdex 200) des fractions collectées (A, B, C et D) après chromatographie échangeuse d'anions.....	131
Figure 47 : Elution de la FSM en chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Resource Q (gradient G2 : paliers successifs de NaCl (0 M ; 0,25 M et 1 M) dans le tampon phosphate).	132
Figure 48 : Spectre FTIR de la FSM.	133
Figure 49 : Suivi de la déphénolisation de la FSM. (a) rapport CP/OT/matière sèche dans les extraits polysaccharidiques, (b) et par dosage des composés phénoliques totaux dans les extraits après déphénolisation	135
Figure 50 : Analyse par CCM des composés phénoliques contenus dans les différents extraits issus du protocole de déphénolisation de la FSM (a) UV à 254 nm et (b) UV à 366 nm. S1 : acide gallique ; S2 : acide cinnamique ; S3 : acide caféique ; S4 : oleuropéine ; S5 : acide p-coumarique ; S6 : acide férulique.....	137
Figure 51 : Profils d'élution de la FSM et des résidus polysaccharidiques obtenus après déphénolisation sur colonne Superdex 200. FSM (a) ; (b) R1 ; (c) R2 ; (d) R3.	139
Figure 52 : Croissance des souches de lactobacilles (UFC/mL) en présence de RIA (a) et FSM (b) à une concentration de 10 g/L.....	142
Figure 53 : Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (a et a') et de <i>Lactobacillus casei</i> (b et b') dans le milieu MRS supplémenté ou non par une source de carbone à des concentrations de 5 g/L (a et b) et 10 g/L (a' et b').	144

Figure 54 : Consommation par <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (a et a') et par <i>Lactobacillus casei</i> (b et b') des différents substrats à des concentrations de 5 g/L (a et b) et de 10 g/L (a' and b').	150
Figure 55 : Activités de piégeage d'espèces radicalaires DPPH (a), radical hydroxyle (b), anion superoxyde (c) et pouvoir réducteur (d) détectées avec la FSM (-◇-) et la vit C (-○-).	152
Figure 56 : Activités antioxydantes des composés phénoliques testés. (a) pouvoir réducteur ; (b) Piégeage de H ₂ O ₂ et (c) Piégeage du radical DPPH.	156
Figure 57 : Effet de différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène sur l'induction de l'hémolyse d'une suspension d'érythrocytes (5%, v/v).	160
Figure 58 : Pourcentage d'hémolyse d'une suspension d'érythrocytes (5%, v/v) en présence de H ₂ O ₂ (5mM) et en fonction du temps.	161
Figure 59 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse d'une suspension d'érythrocytes (5%, v/v) par les différentes substances testées (AG, AC, AT, CPO et vit C).	161
Figure 60 : Formation du MDA sous l'effet du système d'oxydation H ₂ O ₂ /FeSO ₄ , sur les membranes érythrocytaires.	163
Figure 61 : MDA formé sur les membranes érythrocytaires en fonction du temps sous l'effet du système pro-oxydant H ₂ O ₂ (900mM) /FeSO ₄ (1mM).	164
Figure 62 : Inhibition de la peroxydation lipidique (%) des membranes érythrocytaires (1 mg/mL) par les différents composés phénoliques testés (AG, AC, AT et CPO).	165
Figure 63 : Effet pro-oxydant de la vit C sur la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1 mg/mL) induite par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ (900 mM/1 mM).	166
Figure 64 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires.	167
Figure 65 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires après un stress oxydatif induit par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ à différentes concentrations.	168
Figure 66 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires à la suite d'un stress oxydatif induit par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ (50 mM/30 mM) après différents temps d'incubation.	169
Figure 67 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires après un stress oxydatif induit par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ (50 mM/30 mM) avec différentes concentrations en CPO.	170
Figure 68 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires suite à un stress oxydatif induit par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ (50 mM/30 mM) en présence de différentes concentrations de la vit C.	172

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Production, consommation, exportation et importation de l'huile d'olive au sein des pays du bassin méditerranéen.	6
Tableau II: Répartition de la production, consommation, exportation et importation de l'huile d'olive des pays méditerranéens en 1000 tonnes	7
Tableau III: Production, consommation, exportation et importation des olives de table au sein des pays du bassin méditerranéen en 1000 tonnes.....	10
Tableau IV: Répartition de la production, consommation, exportation et importation des olives de table des pays méditerranéens en 1000 tonnes	11
Tableau V: Evolution de la surface oléicole occupée par les oliviers à huile et les oliviers à olives de table en 1000 hectares.....	12
Tableau VI : Evolution au cours des dix dernières campagnes de la production, consommation, exportation et importation d'huile d'olive et d'olives de table (en 1000 tonnes) en Algérie.....	15
Tableau VII : Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'extraction de l'huile d'olive.....	26
Tableau VIII : Composition chimique de l'olive (%)	26
Tableau IX : Composition en polysaccharides de la paroi cellulaire de l'olive (<i>Olea europaea</i> cv <i>koroneiki</i>) (tr = trace).....	34
Tableau X : Caractéristiques chimiques des margines et des grignons d'olives	39
Tableau XI : Composition en fibres des noyaux et graines de différentes variétés d'olives en pourcentage massique (g/100 g)	43
Tableau XII: Structures et sources des prébiotiques	51
Tableau XIII : Activités biologiques des prébiotiques	54
Tableau XIV: Microorganismes utilisés comme probiotiques	57
Tableau XV : Activités biologiques des probiotiques.....	58
Tableau XVI: Exemples d'antioxydants.....	61
Tableau XVII: Exemples d'antioxydants protecteurs contre des pathologies liées au stress oxydant.....	67
Tableau XVIII : Souches de lactobacilles utilisées pour l'étude de l'activité prébiotique. ...	96
Tableau XIX : Composition du milieu MRS modifié.....	97
Tableau XX : Le système d'oxydation $H_2O_2/FeSO_4$ des protéines membranaires érythrocytaires.....	108
Tableau XXI : Composition biochimique des extraits polysaccharidiques des margines et des grignons d'olive.....	111
Tableau XXII : Composition en monosaccharides (% molaire) des extraits polysaccharidiques des margines et des grignons après analyse par HPAEC.	113
Tableau XXIII : Composition en monosaccharides de la FSM (% molaire) déterminée par CPG-SM.....	120
Tableau XXIV : Résultats SEC/MALLS du FSM.....	123
Tableau XXV : Caractérisation biochimique et composition en monosaccharides des fractions F1, F2 et F3 et de leurs sous fractions.....	125

Tableau XXVI : Rendement, caractérisation biochimique et composition monosaccharidique des fractions purifiées par chromatographie échangeuse d'anions de la FSM.....	128
Tableau XXVII : Rapports frontaux (Rf) des standards phénoliques calculés après séparation sur CCM avec le mélange de solvants : chloroforme/méthanol/acide formique (85:15:1). ..	136
Tableau XXVIII : Digestibilité (%) du RIA, FSM et des prébiotiques de référence par un suc gastrique artificiel.....	140
Tableau XXIX : Paramètres de croissance des souches de lactobacilles en présence des différents substrats.....	146
Tableau XXX : Valeurs de pH mesurées dans les milieux de cultures lors de la croissance de <i>L. rhamnosus</i> en milieu MRS additionné de différentes sources de carbone.	148
Tableau XXXI : Valeurs de pH mesurées dans les milieux de cultures lors de la croissance de <i>L. casei</i> en milieu MRS additionné de différentes sources de carbone.....	149
Tableau XXXII : Valeurs de IC ₅₀ et PR _{0,5AU} de la FSM et de la vit C obtenues avec les différents tests antioxydants.	153
Tableau XXXIII : Activités antioxydantes des substances testées.....	157
Tableau XXXIV : Pourcentages d'hémolyse obtenus en présence de différentes concentrations d'H ₂ O ₂ et de NaCl.....	159

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Acide caféique
ADN : Acide désoxyribonucléique
AEC : Chromatographie échangeuse d'anions
AF: Acide férulique
AFIDOL : Association Française Interprofessionnelle de l'Olive
AG : Acide gallique
AGal: Acide galacturonique
AGCC : Acides Gras à courtes chaînes
AGlc : Acide glucuronique
Ara: Arabinose
AraGOS : Arabinogalactooligosaccharides
AraOS : Arabinoooligosaccharides
ARN : Acide ribonucléique
AT : Acide tannique
AXOS : Arabinoxyloligosaccharides
BSA : Bovin Serum Albumin
BSTFA : N,O-bis(triméthylsilyle) trifluoroacétamide
CCM : Chromatographie sur couche mince
COI : Conseil oléicole international
CP : Composés phénoliques
CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CPO : Composés phénoliques de l'olive
Da : Dalton
DBO : Demande biologique d'oxygène
DCO : Demande chimique d'oxygène
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité optique
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
ERA : Espèces réactives de l'azote
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FIG : Fraction insoluble extraite des grignons
FIM : Fraction insoluble extraite des margines
FOS : Fructooligosaccharides
FSG : Fraction soluble extraite des grignons
FSM : Fraction soluble extraite des margines
FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
Fuc : Fucose
G : Temps de génération
Gal : Galactose

Glc : Glucose
GLP-1: glucagon-like peptide-1
GOS : Galactooligosaccharides
GPx : Glutathion peroxydase
Hb : Hémoglobine
HG : Homogalacturonane
HPAEC : Chromatographie ionique haute pression échangeuse d'anions
HPAE-PAD : Chromatographie ionique haute pression échangeuse d'anions couplée à un système de détection ampérométrique pulsé
IFN- γ : Interféron gamma
Ig : immunoglobulines
IMO : Isomalto-oligosaccharides
Kav : Coefficient de de partage
LABAB : Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies
L. casei : *Lactobacillus casei*
LDL : « Low density lipoprotein » Lipoprotéines de faible densité
L. rhamnosus : *Lactobacillus rhamnosus*
 μ : Taux de croissance
m/v : masse / volume
mA : Milli ampère
Man: Mannose
MDA : Malondialdehyde
m-HBP : Méta-hydroxybiphényle
MM : Masse molaire
Mn : Masse molaire moyenne en nombre
MRS : Milieu de Man-Rogosa- Sharpe
Mw : Masse molaire moyenne en poids
OA : Oses acides
OGaIA : Oligogalacturonides
OMS : Organisation mondiale de la santé
ON : Oses neutres
OT : Oses totaux
PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS : Tampon phosphate salin
POS : Oligosaccharides dérivés des pectines
PYY : peptide YY
RG I : Rhamnogalacturonane I
RG II : Rhamnogalacturonane II
Rha : Rhamnose
RhaGalAOS : Rhamnogalacturonoligosaccharides
RIA: Résidu insoluble dans les alcools
SDS : Dodécylsulfate de sodium

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique
SEC/MALLS : Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière
SM : Spectroscopie de masse
SOD : Superoxyde dismutase
TBA : Acide 2-thiobarbiturique
TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène diamine
TFA : Acide trifluoroacétique
TMCS : Trimethylchlorosilane
TMS : Triméthylsilyle
Tris : Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
UV : Ultraviolet
v/v : Volume / volume
vit C : Vitamine C
VLDL : lipoprotéines de très faible densité
XGA : Xylogalacturonanes
XOS : Xylo-oligosaccharides
Xyl : Xylose

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

L'industrie oléicole mondiale se concentre essentiellement dans le bassin méditerranéen où elle constitue une activité économique d'une grande importance via les deux filières : celle de l'huile d'olive et celle des olives de table. La production d'huile d'olive des pays du bassin méditerranéen représente 82,98% de la production mondiale. L'Algérie constitue le 7^{ème} producteur à l'échelle mondiale avec une production d'environ 2,22% de la production méditerranéenne. La conséquence de la production importante et croissante d'huile d'olive est la production de grandes quantités de sous-produits oléicoles appelés margines et grignons d'olives. Les margines correspondent aux effluents liquides alors que les grignons correspondent aux sous-produits solides composés de résidus de pulpe et de fragments de noyaux. Chaque année, l'industrie de l'huile d'olive génère à l'échelle mondiale près de 30 millions de m³ de margines et 20 millions de tonnes de grignons. L'Algérie produit à elle seule une moyenne de 200000 tonnes de margines et 90000 tonnes de grignons d'olive chaque année.

Ainsi, comme les autres pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive, l'Algérie est confrontée à la problématique de l'élimination des margines et dans une moindre mesure des grignons. Les margines, comme tous les effluents agricoles liquides sont très toxiques et posent de sérieux problèmes pour l'environnement à cause de leur forte charge organique et de leur richesse en composés phénoliques peu biodégradables. Ces margines sont souvent épandues de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou stockées dans des bassins d'évaporation et déversées dans les égouts d'assainissement et les rivières. Or ces sous-produits peuvent contaminer les sols, les nappes phréatiques, les cours d'eau et l'air. Les grignons sont stockés généralement à côté des moulins avant d'être brûlés ce qui pose par conséquent moins de problèmes environnementaux. De ce fait, plusieurs stratégies visent au traitement et la valorisation des sous-produits oléicoles. Ainsi, plusieurs procédés physico-chimiques et biologiques ont été proposés pour la prise en charge des margines avec comme principal objectif la réduction de leur teneur en composés phénoliques et leur valorisation. Le contenu non négligeable des margines et des grignons d'olive en sucres, minéraux, acides volatils et en lipides a conduit à leur prise en charge par plusieurs secteurs industriels ainsi qu'à leur bioconversion. Ces différents traitements des sous-produits oléicoles englobent l'utilisation en agriculture comme engrais et compost, l'utilisation pour la production de bioénergies (biohydrogène, biométhane et du bioéthanol), la production de molécules d'intérêt, l'utilisation comme substrats pour la production de mycètes comestibles, de

polysaccharides microbiens, ou encore d'enzymes industrielles. Cependant, ces différentes voies de valorisation souffrent encore actuellement d'un faible degré de connaissances de ces sous-produits notamment en ce qui concerne leur composition chimique complexe et leur variabilité.

Les molécules d'origine naturelles connaissent depuis toujours un intérêt considérable qui ne cesse d'augmenter face à la méfiance grandissante du consommateur à l'égard des produits de synthèse. Dans ce contexte, la valorisation de sous-produits agricoles à l'exemple de ceux issus de la filière oléicole peut s'avérer viable d'un point de vue économique. Les polysaccharides et les composés phénoliques comptent actuellement parmi les molécules naturelles qui sont le plus largement étudiées de part leurs multiples propriétés biologiques et/ou fonctionnelles. Leur présence à des taux significatifs dans les sous-produits oléicoles et notamment les margines pourrait constituer une voie de valorisation pour les sous-produits oléicoles.

L'objectif de cette thèse est la caractérisation des polysaccharides et/ou des composés phénoliques au sein des sous-produits oléicoles et dans la pulpe d'olive et le développement de procédés permettant leur extraction sélective. Dans un second temps leur potentiel en tant qu'agent prébiotique et antioxyd.

Une première partie est consacrée à une étude bibliographique résumant la situation du secteur oléicole mondial, méditerranéen et algérien, suivi par la présentation des différentes méthodes d'extraction de l'huile d'olive. Un chapitre est également dédié à la présentation des sous-produits oléicoles. Les activités biologiques, englobant les activités prébiotique et antioxydante, ont été également présentées.

La deuxième partie, correspondant à la partie expérimentale, regroupe la description du matériel et des protocoles mis en application dans ce travail dans un souci de reproductibilité des expérimentations réalisées. Dans cette deuxième partie, les résultats obtenus sur la composition en composés phénoliques et polysaccharidiques des sous-produits oléicoles et de la pulpe d'olive seront détaillés ainsi que les procédés permettant leur extraction sélective. Les tests biologiques sur les fractions extraites et purifiées seront décrits dans une optique de valorisation future.

1^{ère} Partie :

Synthèse bibliographique

I-Industries oléicoles

1.1 Situation mondiale

Le verger mondial d'oliviers a atteint 11193000 hectares (surface totale) ce qui correspond à plus de 1,46 milliards d'oliviers. Les principaux vergers se trouvent en Espagne, Italie, Turquie et Tunisie (AFIDOL, 2012).

La production mondiale d'huiles végétales était de l'ordre de 125,6 millions de tonnes en 2010. L'huile de palme occupe la première place avec 31,7% de cette production suivie par l'huile de soja (29,7%), l'huile de colza (14,7%) et l'huile de tournesol (7,6%). La production d'huile d'olive, quant à elle, est estimée à 2,89 millions de tonnes soit 2,3% de la production mondiale des huiles végétales (AFIDOL, 2012).

Au cours des vingt dernières années, la production mondiale d'huile d'olive a enregistré une hausse de 29,62%. Les estimations du Conseil Oléicole International (COI) pour la campagne 2014-2015 ont indiqué une production mondiale de 2,82 millions de tonnes (COI, 2014a). A elle seule, l'union européenne représente 64,02% de la production mondiale d'huile d'olive. L'Espagne est le premier producteur mondial suivi par l'Italie et la Grèce (COI, 2014a). D'autres pays commencent à augmenter leur production. C'est le cas notamment de l'Australie qui a vu sa capacité augmenter de 1000 tonnes en 2000/2001 à 12000 tonnes en 2013/2014. On assiste également à l'émergence de certains pays producteurs tels que l'Iran (9000 tonnes) et l'Argentine (6000 tonnes) (COI, 2014a).

La consommation mondiale d'huile d'olive se situe entre 2,8 et 3,05 millions de tonnes avec une croissance moyenne annuelle d'environ 3,29% depuis 10 ans. Elle a grimpé de 1,85 millions de tonnes en 1991/1992 à 3,08 millions de tonnes en 2011/2012. Ces dernières années, la consommation mondiale connaît une légère tendance à l'augmentation, notamment dans des pays occidentaux comme les États-Unis (COI, 2014b). L'Union Européenne consomme 56,37% de la production mondiale. La majorité des flux d'importation sont intra-européens, ce qui explique la concentration de la consommation au sein de ces pays. Cependant, on assiste ces dernières années à une ouverture de nouveaux marchés vers les États-Unis, le Brésil, le Canada, l'Australie, le Japon et la Chine (COI, 2014b).

En ce qui concerne la filière des olives de table, la production mondiale a grimpé de 968500 tonnes en 1991/1992 à 2595500 tonnes en 2013/2014 (COI, 2014e). La consommation quant à elle, est passée de 955000 tonnes en 1991/1992 à 2540500 tonnes en 2013/2014 (COI, 2014f).

L'évolution de la production et de la consommation mondiale d'huile d'olive et d'olives de table durant la dernière vingtaine d'années est donnée par la figure 1.

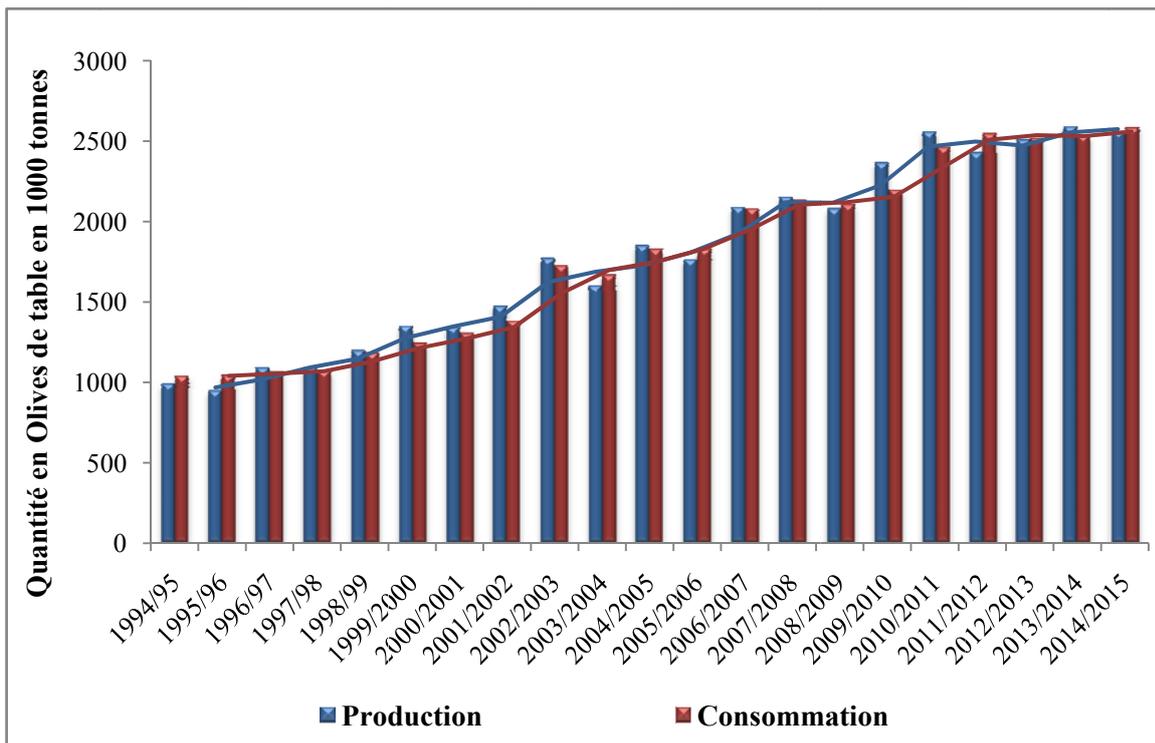
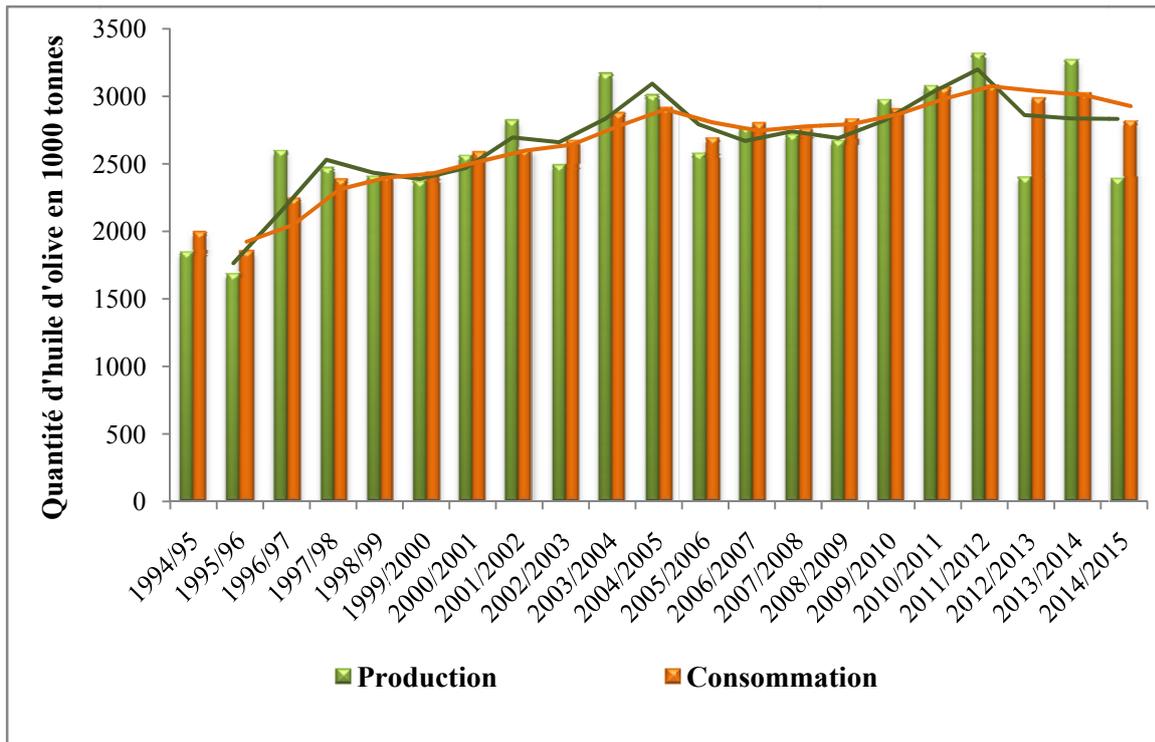


Figure 1 : Evolution de la production et de la consommation mondiale d'huile d'olive et d'olives de table (COI, 2014a, b).

La comparaison des évolutions de la production et de la consommation confirme la tendance à la hausse de ces deux indicateurs et souligne la nécessité de structurer au mieux les choix stratégiques des acteurs de la filière afin de garantir un bon positionnement des différentes productions que la filière oléicole est capable d'offrir au consommateur, devenu de plus en plus exigeant.

1.2 Situation dans le bassin méditerranéen

1.2.1 Caractérisation du secteur de l'huile d'olive

1.2.1.1 Production et consommation

La production d'huile d'olive des pays du bassin méditerranéen représente 82,98% de la production mondiale. La production la plus importante, selon le prévisionnel du COI 2014/2015, sera celle de l'Espagne avec 825700 tonnes (41,58%), suivie des productions de l'Italie avec 302500 tonnes (15,23%), de la Grèce avec 300000 tonnes (15,11%), de la Turquie (9,57%), du Maroc (5,54%), de la Syrie (2,52%), de l'Algérie (2,22%) et de la Jordanie (1,76%) (COI, 2014a).

La figure 2 illustre l'importance de la production d'huile d'olive pour chacun des pays producteurs du bassin méditerranéen selon les données du COI 2014/2015. Le tableau I regroupe les données méditerranéennes de production, de consommation, d'exportation et d'importation d'huile d'olive au cours des campagnes 2005/2006 à 2014/2015.

La production d'huile d'olive a été relativement stable au cours de la dernière décennie. La légère diminution de la production durant certaines campagnes s'explique notamment par l'alternance biologique. L'alternance est une particularité de l'olivier qui peut se traduire par une très forte chute de la production une année sur deux. Les variétés qui présentent une forte tendance à l'alternance nécessitent des soins attentifs (taille, fertilisation, irrigation) pour maintenir une bonne régularité de production (AFIDOL, 2004).

L'Union Européenne et les Etats-Unis sont les zones de consommation les plus importantes avec respectivement 56,37% et 10,27% de la consommation totale. En se basant sur la dernière campagne, 28,41% de la consommation au sein du bassin méditerranéen est concentrée en Italie, 28,14% en Espagne et 8,74% en Grèce (COI, 2014b).

Le pourcentage de consommation des autres pays montre une légère tendance à la hausse, même si cette augmentation a tendance à s'atténuer depuis quelques campagnes. Le Brésil contribue à la consommation mondiale avec 2,55%, le Canada avec 1,33%, l'Australie avec 1,31%, la Chine et le Japon avec 1,06% et 1,80% respectivement (COI, 2014b).

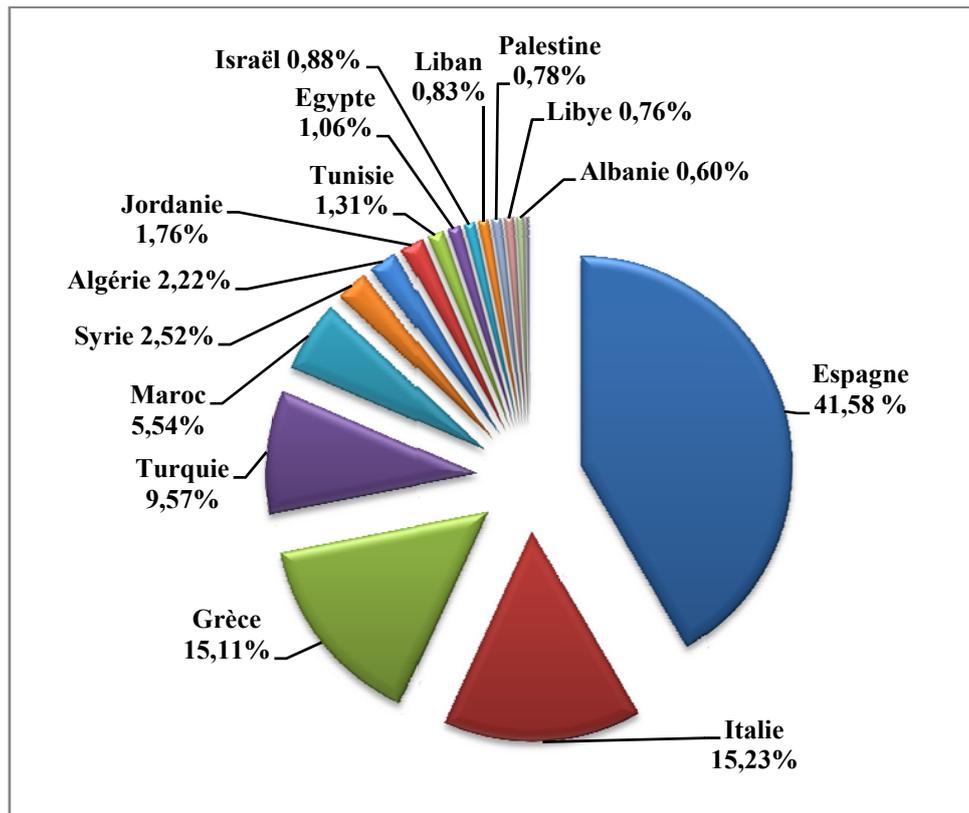


Figure 2: Répartition de la production méditerranéenne d'huile d'olive (COI, 2014a)

Tableau I: Production, consommation, exportation et importation de l'huile d'olive au sein des pays du bassin méditerranéen en 1000 t (COI, 2014a).

<i>Campagne</i>	Production	Consommation	Exportation	Importation
2005/06	2 496	2 023	436	200
2006/07	2 646	2 053	609	237
2007/08	2 606	2 020	499	141
2008/09	2 548	2 065	545	133
2009/10	2 812	2 038	576	103
2010/11	2 932	2 123	616	110
2011/12	3 146	2 092	696	105
2012/13	2 275	1 997	751	169
2013/14	3 077	2 006	711	100
2014/15	2 220	1 832	743	113

La stabilité de la consommation montre l’ancrage de ce produit dans les mentalités et les habitudes alimentaires des pays consommateurs.

Le tableau II représente les données prévisionnelles de la campagne 2014/2015.

Tableau II: Répartition de la production, consommation, exportation et importation de l’huile d’olive des pays méditerranéens en 1000 tonnes (Prévisionnel 2014/2015, COI, 2014 a-d).

Pays	Production	Consommation	Exportation	Importation
<i>Albanie</i>	12	13	0	1
<i>Algérie</i>	44	45,5	0	0
<i>Chypre</i>	0	6,5	0	0
<i>Croatie</i>	0	-	0	0
<i>Egypte</i>	21	15	5	0
<i>Espagne</i>	825,7	515	225	30
<i>France</i>	5	99,5	2,5	7
<i>Grèce</i>	300	160	11,5	0
<i>Israël</i>	17,5	19	0	1,5
<i>Italie</i>	302,5	520	243,7	59,5
<i>Jordanie</i>	35	30	6	0
<i>Liban</i>	16,5	18	5,5	4
<i>Libye</i>	15	15	0	0
<i>Maroc</i>	110	120	10	10
<i>Palestine</i>	15,5	13,5	3,5	0
<i>Syrie</i>	50	60	25	0
<i>Tunisie</i>	26	50	170	0
<i>Turquie</i>	190	130	35	113

1.2.1.2 Les échanges mondiaux

Les exportations et importations mondiales de l’huile d’olive, exportations intra-communautaires incluses, sont présentées dans les tableaux I et II.

Le commerce international de l’huile d’olive a représenté 817500 tonnes en 2013/2014 et 832500 tonnes en 2014/2015. Les principaux pays producteurs sont également les principaux exportateurs. L’Italie et l’Espagne sont considérés comme les plus grands pays exportateurs. Selon les chiffres du COI, les exportations de l’Italie sont chiffrées à 243700 tonnes soit

29,27% des exportations mondiales. L'Espagne contribue avec 27,03% des exportations mondiales. La Tunisie occupe la troisième place après l'Espagne avec une exportation moyenne de 170000 tonnes soit près de 20,50% des exportations mondiales (COI, 2014c). D'autres pays comme la Turquie, la Syrie, la Grèce et le Maroc contribuent également aux échanges mondiaux avec des taux d'exportation de 4,20%, 3%, 1,38% et 1,20% respectivement (Tableau II).

Si on considère les importations d'huile d'olive par les pays méditerranéens, l'Italie y contribue avec 7,57% et l'Espagne avec 3,81%. Au niveau mondial, les Etats Unis sont le plus grand importateur d'huile d'olive avec 36,90% de l'importation mondiale, suivie par le Brésil (9,16%), le Japon (6,49%), le Canada (4,77%), la Chine (3,82%), l'Australie (3,56%), la Russie (3,37%), le Mexique (1,84%) et la Suisse (1,71%) (COI, 2014d). Les chiffres et les données rapportées dans les tableaux I et II montrent l'importance socio-économique du secteur de l'olive.

1.2.2 Caractérisation du secteur des olives de table

1.2.2.1 Production et consommation

Dans la filière des olives de table, l'Espagne arrive en tête des pays méditerranéens avec approximativement 20% de la production mondiale et 23,19% de la production méditerranéenne, suivie de l'Egypte avec 20,27% de la production méditerranéenne (ce qui représente 450000 tonnes) et 17,61% de la production mondiale. La Turquie produit 438000 tonnes d'olives de table soit 17,14% de la production mondiale. L'Algérie vient en cinquième position après la Grèce. Ces deux pays contribuent respectivement à 9,20% et 8,45% de la production mondiale ce qui représente 235000 et 216500 tonnes (COI, 2014e).

Les prévisions élaborées pour la campagne 2014/2015 indiquaient que la production des pays du bassin méditerranéen représenterait 86,92% de la production mondiale. Les autres pays producteurs en dehors du bassin méditerranéen sont principalement le Pérou (3,10%), les Etats Unis (1,74%) et l'Argentine (1,08% de la production mondiale) (COI, 2014e). La figure 3 donne la répartition de la production méditerranéenne des olives de table pour la campagne 2014/2015.

Les estimations du COI pour la campagne 2014/2015 indiquent un niveau de consommation égal à 2,578 millions de tonnes avec une hausse de 1,45% par rapport à la campagne précédente. Les grands consommateurs mondiaux sont l'union européenne avec 24,38% de la consommation totale suivie de la Turquie avec 13,58%, l'Egypte avec 12,41% et les Etats Unis avec 8,14%. L'Algérie, le Brésil et la Syrie représentent aussi des pays consommateurs

avec des pourcentages respectifs de 8,33 ; 4,34 et 1,55%. Cette dernière décennie, le niveau de consommation des olives de table a sensiblement augmenté avec une hausse de 29,05% (COI, 2014f).

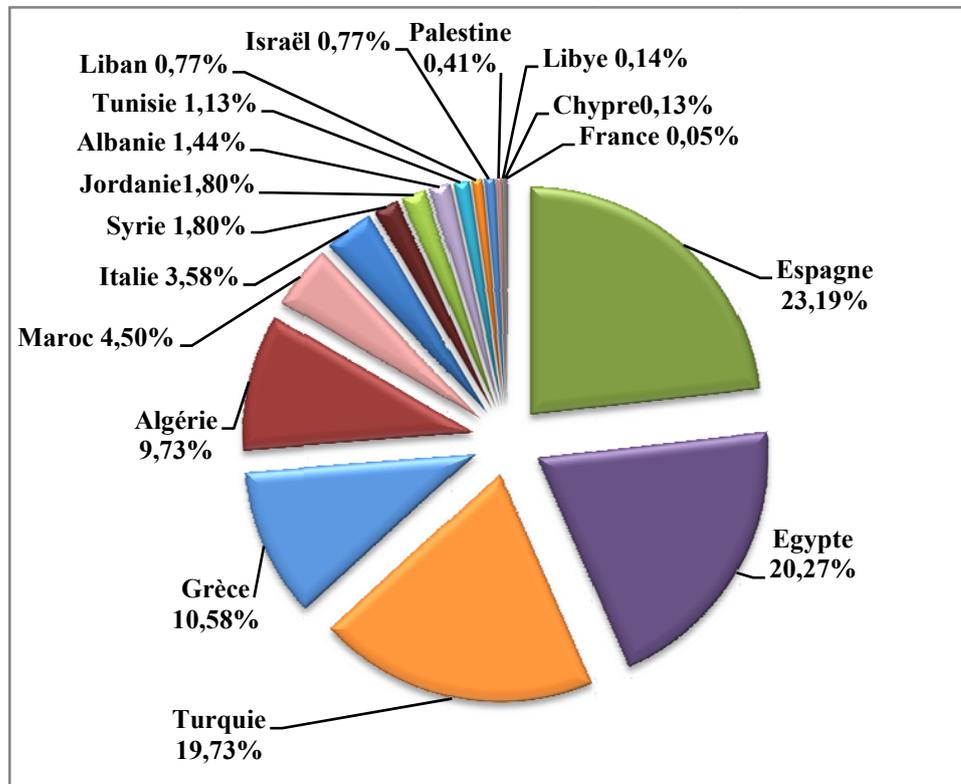


Figure 3: Répartition de la production méditerranéenne des olives de table (COI, 2014e)

1.2.2.2 Exportations et importations

Les exportations mondiales pendant la campagne 2014/2015 se sont élevées à 685000 tonnes. L'Union Européenne y contribue à hauteur de 48%. L'Espagne est le premier exportateur méditerranéen avec un volume de 235000 tonnes ce qui correspond à 39,59% des exportations méditerranéennes. L'Égypte fournit 21,05%, le Maroc 11,79% et la Grèce près de 11% des exportations méditerranéennes (COI, 2014g).

Les grands pays importateurs d'olives de table sont les États Unis avec 160000 tonnes soit 22,94% des importations totales, suivie du Brésil avec 112000 tonnes. L'union européenne arrive en troisième position avec 15,91% suivie de la Russie avec 10,75% (COI, 2014h). Le tableau III regroupe les données relatives à la production, consommation, exportation et importation des olives de table enregistrées par l'ensemble des pays méditerranéens pendant les dix dernières campagnes oléicoles.

Le tableau IV présente les données concernant les production, consommation, exportation et importation des olives de table de chaque pays méditerranéen pendant la campagne 2014/2015.

Tableau III: Production, consommation, exportation et importation des olives de table au sein des pays du bassin méditerranéen en 1000 tonnes (prévision 2014/2015, COI, 2014e-h).

<i>Campagne</i>	Production	Consommation	Exportation	Importation
<i>2005/06</i>	1 460	1 135	409	83
<i>2006/07</i>	1 829	1 281	484	61
<i>2007/08</i>	1 735	1 246	475	78
<i>2008/09</i>	1 836	1 304	472	63
<i>2009/10</i>	1 934	1 322	519	71
<i>2010/11</i>	2 127	1 490	537	71
<i>2011/12</i>	2 058	1 551	543	79
<i>2012/13</i>	2 184	1 570	548	76
<i>2013/14</i>	2104	1 510	533	85
<i>2014/15</i>	2 220	1 517	594	89

1.3 Le Secteur oléicole algérien

L'arboriculture fruitière est très diversifiée en Algérie. Elle est constituée essentiellement de l'olivier, du figuier, de la vigne et des agrumes, qui sont les espèces les plus importantes sur le plan économique et social. L'oléiculture, qui est une activité ancestrale, constitue un moyen de satisfaction des besoins alimentaires et un patrimoine culturel en Algérie (CHOUAKI *et al.*, 2006). L'olivier contribue également à la lutte contre l'érosion, à la valorisation des terres agricoles et à la fixation des populations dans les zones de montagne.

1.3.1 Surface oléicole

1.3.1.1 Superficie

La culture de l'olivier en Algérie occupe environ 33% de la superficie arboricole nationale et 2% des terres agricoles cultivables. Les superficies oléicoles portent sur 300000 hectares (COI, 2011). La participation du secteur oléicole à la production agricole du pays était en moyenne de 21% (COI, 2006).

Tableau IV: Répartition de la production, consommation, exportation et importation des olives de table des pays méditerranéens en 1000 tonnes (Prévisionnel 2014/2015, COI, 2014e-h).

Pays	Production	Consommation	Exportation	Importation
<i>Albanie</i>	32	32	2,5	3
<i>Algérie</i>	216	215	0	8
<i>Chypre</i>	2,8	3,5	0	0,1
<i>Croatie</i>	0	0	0	0
<i>Egypte</i>	450	320	125	0
<i>Espagne</i>	515	180	235	6
<i>France</i>	1,1	60	1,7	39,2
<i>Grèce</i>	235	20	64,6	4
<i>Israël</i>	17	24	0	7
<i>Italie</i>	79,5	146,3	5,8	6,3
<i>Jordanie</i>	40	30	4	2
<i>Liban</i>	17	20	2	2
<i>Libye</i>	3	14	0	11
<i>Maroc</i>	100	33	70	0
<i>Palestine</i>	9	8	0	0
<i>Syrie</i>	40	40	20	0
<i>Tunisie</i>	25	20	3	0
<i>Turquie</i>	438	350	60	0

La surface oléicole est répartie sur trois régions : le centre (54,3%); l'Est (28,3%) et l'Ouest (17%). De façon plus précise, les données de la COI délimitent la plus grande région oléicole algérienne dans le centre-nord du pays et plus particulièrement en Kabylie (58,4% de la surface oléicole totale) (CHOUAKI, 2006 ; LOUADJ et GIUFFRE, 2010). Environ 80% des oliveraies sont situées dans des zones de montagne, sur des terrains accidentés et marginaux, peu fertiles et caractérisés par une pluviométrie moyenne. Le reste des oliveraies est localisé dans les plaines occidentales du pays.

La répartition de ce patrimoine selon l'âge et selon les données du COI 2006, fait ressortir trois catégories :

- plantations de 0-5 ans : 16555 hectares (6,9%) ;

- plantations âgées de 6 à 15 ans : 27410 hectares (11,4%) ;
- plantations âgées de 16 à 50 ans: 94800 hectares (39,5%) ;
- plantations âgées de plus de 50 ans : 110390 hectares (42,2%).

La densité moyenne de plantation varie entre 100 et 156 arbres/hectare pour les cultures en régime pluvial (oliviers à huile), qui occupent 88% de la surface, et pour les cultures en régime irrigué (oliviers de table), qui occupent 12% de la surface. La surface réservée à l'oléiculture augmente de plus en plus comme le montre le tableau V.

Tableau V: Evolution de la surface oléicole occupée par les oliviers à huile et les oliviers à olives de table en 1000 hectares (COI, 2006).

Années	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Oliviers à l'huile	110,3	110,3	111,8	112	114	118	126	140	158	174	189,5
Oliviers à olives de table	33	33	33,5	33,56	33,6	34,1	37,6	40,9	45,4	49,9	50,7

En Kabylie, les vergers se caractérisent par une densité irrégulière (espacée ou très rapprochée) et sont conduits en sec ou en irrigué, contrairement aux oliveraies se trouvant dans les régions ouest, dans les zones de Sig, Mohamedia et Tlemcen qui sont plantées en ligne et qui sont toutes irriguées (ILBERT, 2005 ; COI, 2006). Les rendements moyens sont d'environ 2200 kg d'olives/hectare pour les oliviers à huile. Les rendements moyens des oliviers à fruits de table sont d'environ 1160 kg d'olives/hectare.

Selon le centre international de hautes études agronomique (2005), les régions oléicoles potentiellement productrices sont représentées par le centre-nord où 90% du verger est détenu par la wilaya de Béjaïa, Tizi-Ouzou et Bouira ; par l'est où 40% du verger est implanté au niveau des wilayas de Guelma, Jijel, Skikda et par l'ouest où 89% du verger se trouve dans les wilayas de Mascara, Sidi Bel Abbés, Relizane et Tlemcen.

En 2005/06, seuls 134520 sur 300000 hectares étaient en production. Le Ministère de l'Agriculture et du développement rural a mis en place un programme spécial pour le développement de l'oléiculture intensive dans les zones steppiques, pré-sahariennes et sahariennes en vue d'augmenter les productions et de diminuer les importations d'huiles végétales (COI, 2006). L'effort de développement reste axé sur la réhabilitation et la modernisation au niveau des zones traditionnelles qui représentent, près de 90% du patrimoine national. De 2000 à 2008, la nécessité de redynamiser le secteur agricole en

général et la filière oléicole en particulier, devenait un objectif majeur. Un plan national de développement de l'agriculture rurale a été mis en place. Les résultats de ce plan indiquent que le nombre total de plantations a atteint 302000 hectares, dont 137000 hectares sont occupés par des plantations récentes. Les plantations en production représentent 208000 hectares. Le nombre d'arbres répertoriés est de 32 millions (MENDIL, 2009).

1.3.1.2 Typologie des exploitations et âge du verger

L'olivier représente l'un des plus importants arbres fruitiers du bassin méditerranéen (LOUMOU et GIOURGA, 2003). Il appartient à la famille des Oléacées et au genre *Olea* qui comprend une trentaine d'espèces différentes dans le monde. L'espèce *Olea europaea* comprend six sous espèces dont la forme méditerranéenne *Olea europaea* ssp. *europaea*. Cette dernière est représentée par deux variétés, une variété sauvage appelée *sylvestris* (oléastre) et une cultivée *europaea* (l'olivier cultivé) (GREEN, 2002). L'oléastre est généralement un arbuste buissonnant épineux à petites feuilles rondes ou légèrement allongées et à petits fruits sphériques qui contiennent très peu d'huile. L'olivier cultivé (Figure 4) est un arbre pouvant atteindre 20 mètres de haut au tronc sinueux dont l'écorce crevassée présente des feuilles lancéolées et des fruits de forme et de teneur en huile assez variables selon la variété considérée. Selon la destination des fruits de cet arbre, les oliviers sont classés en variétés à olives de table, en variétés à olives à huile ou variétés dites à deux fins (BOTINEAU, 2010).



Figure 4 : Aspect morphologique de l'olivier cultivé *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*.

Plusieurs variétés cultivées d'*Olea europaea* ssp. *europaea* var. *europaea* ont été répertoriées en Algérie. Dans le centre et dans l'est prédominent les variétés 'Hamma', 'Chemlal', 'Azeradj', 'Bouchouk', 'Rougette', 'Blanquette' et 'Limli'. Dans la région occidentale, les variétés les plus diffusées sont 'Sigoise', 'Verdial', 'Cornicabra' et 'Gordal'.

Le verger oléicole est constitué :

- d'une oliveraie dite moderne concentrée dans les plaines de l'ouest, spécialisée dans l'olive de table dominée par la variété *sigoise* très appréciée par le marché de l'exportation ;
- d'une oliveraie traditionnelle qui se caractérise par la prédominance d'un relief accidenté et qui représente 85% du verger national. Ce type d'oliveraie est spécialisé dans la production d'huile d'olive. Les variétés dominantes d'olives à huile sont *Chemlal*, *Azeradj*, *Bouchouk*, *Blanquette* et la *Rousette* (ILBERT, 2005).

1.3.2. Production et consommation

Au cours de la dernière décennie, la production oléicole algérienne se situait à hauteur de 44650 tonnes par an en moyenne. La production nationale montre cependant une variation inter-annuelle assez importante, fortement liée aux conditions climatiques et à l'effet de l'alternance biologique de l'olivier.

Les produits et sous-produits de l'olivier sont :

- L'huile d'olive : elle reste le produit essentiel de l'olivier dans la région de Kabylie, par contre dans la région Ouest elle vient en deuxième position après l'olive de table ;
- Les grignons d'olives : ces sous-produits du processus d'extraction de l'huile d'olive sont composés de résidus de pulpe et de fragments de noyaux.
- Les margines : c'est un sous-produit liquide très toxique pour l'environnement et généralement déversé dans les oueds.

Le rejet des effluents des industries productrices d'huile d'olive est un problème majeur. Ces eaux fortement polluées causent de sérieux problèmes environnementaux. Des détails sur ce point seront abordés dans les chapitres suivants.

À la fin des années 2000, l'industrie oléicole algérienne était composée majoritairement d'huileries traditionnelles (85%) et ne comptait que 10% d'huileries modernes ce qui représentait 1705 établissements (ILBERT, 2005).

Entre 1990 et 2000, la production moyenne annuelle d'huile d'olive a atteint 31250 tonnes, avec un minimum de 6000 tonnes en 1991 et un maximum de 54500 tonnes en 1999. En 2003/04, cette production a atteint un nouveau maximum avec 69500 tonnes. Entre les campagnes 2004/05 et 2007/08, la production se situait entre 21500 et 33500 tonnes pour

atteindre en 2010/11 67000 tonnes. Cette production est redescendue à 44000 tonnes en 2013/2014 (Tableau VI).

Tableau VI : Evolution au cours des dix dernières campagnes de la production, consommation, exportation et importation d’huile d’olive et d’olives de table (en 1000 tonnes) en Algérie (COI, 2014 a-h).

<i>Années</i>	<i>Production</i>		<i>Consommation</i>		<i>Exportation</i>		<i>Importation</i>	
	<i>Huile d’olive</i>	<i>Olives de table</i>						
2005/06	32	68,5	35	80	0	0	0	0,5
2006/07	21,5	81	23	81,5	0	0	0	0,5
2007/08	24	91	25	86	0	0	0,5	2
2008/09	61,5	98	55	97,5	0	0	0,5	4
2009/10	26,5	136	33,5	134	0	0	0	1,5
2010/11	67	192,5	59	189	0	0	0	0
2011/12	39,5	145,5	42,5	166	0	0	0	15,5
2012/13	66	175	60,5	172	0	0	0	12
2013/14	44	208	48,5	205	0	0	0	0
2014/15	44	216	45,5	215	0	0	0	8

De 2005/2006 à 2014/2015 l’augmentation aura donc été de 27,27% (COI, 2014a). Les fluctuations importantes qui sont observées s’expliquent par la sécheresse persistante dont l’Algérie a souffert au cours de la décennie concernée et du phénomène de l’alternance biologique de l’olivier. Ces phénomènes ont été accentués par certaines caractéristiques du secteur oléicole algérien, parmi lesquels on peut citer: le vieillissement des plantations, le caractère accidenté des zones de culture traditionnelles et la concentration des vergers en zones d’altitude (70% des vergers traditionnels, notamment en Kabylie et dans la région de Jijel), la structure foncière réduite défavorable à la modernisation des exploitations, le manque d’entretien et les moyens de production limités (ILBERT, 2005). La production d’olives à huile a cependant connu un léger mieux ces dernières années, avec les réformes du secteur agricole et l’avènement du plan national de développement de l’agriculture. Au cours des dernières années, le rendement moyen (en litres d’huile/100 kg d’olives) a été de 17%. La

variété, mais aussi les conditions climatiques telles que la pluviométrie influencent fortement les rendements des diverses régions oléicoles qui peuvent varier entre 17% et 24%.

Concernant la filière des olives de table, la production a oscillé entre 8000 tonnes en 1994/95 et 63500 tonnes au cours de la campagne 2002/03. La production a continué d'augmenter pour atteindre un maximum lors de la campagne 2010/2011 avec 192500 tonnes. En 2012/13 la production était de 175000 tonnes. Elle est passée à 216000 tonnes en 2014/2015 (Tableau VI) (COI, 2014e).

La couverture des besoins de consommation en huile d'olive est assurée à 100% par la production nationale. Actuellement, l'huile d'olive est consommée pratiquement dans sa totalité dans les zones de production. La consommation par habitant est passée d'une moyenne de 0,85 kg/an au cours des années 80 et 90 à 1,43 kg en 2000 et 1,53 kg en 2004, soit une augmentation de 80%. L'autoconsommation dans les zones traditionnelles est très forte (COI, 2006).

La moyenne de consommation actuelle (2005/06–2014/15) d'huile d'olive est de 42750 tonnes. En 2005/06, le taux de consommation était de 35000 tonnes puis une légère tendance à la baisse a été enregistrée jusqu'à la campagne 2007/2008, suivie d'une augmentation de la consommation pour atteindre 45500 tonnes pendant la campagne 2013/2014 (COI, 2014b).

D'autre part, la consommation des olives de table est en constante évolution et est passée de 80000 tonnes en 2005/2006 à 189000 tonnes en 2010/2011 soit une augmentation de 57,67%. Cette consommation a continué d'augmenter pour atteindre près de 200000 tonnes pendant les deux dernières campagnes (COI, 2014f).

1.3.3 Le marché oléicole algérien

Les importations et les exportations d'huile d'olive par l'Algérie sont quasi-nulles. Pour les olives de table, des importations de 15500 et 12000 tonnes ont été enregistrées pour les campagnes 2011/12 et 2012/13 respectivement. Le prévisionnel pour la campagne 2014/15 prévoit un niveau d'importation de 8000 tonnes.

1.3.4 Perspectives

L'un des objectifs fixés par le ministère de l'agriculture était la densification des vergers et le renforcement des capacités de production des semences et plants oléicoles (MENDIL, 2009). A partir de 2005, le ministère de l'agriculture et du développement rural a lancé un nouveau programme de développement intensif de l'oléiculture (400 plants/hectare), qui a permis la réalisation de 13410 hectares à travers 15 wilayas des régions steppiques et sahariennes (MENDIL, 2009). En outre, en vue de moderniser le secteur de l'extraction

d'huile d'olive pour améliorer la qualité du produit, les autorités algériennes ont adopté un programme de modernisation de l'industrie de l'huile d'olive, dont l'objectif est de disposer d'un nombre plus élevé d'unités d'extraction équipées d'un système continu.

II-Procédés d'extraction de l'huile d'olive

L'huile d'olive est définie comme l'huile obtenue à partir du fruit de l'olivier après la mise en œuvre d'un procédé de production incluant plusieurs étapes. L'extraction peut être réalisée par des procédés qualifiés de discontinus ou continus.

Les techniques d'extraction de l'huile d'olive ont subi de nombreuses évolutions au cours du temps. Ces évolutions concernent le broyage des olives et la séparation des phases solide et liquide. Entre ces deux étapes, la pâte d'olive issue du broyage est malaxée afin d'être homogénéisée. Ce traitement permet la coalescence des gouttelettes d'huile. La pâte malaxée va ensuite être traitée par pressage ou centrifugation. A partir de ce protocole, deux catégories de méthodologies d'extraction ont été développées : le système discontinu qui est apparu en premier et les extractions continues par centrifugation horizontale à 2 ou à 3 phases qui sont apparues de façon plus tardive.

Quel que soit le procédé d'extraction utilisé, il génère des sous-produits oléicoles appelés grignons et margines. Le grignon d'olive est constitué de la peau, de la pulpe et du noyau. Les margines correspondent, en plus de l'eau de végétation, à l'eau additionnée durant le processus d'extraction.

2.1 Système discontinu d'extraction par presse

Traditionnellement, et jusqu'à l'apparition des méthodes modernes d'extraction par centrifugation, l'extraction par presse était l'unique procédé existant. La pression exercée sur la pâte d'olive conduit à la séparation des phases liquides (huile et margines) et solides (grignons). La figure 5 présente les différentes étapes de ce procédé.

Pour obtenir des rendements élevés en huile, il est nécessaire de libérer la plus grande partie d'huile contenue dans les vacuoles situées dans les cellules du mésocarpe des olives. A cet effet, les olives sont broyées, après leur lavage, dans un moulin en pierre (APARICIO et HARWOOD, 2013). La pâte issue du broyage est étendue en fines couches sur des disques de matière filtrante (toile, ou plus récemment fibres plastiques) appelés scourtins. Les scourtins sont entassés les uns sur les autres dans un wagonnet en étant guidés par une aiguille centrale. L'ensemble formé par le wagonnet, l'aiguille et les scourtins entassés porte le nom de charge. Le pressage, initialement réalisé de façon manuelle, est désormais effectué par des presses hydrauliques plus puissantes et automatisées. La phase liquide obtenue est mise dans des

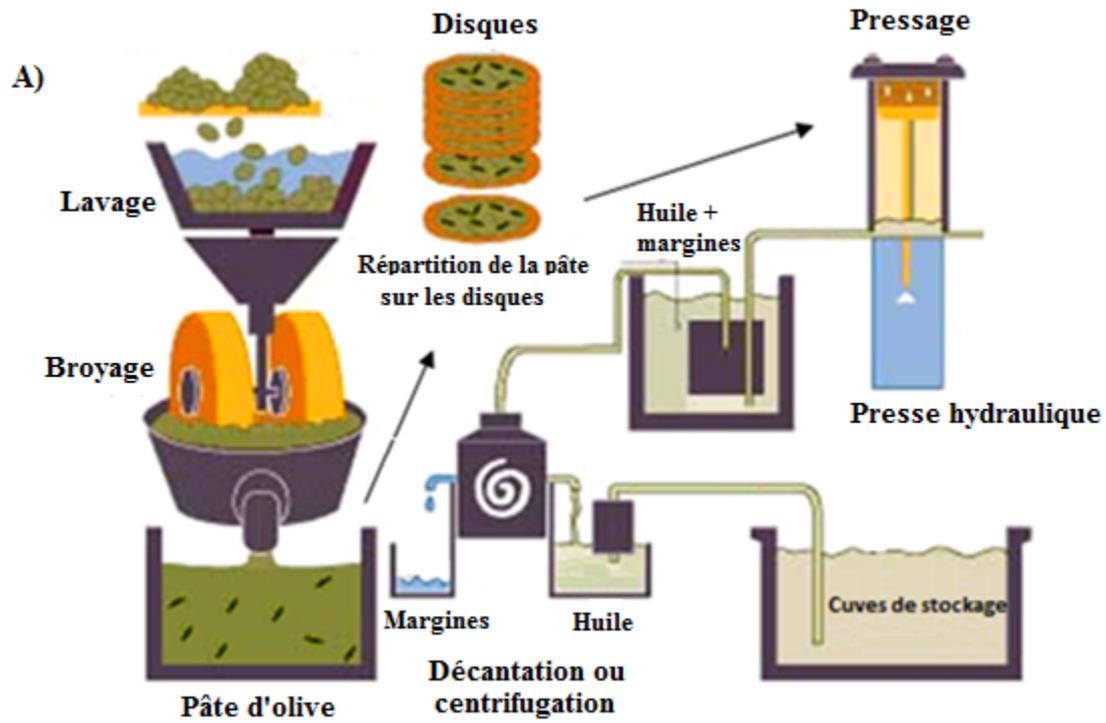


Figure 5: (A): Extraction de l'huile d'olive par presse. (B) unité de presse.

réservoirs et la phase huileuse est séparée de la phase aqueuse (margines) par décantation dans des cuves ou plus récemment au moyen d'une centrifugation verticale.

Beaucoup de facteurs affectent les rendements d'extraction par ce procédé. Parmi eux, la pression de pressage apparaît comme déterminante. Les presses les plus puissantes atteignent une pression maximale comprise entre 350 et 400 kg/cm² ce qui permet l'extraction d'un pourcentage élevé d'huile (entre 82–86 %) (DE FELICE *et al.*, 1979; DI GIOVACCHINO *et al.*, 1994).

Cette méthode offre des avantages (COI, 1990) tels que le faible coût de l'équipement, la simplicité de la technique et une consommation faible d'énergie. En outre, la quantité d'eau utilisée est relativement faible ce qui génère de faibles volume de margines qui sont de l'ordre de 40 à 60 L/100 kg d'olives (KAPELLAKIS *et al.*, 2008). Cependant, ces margines posent un sérieux problème de pollution de l'environnement du fait de leur demande chimique en oxygène (DCO) plus élevée que celle des margines plus diluée générées par les autres procédés d'extraction (DI GIOVACCHINO *et al.*, 2002). Le système discontinu d'extraction par presse présente également des inconvénients, tels que les coûts élevés de la main d'œuvre et la discontinuité du processus. En effet, le nettoyage des scourtins doit s'effectuer soigneusement pour une élimination totale des particules restant dans la matière filtrante. Les conditions d'humidité et de température peuvent conduire à des processus hydrolytiques et oxydants pouvant altérer les huiles (mauvais goût et acidité élevée).

Ce système traditionnel, largement utilisé par le passé, a été peu à peu abandonné dans les années 1970 pour des raisons économiques (SANCHEZ-MORAL et RUIZ-MENDEZ, 2006). On l'utilise néanmoins toujours de façon artisanale dans certains pays tels que l'Italie et le Portugal où 5000–6000 et 1000 d'huileries respectivement, fonctionnent en utilisant ce procédé (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2006).

2.2 Système continu d'extraction par centrifugation

Le premier décanteur centrifuge a été utilisé vers la fin des années 1960. Cette conception moderne de l'extraction remplace le pressage traditionnel avec comme conséquence la réduction de la main-d'œuvre et donc des coûts d'exploitation.

La méthode de centrifugation est un processus continu qui peut séparer grâce à la force centrifuge l'huile d'olive des autres phases de la pâte d'olive que sont les margines et les grignons. Le principe de la séparation repose sur une augmentation des masses spécifiques des liquides non miscibles que sont l'huile et l'eau et la matière solide (grignons) sous l'effet de la vitesse élevée (3500–3600 rpm/min) générée par la centrifugeuse horizontale

(APARICIO et HARWOOD, 2013). Ce travail en continu améliore considérablement le rendement et la productivité des huileries. En outre, les centrifugeuses horizontales travaillent plus rapidement que la presse, prennent moins de place, demandent moins de main d'œuvre et réduisent les coûts de transformation et la durée de stockage des olives conduisant à une meilleure qualité d'huile. Elles sont par ailleurs plus faciles à intégrer dans un moulin.

Ce système continu inclut des étapes importantes de broyage et de malaxage. Quand un décanteur centrifuge est utilisé, le broyage des olives peut être effectué par plusieurs types de broyeurs métalliques, y compris des broyeurs à marteaux, des broyeurs à couteaux et des broyeurs à disques. Les systèmes métalliques permettent l'accélération du processus de broyage, et donc l'augmentation des volumes de production et sont particulièrement adaptés pour ces systèmes de production en continu. Le type de broyeur métallique utilisé et l'intensité du broyage affectent la taille des fragments de noyau, les rendements d'extraction et les propriétés organoleptiques de l'huile d'olive (MUÑOZ ARANDA et ALBA, 1980). La pâte d'olive obtenue après broyage doit être malaxée pour obtenir un maximum de rendement. Cette opération de malaxage consiste en une agitation lente de la pâte d'olive dans le but de favoriser la coalescence des microgouttelettes d'huile qui seront ainsi plus faciles à extraire de la pâte. Cette opération est particulièrement importante quand les olives sont broyées par des broyeurs métalliques qui peuvent entraîner la formation des émulsions (MARTINEZ MORENO et *al.*, 1957). En général, l'étape de malaxage est réalisée pendant 30 à 60 minutes, à une température variant entre 25 °C et 32 °C.

La méthode centrifuge continue (trois ou deux phases) est la plus utilisée dans tous les pays producteurs d'huile d'olive. Elle est ainsi employée dans 96–98 % des huileries espagnoles, un peu plus de 80 % des huileries grecques et 60-70 % des huileries italiennes, tunisiennes, turques, syriennes et marocaines.

2.2.1 Système continu à trois phases

La pâte d'olive obtenue après broyage est envoyée vers une centrifugeuse horizontale qui isole les grignons de la phase liquide. Cette dernière, contenant l'huile et les margines, est soumise à une nouvelle centrifugation dans une centrifugeuse verticale afin de séparer l'huile des margines (Figure 6). Comme dans le cas de l'extraction par presse, 3 phases sont ainsi obtenues: l'huile, les grignons et les margines. Ce procédé d'extraction utilise également de l'eau tiède pour une meilleure séparation entre la phase huileuse et aqueuse pendant l'étape de malaxage et de centrifugation. L'addition d'eau augmente la fluidité du mélange et favorise la séparation des phases liquide et solide par centrifugation (APARICIO et

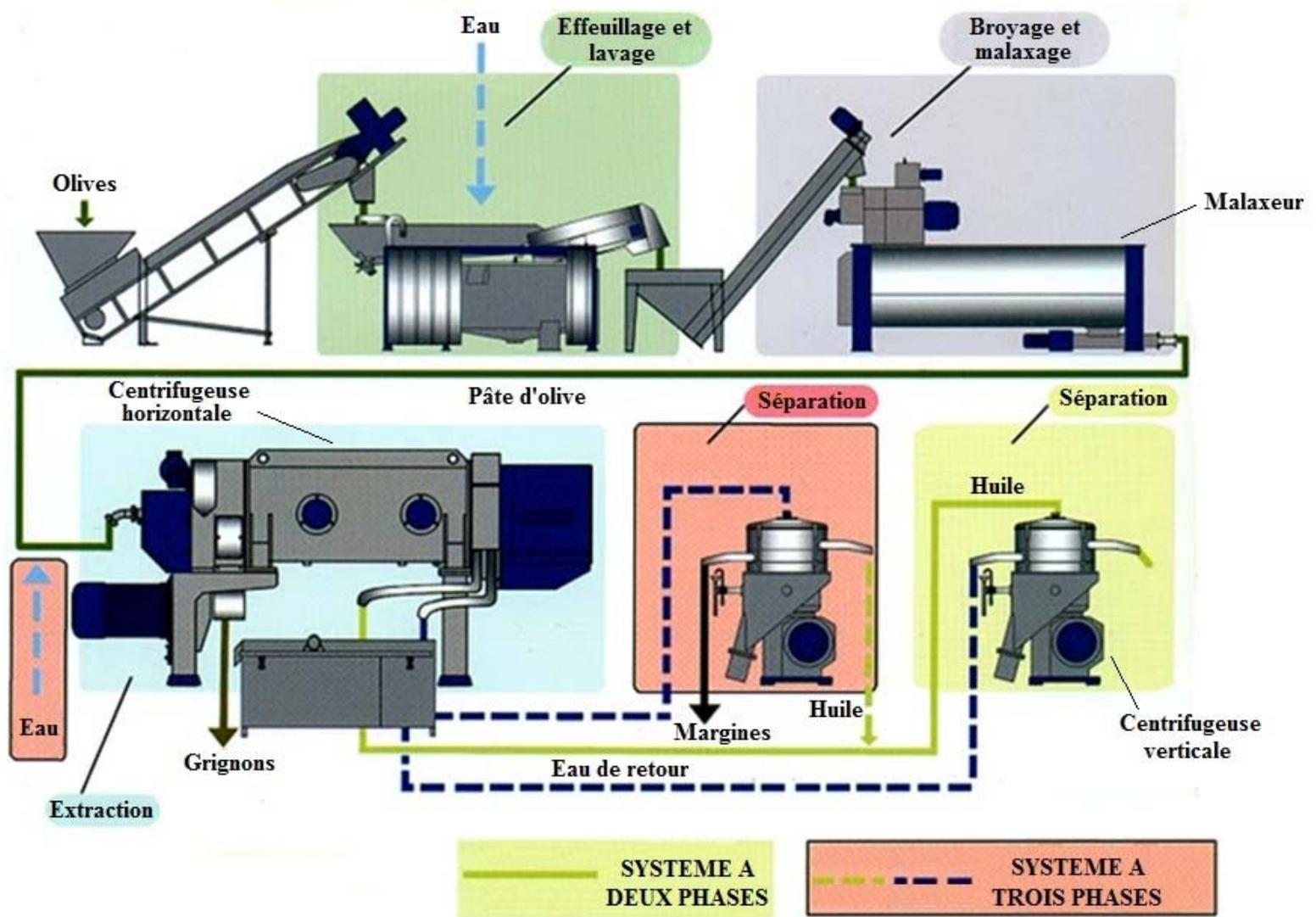


Figure 6: Extraction d'huile d'olive par des systèmes continus

HARWOOD, 2013). La quantité d'eau utilisée est 1,25 à 1,75 fois supérieure à une extraction traditionnelle. La quantité de margines générée est donc elle aussi plus importante et représente 80 à 120 L/100 Kg d'olive (ALBURQUERQUE *et al.*, 2004).

Cette technique d'extraction présente certains inconvénients comme une consommation élevée d'eau et d'énergie ainsi que des coûts élevés d'équipements. L'utilisation de grande quantité d'eau (40 à 60% du poids de la pâte) génère des quantités élevées d'effluent liquide polluant et conduit à l'obtention d'huile appauvrie en composés phénoliques (CP) avec comme conséquence une résistance plus faible à l'oxydation (TSIMIDOU *et al.*, 1992 ; ROIG *et al.*, 2006).

Le système à 3 phases, en dépit de sa grande consommation d'eau, est toujours employé pour la production d'huile d'olive, particulièrement dans les pays producteurs de grandes quantités d'huile sur des périodes courtes (BENITEZ *et al.*, 1997). Ainsi, l'Italie, la Grèce et le Portugal sont de gros utilisateurs d'unités d'extraction fonctionnant avec le système à 3 phases. A titre d'exemple, en Grèce, 70% des huileries sont de type système continu à trois phases, le reste fonctionnant avec le système traditionnel (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2006).

2.2.2 Système continu à deux phases

Afin de minimiser les volumes de margines générés au cours de l'extraction par la méthode à 3 phases, un nouveau système continu à deux phases a été développé dans les années 1990. Le système continu à deux phases constitue une variante du système à 3 phases. Il fonctionne avec un décanteur et une centrifugation à 2 phases qui sépare l'huile d'un mélange grignon/margines de consistance pâteuse appelée grignon humide (humidité d'approximativement 65–72 %) ou grignon à deux phases. Ce système permet l'extraction d'huile sans adjonction d'eau ce qui est un des atouts majeurs de cette technologie en terme économique et d'impact sur l'environnement (ROIG *et al.*, 2006 ; KAPELLAKIS *et al.*, 2008).

Le procédé continu à deux phases est caractérisé par sa grande capacité de traitement (jusqu'à 100 tonnes d'olives/jour) supérieure à celle des centrifugeuses à 3 phases. La qualité d'huile produite avec le système à 2 phases est légèrement supérieure à l'huile produite par les autres systèmes, avec une meilleure résistance à l'oxydation puisque ce décanteur permet d'obtenir des huiles d'olives plus riches en CP que les autres procédés. En outre, la transformation plus rapide des olives permet une diminution de l'acidité des huiles produites. Les rendements obtenus sont plus élevés que ceux des autres systèmes (3 phases ou presse) du fait d'une

minimisation des pertes en huiles entraînées avec les margines. En plus de tous ces avantages, les coûts d'exploitation sont moindres.

Pendant la dernière décennie, le système à 2 phases est devenu dominant en Espagne, où approximativement 95% des huileries emploient cette méthode d'extraction (APARICIO et HARWOOD, 2013). Ce système est également largement répandu en Croatie mais son utilisation n'est pas étendue aux autres pays producteurs du fait des problèmes de gestion des grignons humides (10 L/100 kg d'olives) qui sont très polluants (KAPELLAKIS *et al.*, 2008 ; MCNAMARA *et al.*, 2008). Ces grignons humides peuvent être retraités pour extraire une huile dite huile de grignons et pour augmenter les rendements. En effet, il y a deux types d'huile de grignons: l'huile extraite en utilisant des solvants (traditionnels), et l'huile obtenue par extraction physique ou par centrifugation (ALBA-MENDOZA *et al.*, 1996 ; SANCHEZ-MORAL et RUIZ-MENDEZ, 2006). Environ 50 % à 70 % de l'huile restante peut être extraite. Ce type d'huile nécessite une étape supplémentaire de raffinage.

La figure 7 récapitule les méthodes d'extraction par les systèmes discontinu et continu.

Plusieurs études ont montré que l'utilisation de certaines préparations enzymatiques durant le processus d'extraction améliore la qualité d'huile ainsi que le rendement d'extraction (MONTEDORO *et al.*, 1993; RANALLI et DE MATTIA, 1997).

Les extraits enzymatiques commerciaux les plus utilisés sont produits par GistBrocades (Cytolase 0, Rapidaseadex D, Bioliva) et Novozymes (Olivex, Glucanex, Novoferm 12) (CHIACCHIERINI *et al.*, 2007). Ils se composent d'un mélange de pectinases, de cellulases et d'hémicellulases. Ces enzymes dégradent les parois des cellules végétales contenant l'huile (COIMBRA *et al.*, 1994 ; O'NEILL *et al.*, 1990) et déstabilisent les colloïdes constitués de pectines, d'hémicelluloses, et de protéines qui maintiennent les gouttelettes d'huile en suspension dans la pâte d'olive (RANALLI et DE MATTIA, 1997; VORAGEN *et al.*, 2001). En outre, ces enzymes limitent la formation d'émulsions qui peuvent apparaître sous l'effet du broyage et de la centrifugation (CHIACCHIERINI *et al.*, 2007).

2.3 Méthode Sinolea

Un système moins couramment utilisé que les précédents est également mis en œuvre pour l'extraction de l'huile d'olive. Il s'agit de la méthode Sinolea qui repose sur un procédé de percolation assez peu utilisé. Les premières études sur la percolation pour l'extraction de l'huile d'olive remontent à 1911. Il s'agit d'un procédé fonctionnant à température ambiante sans addition d'eau. L'extraction est basée sur la différence de tensions superficielles entre l'huile et l'eau, l'huile adhérant plus facilement sur une surface métallique.

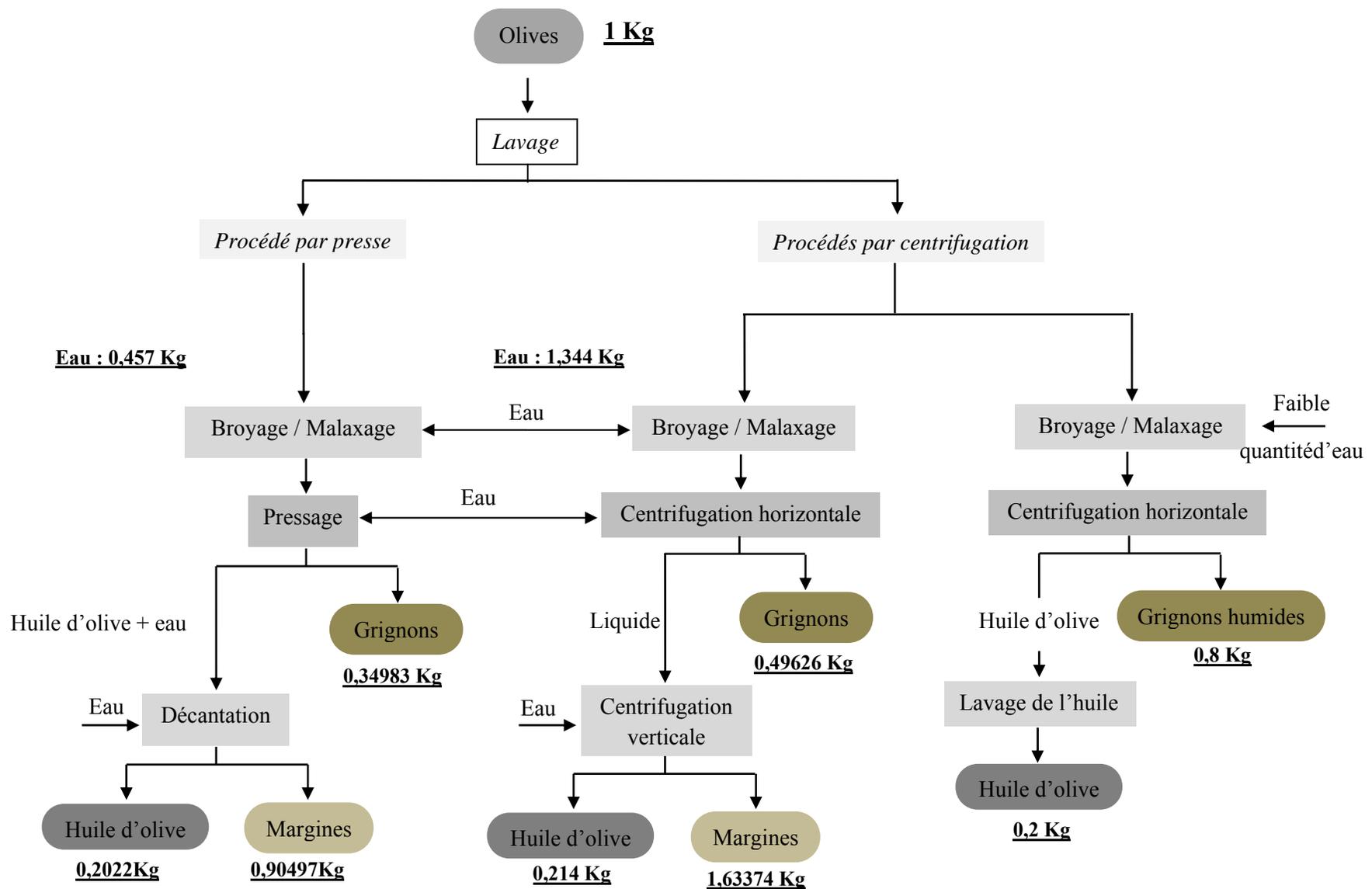


Figure 7 : Méthodes d'extraction de l'huile d'olive par les systèmes discontinu et continu (VLYSSIDES et al., 2004 ; DERMECHE et al., 2013).

Lorsque le peigne métallique du procédé Sinolea plonge dans la pâte d'olive, les gouttelettes d'huile vont adhérer à la surface métallique. Le raclage de ce peigne permet la récupération d'une huile pure. A chaque cycle seule une faible partie de l'huile est extraite ce qui fait du Sinolea un procédé relativement long (VEILLET, 2010). Par contre, la méthode de percolation est un processus automatisé qui n'exige pas beaucoup de main d'œuvre et utilise moins d'énergie que les autres procédés ce qui compense les faibles rendements.

Les grignons produits ont une teneur élevée en eau (50–65 %) et un contenu moyen en huile (8–12 %). Il est possible de diminuer leur volume en combinant la percolation avec la centrifugation ce qui conduit à un processus semi-automatisable (VEKIARI *et al.*, 2002). Cependant, ce procédé est peu appliqué du fait de ses coûts opérationnels élevés, de son entretien coûteux, de sa demande élevée en énergie et de son faible rendement. Par conséquent, la pâte d'olive obtenue après extraction doit être traitée en utilisant une méthode standard pour augmenter les rendements en huile.

Le tableau VII résume les avantages et les inconvénients des différentes méthodes d'extraction d'huile d'olive.

III- Caractérisation des sous-produits issus de l'extraction de l'huile d'olive

3.1 L'olive

L'olive est une drupe constituée de trois parties: l'épicarpe, le mésocarpe, et l'endocarpe (Figure 8). L'épicarpe (peau ou épiderme) est couvert de cire et reste vert tout au long de la phase de croissance puis devient pourpre, brun ou noir (selon la variété) une fois mature. Ce changement de couleur est dû à la formation des anthocyanes. La composition chimique des différentes parties de l'olive est donnée par le tableau VIII.

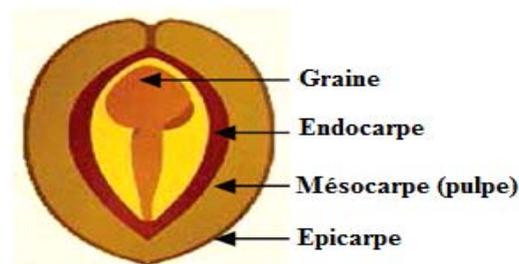


Figure 8 : Coupe transversale de l'olive (NIAOUNAKIS, 2006).

Tableau VII : Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'extraction de l'huile d'olive

	Avantages	Inconvénients
Extraction par presse	-Faible coût de l'équipement -Simplicité -Faible consommation énergétique -Faibles volume de margines	-Margines toxiques -Coûts de main d'œuvre -Huile de moins bonne qualité
Sinolea	-Processus automatisé -Faible consommation énergétique	-Coûts opérationnels élevés -Entretien coûteux
Extraction par centrifugation	-Réduction de la main-d'œuvre et des coûts de transformation. -Amélioration du rendement et de la productivité des huileries -Meilleure qualité d'huile -Automatisation complète et simplification mécanique 2 phases : -Economie d'eau et d'énergie -Faibles volumes de margines -Grande capacité de traitement - Meilleure qualité d'huile -Coûts d'exploitation faibles	3 phases : -Consommation élevée d'eau et d'énergie -Coûts des équipements. -Volumés de margines -Huile sensible à l'oxydation

Tableau VIII : Composition chimique de l'olive (%) (NIAOUNAKIS, 2006).

Composants	Pulpe d'olive	Endocarpe	graine
Eau	50-60	9,3	30
Huile	15-30	0,7	27,3
Composés azotés	2-3	3,4	10,2
Sucres non cellulosiques	3-7,5	41	26,6
Cellulose	3-6	38	1,9
Minéraux	1-2	4,1	1,5
Composés phénoliques	2,25-3	0,1	0,5-1
Autres composés	-	3,4	2,4

Le mésocarpe (pulpe ou chair) a une faible teneur en glucides et un contenu élevé en huile qui varient selon la variété et le stade de maturation du fruit. L'endocarpe (noyau) est constitué de la lignine, de fibres cellulosiques et hémicellulosiques. Il renferme la graine qui représente approximativement 3% de la masse totale du fruit et contient 2–4% de l'huile totale

de l'olive. La masse de l'olive varie de 2 à 12 g. Sa composition moyenne comprend de l'eau (50%), de l'huile (22%), des sucres non celluloses (19,1%), de la cellulose (5,8%), des protéines (1,6%) et des cendres (1,5%) (NIAOUNAKIS, 2006). L'olive contient également des CP à raison de 1–3% (m/m) de la pulpe fraîche (GARRIDO FERNANDEZ *et al.*, 1997). Ces CP sont principalement des secoiridoïdes, des acides phénoliques et des flavonoïdes. Les secoiridoïdes sont caractérisés par la présence de l'acide élénolique ou de ses dérivés. L'oleuropéine, le deméthyleuropeine, le ligstroside, et le nuzhenide sont les secoiridoïdes glycosides les plus abondants dans l'olive (GARIBOLDI *et al.*, 1986; GARRIDO FERNANDEZ *et al.*, 1997; SERVILI *et al.*, 2004). A noter que l'oleuropéine qui est responsable du goût amer de l'olive est concentrée dans le mésocarpe.

3.2 La paroi cellulaire des dicotylédones : cas de l'olive

La paroi cellulaire des végétaux est un réseau dynamique fortement organisé qui change tout au long de la vie cellulaire. En plus d'assurer la rigidité et la protection de la cellule contre différents stress biotiques ou abiotiques, elle permet aux nutriments, gaz et divers signaux intercellulaires d'atteindre la membrane plasmique. Cette paroi peut se révéler flexible et plastique de façon transitoire permettant la croissance pendant l'expansion et la différenciation cellulaire (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012).

3.2.1 Les polymères de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire végétale est un réseau dynamique spécialisé constitué par un mélange hétérogène de cellulose (30%), d'hémicelluloses (30%), de pectines (35%), de protéines (1 à 5 %) et de CP. (CARPITA et GIBEAUT, 1993; McCANN et ROBERTS, 1994). La cellulose et l'hémicellulose confèrent une rigidité à la paroi et les pectines fournissent la fluidité en formant une matrice gélatineuse. La cellulose et les hémicelluloses sont incorporés dans les polymères amorphes de pectine et stabilisés par des protéines et des CP. Les hémicelluloses se lient sur la surface du réseau de cellulose empêchant le contact direct entre les microfibrilles de cellulose. Les pectines sont liées aux hémicelluloses (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012) (Figure 9).

➤ La cellulose

La cellulose est le polysaccharide végétal le plus abondant. Il représente jusqu'à 1/3 de la masse sèche de la paroi et correspond à des chaînes linéaires de glucose (Glc) avec approximativement 8000 à 15000 résidus liés par des liaisons β -(1,4) (MARTINS *et al.*, 2011 ; OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012). Les chaînes celluloses sont liées par des

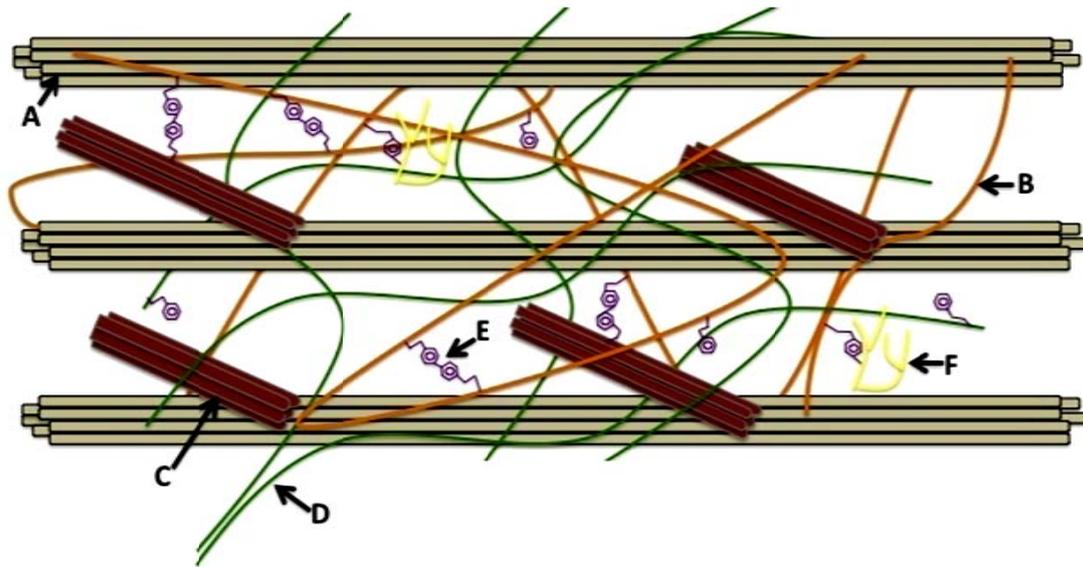


Figure 9: Représentation de la structure de la paroi cellulaire primaire végétale. (A) Cellulose, (B) Hémicellulose, (C) Protéines structurales, (D) Pectine, (E) Acides phénoliques, (F) Lignine (ACOSTA-ESTRADA et *al.*, 2014).

liaisons hydrogènes (intra et inter chaînes) et des interactions de Van der Waals et donnent lieu à des microfibrilles (BROWN, 2004 ; SOMERVILLE et *al.*, 2004 ; GLAZER et NIKAIDO, 2007). Ces dernières sont formées d'environ 30 à 36 chaînes. Les réseaux de microfibrilles de cellulose sont appelés macrofibrilles. Ils sont organisés en lamelles et forment une structure fibreuse dans les parois cellulaires (GLAZER et NIKAIDO, 2007). Au sein des fibres cellulosiques, il existe des régions amorphes et cristallines. La région cristalline a une structure rigide. Elle est formée par des chaînes linéaires parallèles stabilisées par les liaisons hydrogènes intermoléculaires. Cette organisation explique la non solubilité et la faible réactivité de la cellulose ainsi que sa résistance à l'hydrolyse. Les régions amorphes sont formées de chaînes de cellulose moins organisées et donc plus accessibles à l'hydrolyse enzymatique (MARTINS et *al.*, 2011).

➤ Les pectines

Les pectines représentent une famille de polysaccharides de structures et de fonctions extrêmement diverses et encore assez mal connues (SELVENDRAN, 1985 ; OCHOA-VILLARREAL et *al.*, 2012). Au sein de la plante, les pectines participent à des fonctions biologiques importantes telles que la croissance, le développement, la morphogénèse, la défense, l'adhérence cellule-cellule, la structuration et la porosité de la paroi, la signalisation cellulaire, l'hydratation et l'abscission des feuilles (MOHNEN, 2008).

La structure des pectines comprend des régions non substituées qualifiées de zones lisses « *smooth region* » d'homogalacturonane (HG) contenant presque exclusivement des résidus d'acides D-galacturonique (AGal) et des blocs de régions de rhamnogalacturonanes I et II (RG) plus fortement substituées appelées zones chevelues « *hairy region* » (VORAGEN et *al.*, 1995) (Figure 10).

L'HG est le polymère le plus abondant au sein des pectines (environ 60%) et correspond à une chaîne linéaire d' α -(1,4)-D-AGal (RIDLEY et *al.*, 2001). Plus de 50% des résidus d'AGal sont estérifiés avec des groupes méthyles (ou méthoxy) en position C-6. Suivant le degré de méthylesterification, on distingue des pectines hautement et faiblement méthylées (JARVIS et APPERLEY, 1995). L'HG peut être également O-acétylé en C-2 et C-3 (COSGROVE, 2005). Les RG-I constituent une famille de polysaccharides pectiques qui représentent 20-35% des pectines totales de la paroi. Ils correspondent à un squelette formé par la répétition d'un disaccharide composé d'AGal et de rhamnose (Rha): [4)-D-AGal-(1,2)-L-Rha-(1]-partiellement substitué. Entre 20 et 80 % des résidus Rha sont substitués sur leur C-4 par des oligosaccharides acides ou neutres. Ces oligosaccharides contiennent des chaînes linéaires ou branchées de résidus α -L-arabinose (Ara) et β -D-Gal. Il s'agit notamment d' α -(1,5)-L-arabinanes et/ou de β -(1,4)-galactanes ou d'arabinogalactanes de types I (arabino-4-galactane) et II (arabino-3,6-galactane) (VIERHUIS, 2002 ; OBRO et *al.*, 2004). Les α -(1,5)-L-arabinanes peuvent être ramifiés en C2 et/ou en C-3 par des résidus Rha. L'arabinogalactane de type I est une chaîne linéaire de résidus galactose (Gal) liés en β -(1,4) et ramifiée en α -(1,3) par des α -(1,5)-L-arabinanes. L'arabinogalactane de type II est un β -(1,3)-D-galactane ramifié en β -(1,6) et α -(1,6) par respectivement des D-Gal et L-Ara (BELDMAN et *al.*, 1997). Les arabinanes et les arabinogalactanes de types I et II peuvent être présents dans la paroi cellulaire comme chaînes latérales du RG I ou comme polysaccharides indépendants. En outre, les arabinogalactanes de type II sont souvent associés à des protéines riches en hydroxyproline (O'NEILL et *al.*, 1990; VORAGEN et *al.*, 1995).

Les RG-II sont les polysaccharides les plus complexes et les plus ramifiés de tous les polysaccharides pectiques. Ils sont un composant pectique mineur des parois cellulaires végétales (MATSUNAGA et *al.*, 2004). Cependant, leur structure hautement conservée suggère un rôle essentiel. Leur squelette comprend 8 à 9 résidus D-AGal liés en α -(1,4) auxquels sont greffés quatre chaînes latérales constituées de douze résidus glycosyls. Les deux premières chaînes latérales dites chaînes A et B sont ramifiées sur les C-2 des résidus

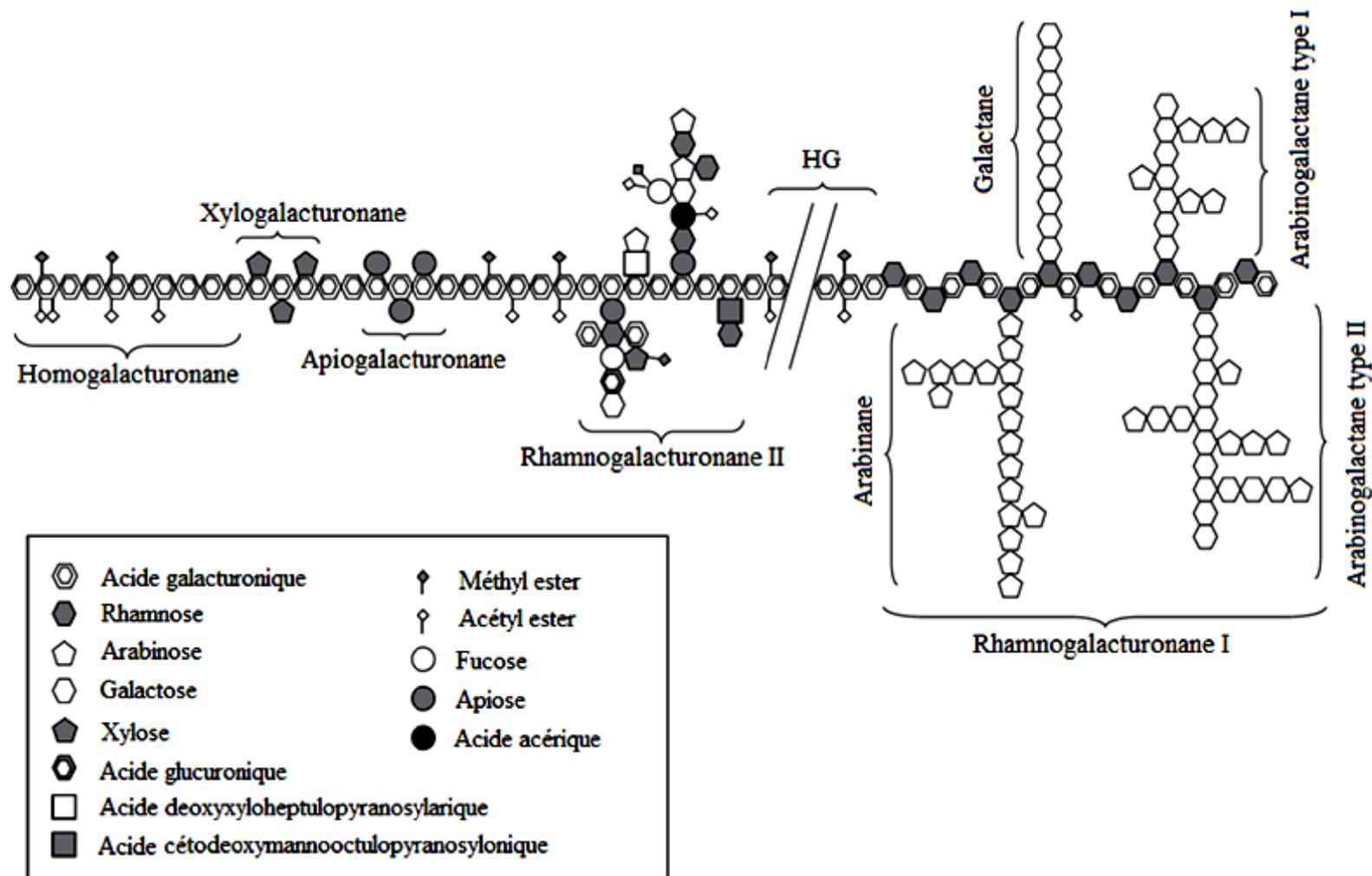


Figure 10 : Structure simplifiée des pectines (GULLON *et al.*, 2013).

AGal de la chaîne principale et les chaînes C et D sur les C-3 (ISHII et MATSUNAGA, 2001). La caractéristique des RG II est la présence de sucres rares ou même uniques tels que l'apiose, le 3-C-carboxy-5-désoxy-L-xylose (Xyl) ou acide acérique, l'acide 2-céto-3-désoxy-D-manno octulosonique, l'acide 2-céto-3-désoxy-D-lyxo heptulosarique, le 2-O-méthyl-L-fucose (Fuc), et le 2-O-méthyl-D-Xyl (McNEIL et *al.*, 1984; O'NEILL et *al.*, 1990; WHITCOMBE et *al.*, 1995; PELLERIN et *al.*, 1996; OCHOA-VILLARREAL et *al.*, 2012). Une autre classe de polysaccharides pectique correspond aux xylogalacturonanes (XGA). Les XGA sont des polysaccharides pectiques mineurs (environ 7%) possédant le même squelette de base d'AGal que les HG. Ces XGA peuvent être méthylés et/ou acétylés et possèdent des chaînes latérales de β -D-(1,3)-xylopyranoses (VORAGEN et *al.*, 2003).

➤ **Les hémicelluloses**

Les hémicelluloses sont des polysaccharides de faible poids moléculaire associés à la lignine et à la cellulose dans les parois cellulaires végétales (CHISTENSEN et *al.*, 2010). Contrairement aux pectines, les hémicelluloses constituent un groupe hétérogène variant considérablement en fonction des types de cellules et des espèces.

Les hémicelluloses des plantes dicotylédones sont principalement constituées de xyloglucanes, xylanes, mannanes et glucomannanes (OCHOA-VILLARREAL, et *al.*, 2012). Dans la plupart des types cellulaires une seule espèce d'hémicellulose prédomine. Par exemple, le xyloglucane est l'hémicellulose principale de la paroi cellulaire primaire chez les plantes dicotylédones, alors que dans les parois primaires des plantes monocotylédones, l'arabinoxylane est le polymère hémicellulosique le plus important (McNEIL et *al.*, 1984; BRETT et WALDRON, 1990). Les xyloglucanes se composent d'un squelette formé de D-Glc liées en β -(1,4) dont 75% des résidus peuvent être substitués en C-6 par du Xyl (Figure 11).

Quelques résidus Xyl sont substitués en C-2 avec un monosaccharide (Gal ou Ara) ou un disaccharide (Fuc-(1, 2)-Gal). En outre, les résidus Gal et Ara des chaînes latérales ainsi que les résidus Glc de la chaîne principale peuvent être acétylés (McNEIL et *al.*, 1984; HAYASHI, 1989; VINCKEN et *al.*, 1997; PAULY et *al.*, 2001 ; OCHOA-VILLARREAL, 2012).

Les xylanes ont une chaîne principale formée de résidus de Xyl liés en β -(1,4) pouvant être substituée en C-2 ou en C-3 avec des résidus d'Ara et des résidus d'acide glucuronique (AGlc) (ou son dérivé 4-O-méthyl). En outre, de longues chaînes latérales contenant le Xyl, l'Ara et le Gal ont été également rapportées. D'autres types de polysaccharides hémicellulosiques

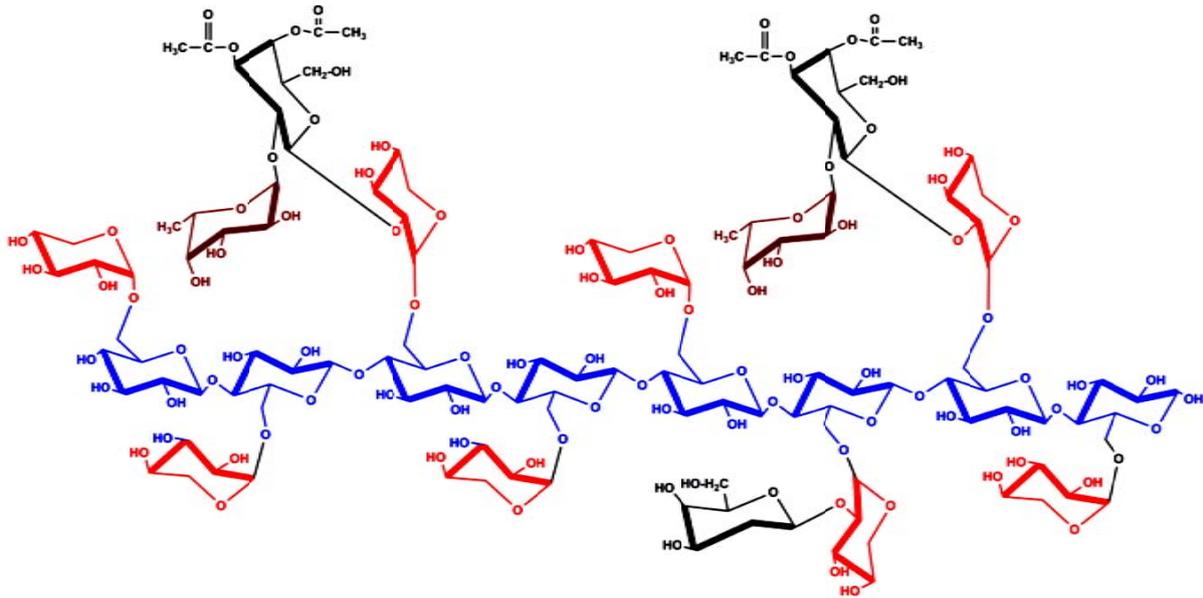


Figure 11. Structure du xyloglucane. Squelette de β -D-glucane; résidus α -D-Xyl; résidus α -D-Gal ; résidus α -L-Fuc (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012).

correspondent aux mannanes qui sont présents dans une large gamme de parois cellulaires (McNEIL *et al.*, 1984; BRETT et WALDRON, 1990). Actuellement, le nom hémicellulose est remplacé dans plusieurs publications par le terme "glycane de réticulation" (*cross linking glycans*) en raison des différentes interactions que peuvent avoir ces molécules avec d'autres polysaccharides constituant la paroi cellulaire.

3.2.2 Les polysaccharides pariétaux de l'olive

Plusieurs types de polymères polysaccharidiques ont été détectés dans les fractions isolées à partir des matériaux de la paroi cellulaire de la pulpe d'olive (COIMBRA *et al.*, 1999 ; VIERHUIS *et al.*, 2000 ; FERREIRA *et al.*, 2006). Les extractions sont réalisées en utilisant divers réactifs englobant des solvants organiques (éthanol, acétone, chloroforme, etc.), des détergents ioniques tels que le dodecylsulfate de sodium (SDS) ainsi que des agents chélateurs forts, tels que le cyclohexane-*trans*-1,2-diaminetetra-acétate ou l'imidazole.

Une grande diversité de polymères a été identifiée dans l'olive. Il s'agit principalement de pectines, de glycoprotéines riches en Ara, de xyloglucanes, de glucuronoxylanes, de xylanes, d'arabinoxylanes et d'arabinogalactoxyloglucanes (GIL-SERRANO *et al.*, 1986, 1988 ; JIMENEZ *et al.*, 1994 ; COIMBRA *et al.*, 1995b ; VIERHUIS, SCHOLS *et al.*, 2001).

L'extraction des pectines à partir de la paroi cellulaire commence souvent par une précipitation des résidus insolubles dans les alcools (RIA) pour éliminer les sucres simples, suivie d'une extraction séquentielle dans différents tampons. Un tampon froid ou chaud est utilisé pour extraire les pectines solubles, une solution contenant des agents chélateurs sert à extraire les pectines liées aux ions calcium et une solution alcaline est utilisée pour extraire les pectines liées à la paroi cellulaire par des liaisons esters et hydrogènes (VIERHUIS, 2002 ; WICKER *et al.*, 2014).

Les caractéristiques des pectines d'olives varient en fonction de la méthode d'extraction utilisée. La composition en sucres des pectines après extraction avec des tampons et des agents chélateurs révèlent des structures composées principalement de régions HG. Les pectines extraites avec les solutions alcalines diluées ont un faible contenu en HG et sont composées principalement de régions RG hautement substituées et riches en Ara (VIERHUIS, 2002). De même, les arabinanes obtenus suite à une extraction par un tampon acétate de sodium froid à température ambiante (pH 5,2) sont moins ramifiés et composés essentiellement de résidus Ara liés par des liaisons (1,5). Environ 30% de ces résidus sont substitués en C-3. Ce pourcentage passe à 70% lorsque des solvants alcalins forts, des solvants contenant des agents chélateurs ou des solvants portés à haute température sont utilisés (VIERHUIS, 2002).

Des β -(1,3)/(1,6)-D-galactanes ont également été mis en évidence dans des extraits hydrosolubles. Ils sont souvent liés de façon covalente aux résidus hydroxyproline de protéines. Ces galactanes peuvent correspondre à des chaînes latérales de RG I ou à des homopolysaccharides indépendants (O'NEILL *et al.*, 1990 ; VORAGEN *et al.*, 1995). Environ 20-30% des résidus Gal existent comme galactanes liés en (1,4) (VIERHUIS, 2002).

Les polysaccharides pectiques caractérisés dans l'olive ont un haut degré de méthylestérification et d'acétylation qui diminue légèrement avec la maturation (VIERHUIS et SCHOLS *et al.*, 2001). La maturation de l'olive est associée à plusieurs modifications des polysaccharides de la paroi cellulaire. Les changements les plus importants qui affectent les pectines lors de la maturation sont la dépolymérisation, l'hydrolyse des liaisons esters et une perte de certains oses neutres associés aux chaînes latérales (VIERHUIS, 2002). La principale conséquence associée est une augmentation de la solubilité de ces polymères.

Les hémicelluloses sont une classe de polysaccharides également abondants dans l'olive. Le xyloglucane de l'olive se compose d'un modèle de branchement (ramification) de type XXXG (VIERHUIS, SCHOLS *et al.*, 2001 ; VIERHUIS, YORK *et al.*, 2001). Les lettres G et X se rapportent respectivement à des résidus de Glc non ramifiés et au segment α -D-Xyl-

(1,6)- β -D-Glc. Des résidus d'Ara sont liés aux résidus de Xyl. Pour établir la position exacte de l'Ara, les deux oligosaccharides majeurs isolés après digestion du xyloglucane par une endo-(1,4)- β -D-glucanase ont été caractérisés par VIERHUIS, YORK et *al.* (2001). Les résultats montrent que le xyloglucane de l'olive est constitué principalement de deux nouveaux oligosaccharides XXSG et XLSG. Les lettres S et L se réfèrent aux segments α -L-Ara-(1,2)- α -D-Xyl-(1,6)- β -D-Glc et β -D-Gal-(1,2)- α -D-Xyl-(1,6)- β -D-Glc respectivement. Sur les deux oligosaccharides, trois résidus Glc sur quatre sont substitués par des résidus Xyl en C-6. (VIERHUIS, 2002). La figure 12 schématise la structure du xyloglucane de l'olive.

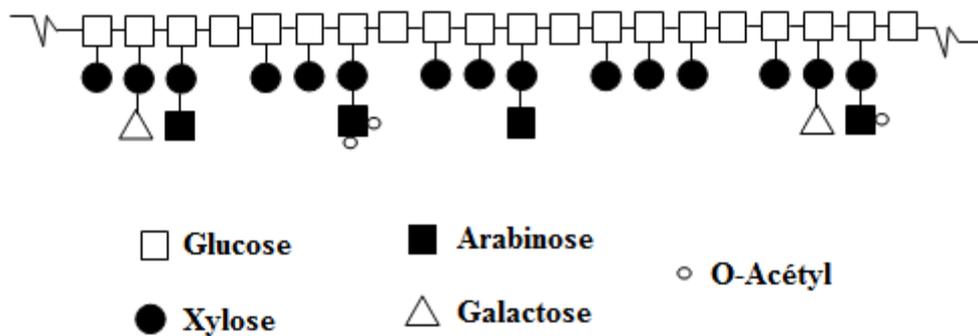


Figure 12: Structure du xyloglucane de l'olive. □: 1- β -D-Glcp-(4,- ; ●: α -D-Xylp-(1,6)-; Δ: β -D-Galp-(1,2)- ; ■: α -L-Araf-(1,2) (VIERHUIS, 2002).

Du xylane a également été mis en évidence dans la fraction hémicellulosique de la paroi cellulaire de l'olive (VIERHUIS, SCHOLS et *al.*, 2001).

Le tableau IX donne la composition en polysaccharides de la paroi cellulaire de l'olive.

Tableau IX : Composition en polysaccharides de la paroi cellulaire de l'olive (*Olea europaea* cv *koroneiki*) (tr = trace) (MAFRA et *al.*, 2001).

Polysaccharides	Composition (% g/100 g)
Polysaccharides pectiques	39
Galacturonanes	20
Arabinanes	13
Rhamnogalacturonane	3
Galactane	3
Xyloglucane	15
Glucuronoxylane	14
Mannane	2
Glycoprotéine riche en Ara	Tr
Cellulose	30

3.2.3 Les interactions entre les différents composants de la paroi cellulaire

Au sein de la paroi cellulaire végétale, diverses réticulations covalentes et non-covalentes existent entre les polysaccharides. Ces réticulations et assemblages incluent des ponts ioniques, des liaisons borate-diol esters, des interactions hydrophobes, des liaisons covalentes impliquant des acides phénoliques, et également quelques autres types de liaisons covalentes telle que les liaisons esters et éthers (SILA *et al.*, 2009).

Il existe un certain nombre de théories sur l'interaction entre les différents composants des parois cellulaires primaires. Le modèle de "Keegstra et d'Albersheim " (KEEGSTRA *et al.*, 1973 ; GRASSBY, 2008) présente un xyloglucane étroitement lié à la cellulose par des liaisons hydrogènes et dont les extrémités réductrices sont liées par covalence aux chaînes latérales (galactanes) du RG I. D'autres complexes faisant intervenir les pectines ont été décrits tels que le complexe xyloglucane-pectine chez les cellules de roses cultivées en suspension (THOMPSON et FONT FRIRE, 2000), le complexes xylane-pectine chez l'asperge (WALDRON et SELVENDRAN, 1992), le complexes pectine-xylane-xyloglucane chez le chou-fleur (FEMENIA *et al.*, 1999) et le complexe xylane-xyloglucane dans la pulpe d'olive (COIMBRA *et al.*, 1995b).

Le modèle "Fry" propose que les xyloglucanes et les arabinoxyanes soient liés par des liaisons hydrogènes à la cellulose (GRASSBY, 2008). En outre, le RG I est lié à la cellulose par des liaisons esters. Les chaînes latérales d'arabinanes et de galactanes du RG I peuvent également interagir spontanément avec la cellulose (ZYKWINSKA *et al.*, 2007). Par ailleurs, les polymères d'arabinoxyanes sont liés entre eux par l'intermédiaire d'acide di-férulique, tout comme le RG I. Il a été suggéré que la fraction arabinogalactane est liée au RG I via des ponts calciques. COIMBRA *et al.* (1994), ont constaté que des xyloglucanes sont liés aux glucomannanes et aux glycoprotéines riches en hydroxyproline dans les fractions neutres des hémicelluloses des olives. JIMENEZ *et al.* (1994), ont découvert également d'autres associations de type xylane-lignine, xylane-rhamnogalacturonane, rhamnogalacturonane-xyloglucane-cellulose et cellulose-xylane-glucuronoarabinoxylane. De plus, des glucuronoxyanes avec un faible degré de polymérisation et des complexes xylane-pectine sont liés aux fragments de lignine dans la pulpe d'olive (COIMBRA *et al.*, 1995b).

Des réticulations entre les polymères de la paroi cellulaire par des CP appartenant à la classe des acides hydroxycinnamiques (acides féruliques, p-coumarique, sinapiques, etc.) ont été décrites par la littérature. Ainsi, une réticulation des acides hydroxycinnamiques avec les résidus terminaux d'Ara (C-5) des glucuronoarabinoxylanes (KATO *et al.*, 1983; HARTLEY *et al.*, 1990), avec le résidu Xyl terminal du xyloglucane (ISHII, PANAUD *et al.*, 1990), avec

les chaînes latérales du RG I: Gal (en position C-6 dans le squelette β -(1,4)-D-galactane) et Ara (en position C-2 et C-5 du squelette α -(1,5) arabinane) ont été démontrées (LAVIGNE et *al.*, 2004). Il a été estimé que 45 à 50% des acides féruliques sont liés en position C-6 des résidus Gal et 50 à 55% en position C-2 des résidus Ara des pectines de la pulpe de betterave (RALET et *al.*, 1994). Chez les espèces contenant de faibles quantités de pectine, l'acide férulique peut être lié à l'Ara des arabinoxyanes (ISHII, 1997) ou au Xyl des xyloglucanes (ISHII, HIROI et *al.*, 1990).

L'acide férulique estérifié aux polysaccharides des parois cellulaires peut former des réticulations par dimères. Il y a deux mécanismes par lesquels la dimérisation des acides féruliques est réalisée : un mécanisme photochimique (UV) et un autre radicalaire. Ce dernier mécanisme est dominant et forme des déhydrodimers d'acide férulique (BUNZEL et *al.*, 2004). L'acide férulique est un CP simple abondant dans les parois cellulaires. GEISSMANN et NEUKOM, (1971) ont démontré qu'en présence de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène, deux unités d'acides féruliques (estérifiées aux polysaccharides) sont susceptibles de former une réticulation covalente. De même, les oligomères (dimères, trimères, et tétramères) d'acide férulique produits par des activités peroxydases interviennent dans l'agrégation entre polysaccharides ou entre polysaccharides et autres polymères comme les lignines (FRY et *al.*, 2000 ; ROUAU et *al.*, 2003 ; BUNZEL et *al.*, 2006 ; BUNZEL, 2010). Ces réticulations peuvent être renforcées par la formation de liaisons éthers entre les polysaccharides et les groupes hydroxyles des résidus d'acide férulique (BURR et FRY, 2009). D'autres liaisons éthers impliquant les CP ont été rapportées dans les parois lignifiées entre l'acide férulique et la lignine (SCALBERT et *al.*, 1985; WALLACE et *al.*, 1995; BURR et FRY, 2009).

La figure 13 donne les structures de certaines réticulations covalentes entre polysaccharides et CP. La figure 13C présente le mécanisme probable de la formation de la liaison éther entre les polysaccharides et l'acide férulique. Dans l'étape (1) deux polysaccharides estérifiés par de l'acide férulique sont liés, probablement par une peroxydase, donnant une structure quinone méthide. Dans l'étape (2) la quinone méthide réagirait avec le groupe OH d'un ose d'une autre chaîne polysaccharidique pour former une liaison éther de benzyl.

Les liaisons ioniques jouent également un rôle important dans le maintien de la structure supramoléculaire de la paroi. Les polymères d'HG non méthylés chargés négativement peuvent agir avec les ions Ca^{2+} pour former un gel stable avec d'autres

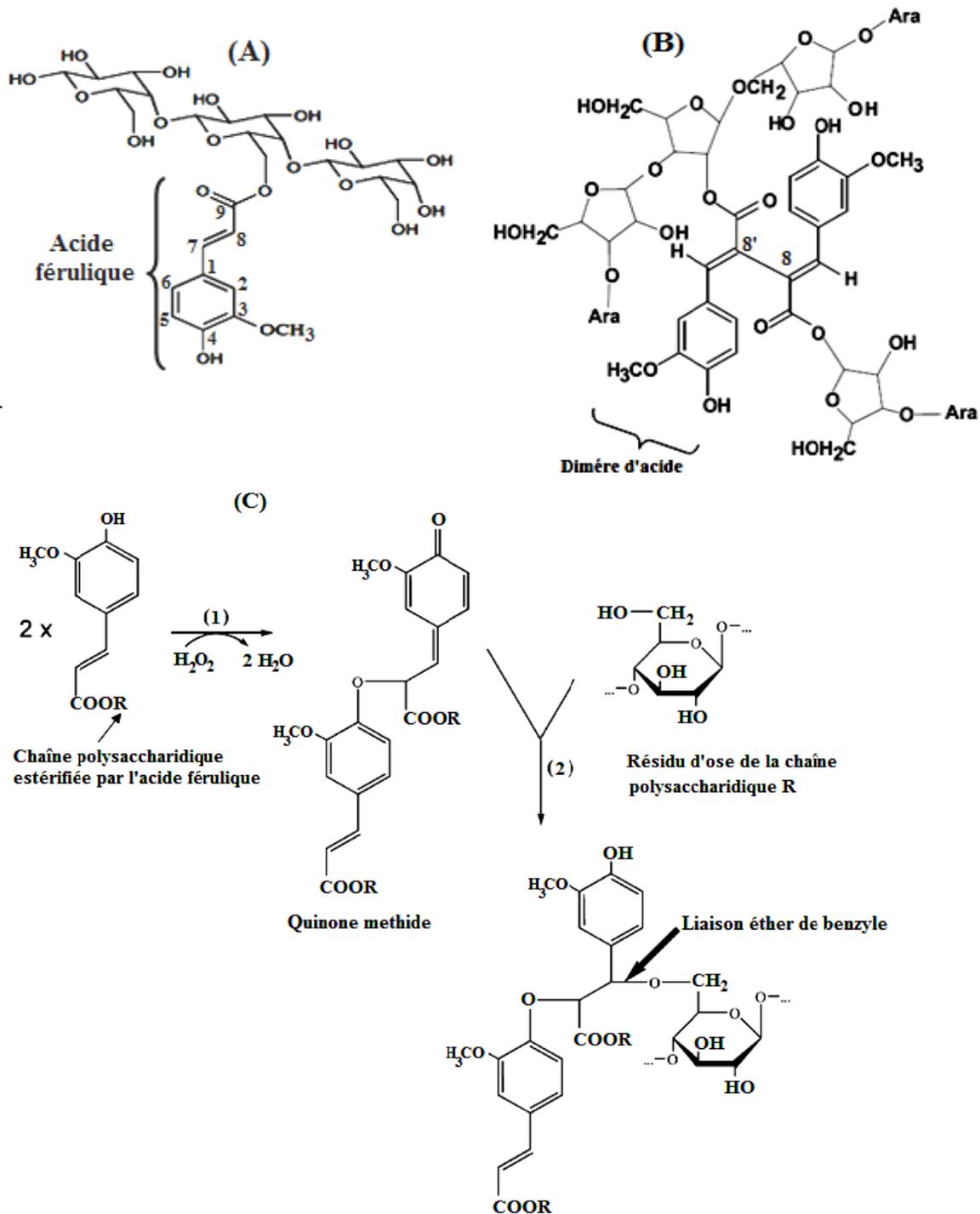


Figure 13 : Liaisons de l'acide férulique aux polysaccharides. (A): Liaison au Gal de la chaîne latérale des pectines. (B): formation d'un dimère d'acide férulique entre les résidus d'Ara de la chaîne latérale des pectines. (C): mécanisme probable de la formation de la liaison éther entre polysaccharide et acide férulique (KERR et FRY, 2004 ; HARBAUM, 2007; ZAIDEL et MEYER, 2012).

molécules de pectine selon le modèle en boîte à œufs. Ce modèle de gélification se produit au sein de la paroi cellulaire végétale et fait intervenir 70% des pectines totales (GRANT *et al.*, 1973 ; JARVIS ET APPERLEY, 1995). Des liaisons esters, impliquant un atome de bore et les résidus apiose (C-2 et C-3) de deux molécules de RG II ont été également rapportées. Elles conduisent à la formation de dimères. Environ 95% des RG-II sont sous la forme de dimères (KOBAYASHI *et al.*, 1996 ; ISHII et MATSUNAGA, 2001). Ceci signifie que plus de quatre polysaccharides différents peuvent être potentiellement liés ensemble.

Il a été rapporté que des liaisons ioniques peuvent également apparaître entre les protéines basiques de la paroi cellulaire, telles que l'extensine, et les acides uroniques des régions homogalacturonanes (McCANN et ROBERTS, 1994 ; SHOWALTER, 2001 ; ZYKWINSKA *et al.*, 2007). Ces phénomènes de réticulations sont associés à certaines propriétés de la paroi cellulaire telles que l'arrêt de la croissance, la résistance aux agents pathogènes et la dégradation de la paroi cellulaire (BUANAFINA, 2009).

3.3 Composition chimique des sous-produits oléicoles

3.3.1 Composition générale

Les caractéristiques chimiques principales des margines et des grignons d'olives sont récapitulées dans le tableau X.

Les margines sont des effluents liquides de couleurs rouge-à-noire légèrement acides, à conductivité élevée. Leurs compositions varient qualitativement et quantitativement selon la variété d'olive, les conditions climatiques, les pratiques culturelles, le temps de stockage (entreposage) des olives ainsi que le procédé d'extraction. En plus de l'eau (83 –92%), les composants principaux des margines sont les CP, les sucres, et les acides organiques (Tableau X). Les margines contiennent également des éléments minéraux, tels que le potassium.

La composition chimique des grignons varie également en fonction de la variété d'olive, des conditions de culture et du procédé utilisé pour extraire l'huile. La cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont les composants principaux des grignons. Cependant, des lipides résiduels et des protéines y sont également présents (RODRIGUEZ *et al.*, 2008). Les grignons humides sont formés d'eau de végétation, de morceaux de noyaux et de pulpe. Leur taux d'humidité est élevé (65-75%), comparé à celui des grignons issus des systèmes d'extraction traditionnel (22-25%) et à trois phases (40-45%) (ALBA-MENDOZA *et al.*, 1990 ; ALBURQUERQUE *et al.*, 2004). Les contenus en matière sèche et en cendres des grignons des systèmes à deux et trois phases sont respectivement de 87,1-94,4% et 1,4-4%. L'analyse de la composition minérale montre que tout comme les margines, les principaux éléments minéraux des

Tableau X : Caractéristiques chimiques des margines et des grignons d'olives (DERMECHE et al., 2013).

Paramètres	Sous-produits oléicoles		
	Margines	Résidus solides	
		Grignons	Grignons humides
Pulpe (%)		12–35	10–15
Matière sèche (%)	6,33-7,19	87,1-94,4	
Taux de cendre (%)	1	1,7–4	1,42-4
pH	2,24-5,9		4,9-6,8
Conductivité électrique (dS/m)	5,5-10		1,78-5,24
Carbone total (%)	2-3,3	29,03-42,9	25,37
Matière organique (%)	57,2-62,1	85	60,3-98,5
Carbone organique (g/L)	20,19-39,8		
Solides en suspension totaux (g/L)	25-30		
Carbone inorganique (g/L)	0,2		
Azote total (%)	0,63	0,2-0,3	0,25-1,85
Lipides (%)	0,03-4,25	3,5–8,72	3,76-18,0
CP totaux (%)	0,63-5,45	0,2-1,146	0,4-2,43
Sucres totaux (%)	1,5-12,22	0,99-1,38	0,83-19,3
Protéines totales (%)		3,43-7,26	2,87-7,2
Elements minéraux (%)			
P	0,19	0,03–0,06	0,03-0,14
K	0,44-5,24	0,1–0,2	0,63-2,9
Na	0,15		0,02-0,1
Ca	0,42-1,15		0,23-1,2
Mg	0,11-0,18		0,05-0,17
Fe	0,26 ± 0,03		0,0526-0,26
Cu	0,0021		0,0013-0,0138
Mn	0,0015		0,0013-0,0067
Zn	0,0057		0,0010-0,0027
Cellulose (%)		17,37-24,14	14,54
Hémicellulose (%)		7,92-11,00	6,63
Lignine (%)		0,21-14,18	8,54

grignons sont le potassium, suivi du calcium et du sodium. Les concentrations de ces sels hydrosolubles sont plus élevées dans les margines. En outre, la quantité en eau des margines et des grignons humides détermine leur richesse en CP totaux et en sucres hydrosolubles.

3.3.2 Composés phénoliques

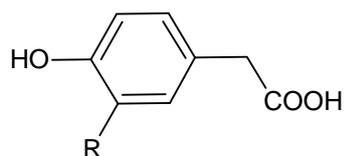
Les CP englobent plusieurs substances organiques qui possèdent toutes un noyau aromatique qui porte un ou plusieurs substituants hydroxyles et une chaîne latérale fonctionnelle. Les CP naturels correspondent à des molécules simples telles que les acides phénoliques et des composés fortement polymérisés tels que des tannins. Les formes les plus

rencontrées des CP sont les formes conjuguées avec des glucides (mono, di ou oligosaccharides), des acides organiques et des lipides, ou même avec d'autres CP. Ces composés sont liés aux groupes hydroxyle ou, moins fréquemment, aux atomes de carbone aromatiques, par des liaisons esters et/ou éthers (BRAVO, 1998). Les principales classes de CP correspondent aux acides phénoliques, aux flavonoïdes, aux lignanes, aux stilbènes, aux tannins et aux lignines (SHAHIDI et NACZK, 2004). Ils sont responsables des couleurs des fruits et légumes qu'ils protègent contre les pathologies et la lumière UV.

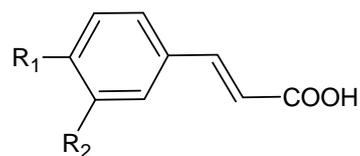
Les CP sont abondants dans les sous-produits oléicoles (Figure 14) où ils sont répartis en fonction de leur polarité. Les principales familles de CP qui y ont été identifiées sont les acides phénoliques, les secoiridoïdes et les flavonoïdes. Le procédé utilisé pour extraire l'huile, la variété de l'olive, la phase de maturation du fruit, le climat, les conditions de stockage des olives avant l'extraction et les pratiques agronomiques affectent qualitativement et quantitativement le contenu en CP des margines et des grignons (ALLOUCHE et *al.*, 2004 ; OBIED et *al.*, 2005).

3.3.2.1 Composés phénoliques des margines

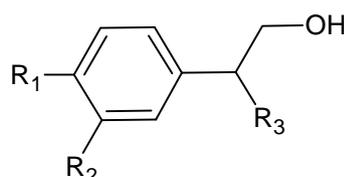
Une grande partie des CP de la pulpe d'olive se retrouve dans les margines après extraction de l'huile par les systèmes presse ou à trois phases. Bien que le système de centrifugation à deux phases produise une huile d'olive plus riche en CP la majorité de ces composés (environ 98%) demeure dans le grignon humide (LESAGE-MEESSEN et *al.*, 2001 ; VIERHUIS, SERVILI et *al.*, 2001). La composition phénolique des margines varie fortement entre les études. La fraction phénolique des margines est caractérisée par une grande complexité, comme démontré par BIANCO et *al.* (2003) qui ont identifié 20 CP différents. Les classes hydrophiles y sont logiquement les plus représentées et incluent les alcools phényliques, les acides phénoliques, les dérivés de secoiridoïdes, les flavonoïdes (lutéoline, luteolin-7-glucoside) et les lignanes. VISIOLI et *al.* (2002) ont rapporté que l'oleuropéine, un ester d'acide élénolique et d'hydroxytyrosol, est un composé majeur des margines, tandis que ALLOUCHE et *al.* (2004) n'ont pas identifié ce composé dans ces mêmes sous-produits. Cette différence est expliquée par le stade de maturation des olives ainsi que par la dégradation de l'oleuropéine en acide élénolique et en hydroxytyrosol par une estérase pendant l'extraction de l'huile d'olive (AMIOT et *al.*, 1989 ; VISIOLI et *al.*, 2002).



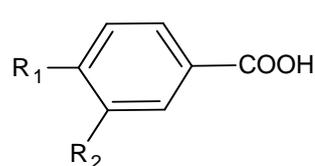
R = H : Acide 4-hydroxyphenyl acétique
 R = OH : Acide 3,4-dihydroxyphenyl acétique



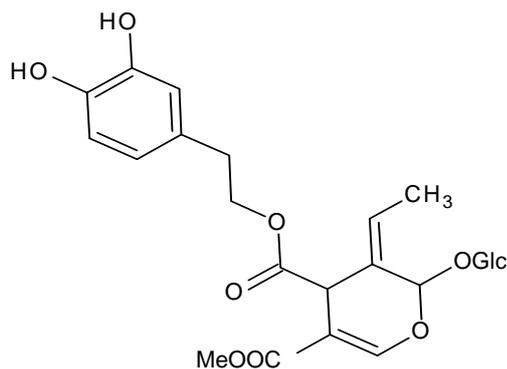
R₁ = H, -R₂ = H : Acide cinnamique
 R₁ = OH, -R₂ = H : Acide *p*-coumarique
 R₁ = OH, -R₂ = OH : Acide caféique
 R₁ = OH, -R₂ = OCH₃ : Acide férulique



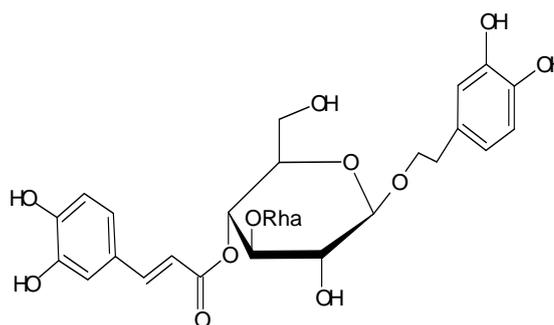
R₁ = OH, -R₂ = H, -R₃ = H : tyrosol
 R₁ = OH, -R₂ = OH, -R₃ = H : hydroxytyrosol
 R₁ = OH, -R₂ = OH, -R₃ = OH : 3,4-dihydroxyphenylglycol



R₁ = OH, -R₂ = H : 4-acide hydroxybenzoïque
 R₁ = OH, -R₂ = OH : acide protocatechuique
 R₁ = OH -R₂ = OCH₃ : acide vanillique



Oleuropéine



Verbascoside

Figure 14 : Structure des principaux composés phénoliques des sous-produits issus de l'extraction de l'huile d'olive. Me : groupement CH₃. (DERMECHE *et al.*, 2013).

3.3.2.2 Composés phénoliques des grignons.

Les noyaux et les graines d'olives contiennent une quantité significative de CP. Trois glucosides, incluant le salidroside, le nuzhénide et le nuzhénide-oleoside, y ont ainsi été identifiés (MAESTRO-DURAN *et al.*, 1994). Le nuzhénide est le CP majeur des graines d'olives suivi du verbascoside également détecté dans la pulpe (RYAN *et al.*, 2003). Le tyrosol et l'hydroxytyrosol ont été détectés dans les noyaux d'olives alors que la décarboxyméthyloléuropeine a été isolée dans la pulpe, les graines et les noyaux d'olives (FERNANDEZ-BOLÁNOS *et al.*, 1998). Les CP les plus abondants dans les grignons

humides sont le tyrosol et l'hydroxytyrosol (FERNANDEZ- BOLÃNOS et *al.*, 2002) ainsi que l'acide p-coumarique. A un degré moindre, l'acide vanillique est également présent dans ce sous-produit (LESAGE-MEESSEN et *al.*, 2001). D'autres composés mineurs ont également été décrits à l'exemple de la rutine, de l'acide caféoylquinique, de la lutéoline-4-glucoside, de la lutéoline-7-rutinoside et de l'oléoside.

3.3.3 Polysaccharides

La cellulose, l'hémicellulose et les pectines sont les principaux polysaccharides décrits dans les sous-produits oléicoles (FERNANDEZ- BOLÃNOS et *al.*, 1999 ; CARDOSO et *al.*, 2003 a, b ; GALANAKIS et *al.*, 2009 ; GALANAKIS et *al.*, 2010a). Les polysaccharides solubles ont été identifiés dans la pulpe et dans les margines, tandis que les polysaccharides insolubles ont été décrits dans les sous-produits solides tels que les grignons. Approximativement 5–10% des polysaccharides des olives sont hydrosolubles et se retrouvent dans les margines (VIERHUIS et *al.*, 2003).

VIERHUIS et *al.* (2003) et GALANAKIS et *al.* (2009 ; 2010a, 2010b, 2010c) ont étudié la composition en polysaccharides des margines et mis en évidence une fraction pectique dominante. La composition en monosaccharides des pectines extraites par les différents travaux est variable notamment en ce qui concerne sa teneur en Glc et en Gal. GALANAKIS et *al.* (2010a) ont montré que les extraits polysaccharidiques hydrosolubles sont exclusivement composés de pectine formée uniquement d'AGal et d'Ara. De même, VIERHUIS et *al.* (2003) ont caractérisé des pectines riches en Ara et en Gal dans le RIA extrait des margines. Les mêmes auteurs ont rapporté que l'Ara est principalement présent comme résidu terminal de RIA sous forme d'arabinane dont les résidus sont liés par des liaisons (1,5). Environ 13% de ces résidus d'Ara sont mono-substitués par l'Ara avec des points de ramification en C-2 ou en C-3. D'autre part, la plupart des résidus Gal identifiés dans les margines sont sous forme de (1,3)/(1,6) galactanes. Cependant 20% des résidus Gal existent sous forme de galactanes liés en (1,4).

Les grignons ont un contenu élevé en lignine, cellulose et d'hémicellulose. La composition en sucres des noyaux et de la graine d'olive a été déterminée pour plusieurs variétés d'olives. Les principaux composants détectés étaient la cellulose dans le noyau et l'hémicellulose dans la graine (VIERHUIS et *al.*, 2003, RODRIGUEZ et *al.*, 2008). Le tableau XI donne la composition en fibres du noyau d'olive et de sa graine.

Tableau XI : Composition en fibres des noyaux et graines de différentes variétés d'olives en pourcentage massique (g/100 g) (RODRIGUEZ et al., 2008).

	noyau	graine
<i>Cellulose</i>	29,79-34,35	2,36-3,91
<i>Lignine</i>	20,63-25,11	2,19-4,60
<i>Hémicellulose</i>	21,45-27,64	4,02-8,95

COIMBRA et al. (1995a), ont isolé et caractérisé les polysaccharides des noyaux d'olives et ont rapporté qu'ils contiennent 62% de sucres totaux riches en Xyl (hémicellulose) et en Glc (cellulose). Un traitement de délignification permet l'extraction des polysaccharides à partir du noyau d'olive. Les glucuronoxylanes sont les principaux polysaccharides non cellulosiques identifiés. Pour une extraction totale des fractions polysaccharidiques, certains procédés ont été développés. Le chauffage à la vapeur haute pression suivie d'une décompression rapide, un processus connu sous le nom d'explosion à la vapeur (La steam explosion), est un prétraitement efficace pour la transformation des déchets riches en matière cellulosique, hemicellulosique et lignocellulosique telles que le noyau d'olive (DUFF et MURRAY, 1996 ; FERNANDEZ-BOLÁNOS et al., 1998, 1999). Ce prétraitement conduit à l'autohydrolyse des hémicelluloses en oligomères hydrosolubles ou en monosaccharides (NIDETZKY et al., 1993). FELIZON et al. (2000), ont utilisé la technique d'explosion à la vapeur pour traiter les grignons d'olives issus du système à 3 phases. Après fractionnement, les principaux composants de la fraction hydrosoluble étaient des polysaccharides mais aussi des oses tels que le Glc et l'Ara. Des traitements supplémentaires de délignification et d'hydrolyse enzymatique étaient nécessaires pour obtenir des concentrations plus élevées en sucres fermentescibles.

La présence de pectines dans les grignons d'olive a été également mise en évidence (Cardoso et al., 2002, 2003a ; VIERHUIS et al., 2003). VIERHUIS et al. (2003) ont en effet montré que l'Ara et les acides uroniques constituent plus de 75% des sucres présents dans les fractions riches en pectines isolées à partir des grignons. La teneur en Gal de ces fractions était relativement faible (6–14%). CARDOSO et al. (2003a) ont rapporté que l'extrait pectique des grignons est constitué majoritairement de 48% d'AGal et de 31% d'Ara en plus de la présence de Gal, de Glc et de Rha.

La figure 15 montre la structure proposée pour un arabinane de grignon d'olives (CARDOSO et al., 2002). La figure 16 résume les méthodes d'extraction ainsi que les polymères polysaccharidiques isolés à partir des sous-produits oléicoles.

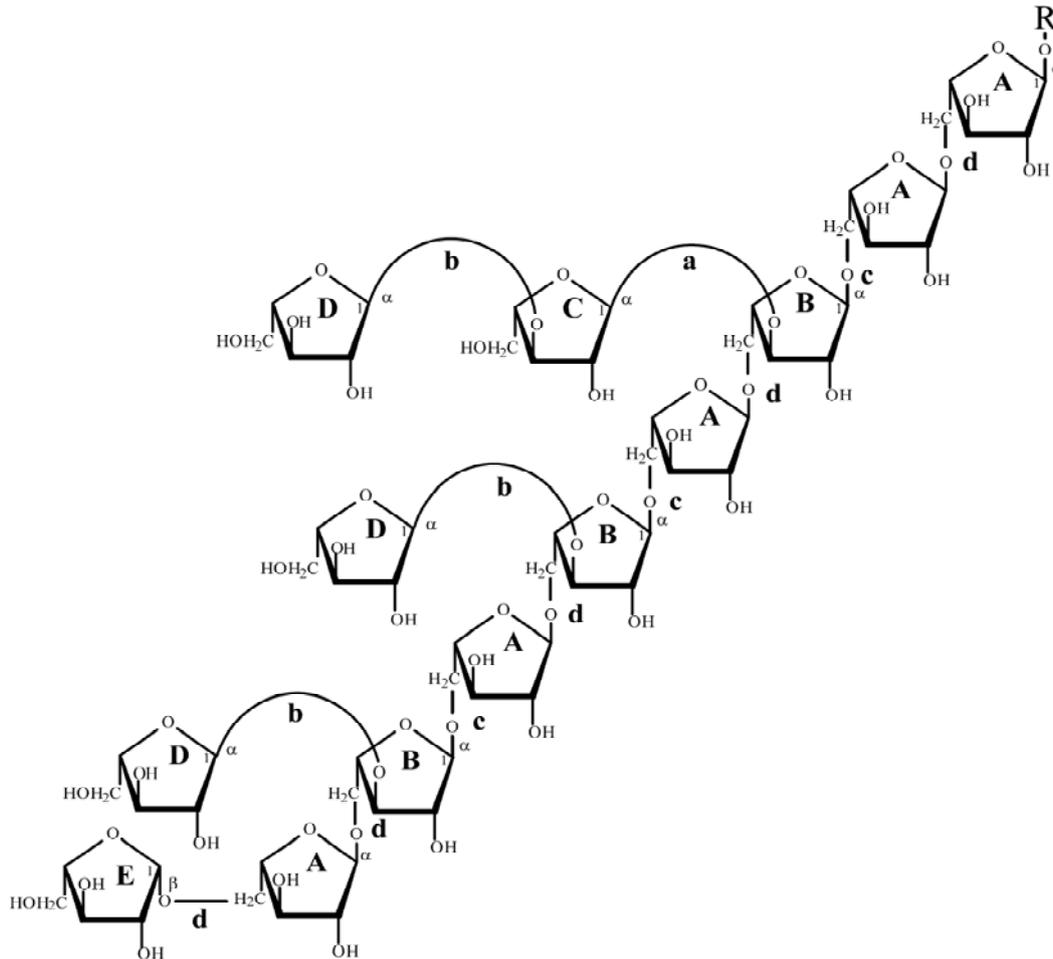


Figure 15 : Structure proposée d'un arabinane isolé à partir de grignons d'olives (CARDOSO et al., 2002).

3.4 Impacts des sous-produits oléicoles sur l'environnement

Les margines, principaux sous-produits de l'industrie oléicole posent un problème écologique important pour les pays producteurs. Cet impact négatif sur l'environnement s'explique par leur charge élevée en matières organiques toxiques (particulièrement les CP peu biodégradables), leur DCO (jusqu'à 320 g/L) et DBO (plus de 132 g/L) élevées, leur forte charge saline, et leur pH acide (STASINAKIS et al., 2008 ; DERMECHE et al., 2013).

La pollution due aux margines touchent le sol en induisant des effets négatifs sur la croissance des plantes et leur germination, sur l'activité microbienne et sur les propriétés physico-

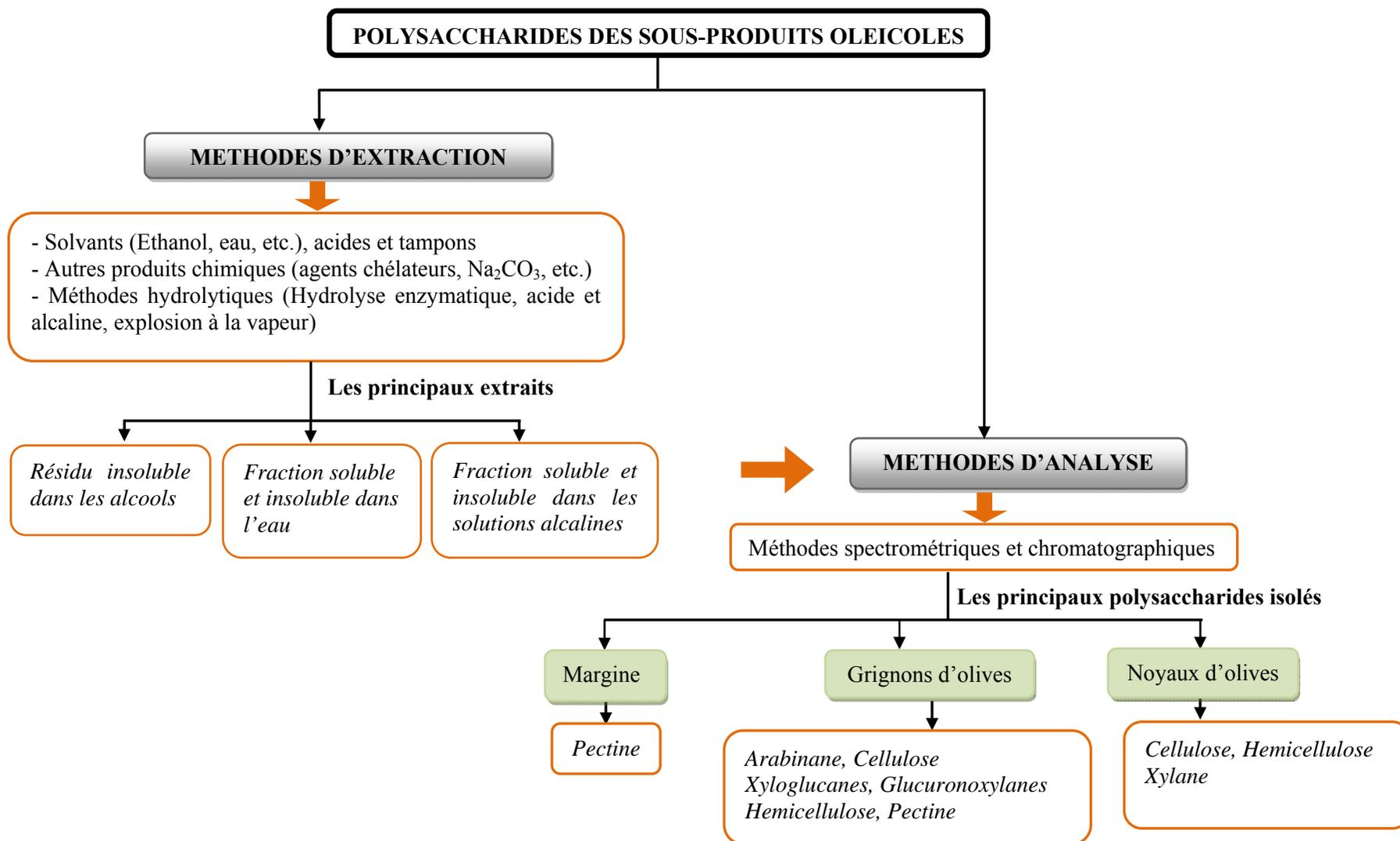


Figure 16 : Extraction et composition des polysaccharides des sous-produits oléicoles (NADOUR et al., 2012).

chimiques des sols (PAREDES et *al.*, 1987). Les margines polluent également l'eau en diminuant la disponibilité de l'oxygène pour d'autres organismes vivants ce qui entraîne un déséquilibre de l'écosystème aquatique qualifié d'eutrophisation (DANELLAKIS et *al.*, 2011). La pollution de l'air par les margines est également rapportée. Elle est due à un processus de fermentation qui conduit à l'émission de méthane et d'autres gaz irritants tels que le sulfure d'hydrogène (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2004).

3.5 Valorisation, utilisation et bioconversion des sous-produits oléicoles

Face à la toxicité et la pollution causées par les margines plusieurs techniques de traitement ont été développées en vue de diminuer leur DCO, DBO et concentrations en composés organiques tels que les CP.

Plusieurs systèmes d'épuration et de procédés de traitement des margines sont cités par la littérature. Ils peuvent être classés en trois catégories:

- des procédés physiques tels que la distillation, l'évaporation, l'ultrafiltration, l'osmose inverse et l'électrodialyse.
- des procédés chimiques tels que la coagulation-floculation et l'adsorption.
- des procédés biologiques

Plusieurs traitements différents doivent être appliqués sur une même margine pour une réduction significative de la DCO et donc de la toxicité de ces effluents.

Sont citées ci-après les principales voies de valorisation des sous-produits oléicoles.

3.5.1 Utilisations agricoles

Le contenu élevé en eau, matière organique et nutriments font des margines un bon candidat pour sa bioconversion en engrais après élimination des CP. L'élimination de ces derniers est réalisée par des traitements microbiens aérobies avec des levures et des champignons filamenteux (ASSAS et *al.*, 2002 ; BEN SASSI et *al.*, 2008). La détoxification des margines peut également être réalisée en utilisant des lactobacilles, *Azotobacter vinelandii* et *Bacillus pumilis* (PAPADELLI et *al.*, 1996 ; RAMOS-CORMENZANA et *al.*, 1996), des consortia bactériens aérobies ainsi que des micro-algues (RANALLI, 1992 ; BORJA et *al.*, 1995 ; BENITEZ et *al.*, 1997 ; PINTO et *al.*, 2003).

Le compostage est également l'une des technologies assurant la transformation des margines en fertilisant. Le compostage de déchets organiques est un processus bio-oxydant impliquant la minéralisation et l'humidification partielle de la matière organique (ZENJARI et *al.*, 2006). Un co-compostage des grignons et des margines a été également rapporté. Les

composts obtenus possédaient une valeur agronomique élevée (FILIPPI et *al.*, 2002 ; MARI et *al.*, 2003 ; ALBURQUERQUE et *al.*, 2007 ; AVIANI et *al.*, 2010).

3.5.2 Production de bioénergies

Les margines constituent un substrat candidat pour la production de biohydrogène, de biométhane et de bioéthanol de par leur contenu en sucres, en acides volatils, en polyols et en lipides.

Des études se sont focalisées sur le méthane obtenu par une digestion anaérobie des margines (FEDORAK et HRUDEY, 1984 ; RINCON et *al.*, 2009), par des procédés photo-fermentatifs (EROGLU et *al.*, 2008 ; EROGLU et *al.*, 2009) ou par fermentation à l'obscurité (NTAIKOU et *al.*, 2009).

Un grand nombre d'espèces microbiennes peuvent produire du biohydrogène par des voies métaboliques simples ou combinées. A titre d'exemple, l'utilisation des bactéries photosynthétiques et des sous-produits oléicoles (margines et grignons humides) a permis la production du biohydrogène après dilution afin d'atténuer l'effet inhibiteur des CP sur la biomasse microbienne (EROGLU et *al.*, 2004). En outre, la production photobiologique du biohydrogène par les bactéries photosynthétiques pourpres à partir de margines permet l'obtention d'autres produits valorisables tels que des polyhydroxyalcanoates et des caroténoïdes (EROGLU et *al.*, 2004 ; NTAIKOU et *al.*, 2009)

La teneur élevée en matière organique des sous-produits oléicoles, fait d'eux une ressource pour la production d'éthanol par bioconversion. Les différents types de polysaccharides des margines et des grignons peuvent être en effet bioconvertis en éthanol après hydrolyse enzymatique (ex : Celluclast et Novozyme 188) des fibres polysaccharidiques ou après un prétraitement physico-chimique. Les sucres fermentescibles libérés seront ensuite fermentés par des levures ou des bactéries (*Saccharomyces cerevisiae*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *Pleurotus sajor-caju*, etc.) (MASSADEH et MODALLAL, 2008 ; HAAGENSEN et *al.*, 2009). Les sous-produits oléicoles peuvent être également bioconvertis en biodiesel (LOPEZ et *al.*, 1996 ; KESSLER et *al.*, 2001). Le biodiesel est un mélange constitué d'esters éthyliques ou méthyliques d'huile végétale ou de gras animal. Il constitue une alternative au pétrole et présente l'avantage d'être non-toxique, biodégradable, et renouvelable.

3.5.3 Extraction ou production de molécules d'intérêt en nutrition et en santé

De nombreuses études se sont concentrées sur les propriétés biologiques des CP et des polysaccharides extraits à partir de la pulpe d'olive et/ou des sous-produits oléicoles. Les margines et les grignons humides sont une source intéressante de substances phénoliques

biologiquement actives ayant un grand potentiel antioxydant, des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Les activités antioxydantes des margines et des grignons ont été étudiées et démontrées (CAPASSO *et al.*, 1995 ; AMRO *et al.*, 2002 ; OBIED *et al.*, 2007 ; ALU'DATT *et al.*, 2010 ; LAFKA *et al.*, 2011). Plusieurs études ont ainsi validé que les activités bactéricides et fongicides des margines sont principalement dues à leur contenu en CP et notamment en hydroxytyrosol et en tyrosol (MOULTI-MATI et SALHI-MOHAND OUSSAID, 2009 ; YANGUI *et al.*, 2010 ; DERMECHE et MOULTI-MATI, 2012 ; SENANI et MOULTI-MATI, 2012).

Les polysaccharides jouent un rôle important dans beaucoup de processus physiologiques et dans la prévention de plusieurs maladies tels que le cancer (RODRIGUEZ, JIMÉNEZ *et al.*, 2006). L'importance des fibres diététiques en nutrition a conduit au développement d'un marché potentiel pour les produits alimentaires enrichis en fibres et en agents gélifiants polysaccharidiques. Les margines et la pulpe d'olive contiennent des matériaux pectiques qui pourraient constituer une source potentielle d'agents de gélification (CARDOSO *et al.*, 2002 ; CARDOSO *et al.*, 2003a,b). GALANAKIS *et al.* (2009) ont rapporté que les fibres des margines pourraient être utilisées comme additif dans les boulettes de viande en remplacement des matières grasses. Les grignons d'olive ont été également utilisés dans l'alimentation animale (VALIENTE *et al.*, 1995).

3.5.4 Autres utilisations

La production de mycètes (champignons) comestibles est possible en utilisant les sous-produits oléicoles comme substrat, particulièrement en ce qui concerne les espèces *Pleurotus*, *Lentinula* et *Agaricus bisporus* (ZERVAKIS *et al.*, 1996 ; ALTIERI *et al.*, 2009).

Des polysaccharides microbiens (exopolysaccharides) peuvent également être obtenus par traitement microbiologique des margines et des grignons (MORILLO *et al.*, 2007 ; AGUILERA *et al.*, 2008). Par exemple, les margines ont été utilisées comme substrat pour la production de xanthane par *Xanthomonas campestris*. Des enzymes industrielles, telles que des lipases, des laccases, des peroxydases Manganèse-dépendantes et des pectinases, peuvent être produites par des levures et des champignons filamenteux en utilisant les margines et les grignons comme substrats (LANCIOTTI *et al.*, 2005 ; CROGNALE *et al.*, 2006 ; D'ANNIBALE *et al.*, 2006 ; AGUILERA *et al.*, 2008 ; GONCALVES *et al.*, 2010).

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude des applications non biologiques des sous-produits oléicoles particulièrement en ce qui concerne les grignons ou le charbon actif obtenu à partir de noyaux d'olives. Ces applications visent surtout à valoriser leur capacité

d'adsorption élevée utilisable notamment dans les procédés de décontamination de l'eau (arsenic, aluminium et composés organiques) (BUDINOVA *et al.*, 2006 ; SPAHIS *et al.*, 2007, 2008 ; AZIZ *et al.*, 2009 ; BACCAR *et al.*, 2009). En outre, les grignons d'olives peuvent être utilisés dans la synthèse de polymères tels que les polyuréthanes compte tenu de leur composition élevée en lignines riches en groupes hydroxyles (CATETO, 2008 ; MATOS *et al.*, 2010).

IV-Les activités prébiotique et antioxydante

4.1 Activité prébiotique

4.1.1 Les prébiotiques

L'appareil gastro-intestinal de l'homme et des animaux est un écosystème microbien diversifié et complexe. Le colon est la région la plus fortement colonisée de l'appareil gastro-intestinal avec jusqu'à 10^{12} bactéries par gramme de contenu intestinal. La microflore digestive se classe en deux groupes la flore dominante et la flore sous-dominante. La flore dominante, qui représente plus de 80% de la flore totale, inclue les genres *Bacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* alors que la flore sous-dominante comprend les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, des entérobactéries (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*), *Enterococcus*, *Bacillus* et des levures (OTT *et al.*, 2004 ; ROBERFROID *et al.*, 2008).

Même si des bactéries potentiellement pathogènes et bénéfiques co-existent dans cette flore, des stratégies sont recherchées pour influencer cette composition vers un équilibre plus favorable. L'objectif est de réduire la quantité d'espèces potentiellement nocives ou pathogènes pour la santé de l'hôte (GIBSON ET ROBERFROID, 1995). Ces dernières années, il y a eu un intérêt considérable pour l'utilisation des prébiotiques en tant qu'aliments fonctionnels dans le but de moduler la composition de la microflore du côlon et fournir des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte (COPPA *et al.*, 2006; GUARNER, 2007; VARDAKOU *et al.*, 2008).

➤ Définition

Le concept de prébiotique a été initialement présenté par GIBSON et ROBERFROID, (1995). Il désigne un ingrédient alimentaire non digestible qui affecte avantageusement l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de bactéries dans le colon. Depuis, la définition a été affinée par GIBSON *et al.* (2004) et les prébiotiques sont maintenant définis en tant qu'ingrédients sélectivement fermentés qui

permettent des changements spécifiques de la composition et/ou de l'activité du microbiote gastro-intestinal et qui confèrent un bien-être et des effets physiologiques bénéfiques à l'hôte. Selon cette dernière définition, pour être classé comme prébiotique, un ingrédient alimentaire doit 1) résister à l'acidité gastrique, à l'hydrolyse par les enzymes des mammifères et à l'absorption gastro-intestinale, 2) être fermenté par le microbiote intestinal et 3) stimuler sélectivement la croissance et/ou l'activité des bactéries intestinales associées avec la santé et le bien-être. Bien que tous ces critères soient importants, le troisième est le plus difficile à accomplir (ROBERFROID, 2007). Actuellement un certain nombre de prébiotiques candidats existent. Ils répondent aux deux premiers critères, mais doivent être validés en tant que stimulateurs sélectifs des bactéries bénéfiques dans une communauté intestinale complexe, par des essais *in vitro* et *in vivo*.

➤ **Structure**

Actuellement quatre catégories de poly- et oligosaccharides possèdent une allégation « prébiotiques »: l'inuline, les fructooligosaccharides (FOS) (KOLIDA et GIBSON, 2008), les galactooligosaccharides (GOS) (CANDELA et *al.*, 2010) et le lactulose (GIBSON et ANGUS, 2000) (Tableau XII). L'inuline et les FOS sont des polymères linéaires d'unités de fructose liées en β -(1,2) qui diffèrent par leurs degrés de polymérisation (inuline \square 10, FOS \leq 10 (NINESS, 1999). Excepté l'inuline, les prébiotiques connus sont des mélanges d'oligosaccharides non digestibles, constitués de 3 à 10 monomères (SAAD et *al.*, 2013). Le lactulose est un disaccharide composé de Gal et de fructose liés en β -(1,4) et est synthétisé par isomérisation en milieu alcalin du lactose (GIBSON et ANGUS, 2000 ; LICHT et *al.*, 2012). Les GOS appelés aussi trans-GOS sont un mélange d'oligosaccharides obtenus par transglycosylation enzymatique du lactose. Ils correspondent à des tri, tétra et penta-oligosaccharides avec des liaisons glycosidiques de type β -(1,6), β -(1,3) et β -(1,4) (CANDELA et *al.*, 2010).

D'autres composés prébiotiques potentiels ont été identifiés, tels que l'isomalto-oligosaccharides (IMO) (KANEKO et *al.*, 1994), le lactosucrose (KUMEMURA et *al.*, 1992), les xylo-oligosaccharides (XOS) (JASKARI et *al.*, 1998), les oligosaccharides du soja (SAITO et *al.*, 1992) et des gluco-oligosaccharides (WICHIENTHOT et *al.*, 2006). En outre, plusieurs études révèlent l'effet prébiotique possible des pectoligosaccharides (OLANOMARTIN et *al.*, 2002) et des amidons résistants (WANG et *al.*, 2002) (Tableau XII). D'autres composants de nature non polysaccharidique ont été proposés comme ayant un effet

prébiotique. Il s'agit des phytoestrogènes à l'exemple du resvératrol (LARROSSA *et al.*, 2009).

Tableau XII: Structures et sources des prébiotiques (AL-SHERAJI *et al.*, 2013 ; PATEL et GOYAL, 2014).

Type de prébiotiques	Composition	Liaison	Source
Cyclodextrine	D-Glc	α -(1, 4)	Glucanes hydrosolubles
Fructooligosaccharides	(Fru)n-Glc	β -(2,1) et α (1,2)	Asperge, betterave à sucre, ail, chicorée, oignon, blé, miel, banane, orge, tomate
Galactooligosaccharides	(Gal)n-Glc	α -(1,4) et β -(1,6)	Le lait humain et le lait de vache
Isomaltulooligosaccharide	(Glc)n	α -(1,6)	Amidon
Isomaltulose (ou palatinose)	(Glc-Fru)	α -(1,6)	Saccharose
Lactulose	Gal-Fru		Lactose (Lait)
Lactosucrose	Gal-Glc-Fru	β -(1,4)- α -(1,2)- β -Fru	Lactose
Maltooligosaccharides	(Glc)n	α -(1,4)	Amidon
Oligosaccharide de soja	(Gal)n-Glc-Fru	α -(1,6)- α -(1,2)- β -Fru	soja
Xylooligosaccharides	(Xyl)n	β -(1,4)	Pousses de bambou, fruits, légumes, lait, miel et son de blé

Gal : galactose ; Glc : glucose ; Fru: fructose ; Xyl : xylose

Les prébiotiques peuvent être obtenus par extraction directe à partir des sources naturelles, produits par des processus hydrolysant des polysaccharides (enzymatique, chimique ou physique), ou par synthèse enzymatique ou chimique (trans-glycosylation) (SAAD *et al.*, 2013). La plupart d'entre eux sont synthétisés ou isolés par dépolymérisation de polysaccharides de plantes et d'algues tels que les FOS, les GOS, les IMO et les XOS (OUWEHAND, 2007).

4.1.2 Métabolisme et fermentation des prébiotiques

La microflore du côlon joue un rôle important dans la santé et le bien-être de l'hôte. Ces effets bénéfiques peuvent être liés à leur métabolisme mais également à leur capacité à produire des vitamines, des antioxydants, des défensines contre les compétiteurs potentiellement nocifs, des échanges de signaux moléculaires entre les différents

genres/espèces mais également avec les cellules épithéliales eucaryotes). Des bactéries potentiellement bénéfiques sont caractérisées par l'absence de voies métaboliques secondaires menant à la production de métabolites toxiques tels que les xenobiotiques.

La flore microbienne du côlon utilise pour sa croissance des substrats provenant de l'alimentation (oligosaccharides non digestibles, fibres, et protéines non assimilées par l'hôte) en plus des substrats endogènes tels que les mucines qui sont des glycoprotéines du mucus tapissant le tractus gastro-intestinal (ROWLAND *et al.*, 1985 ; FLINT *et al.*, 2007). La majorité des bactéries du colon sont anaérobies strictes et puisent leur énergie de processus fermentaires. Le colon proximal est qualifié d'environnement saccharolytique et constitue une région où la majorité des polysaccharides entrant dans le colon sont fermentés. Au fur et à mesure que le chyme se déplace vers le colon distal la disponibilité des polysaccharides diminue et les protéines deviennent la principale source d'énergie pour la flore microbienne (MACFARLANE *et al.*, 1992). Les prébiotiques sont les principaux substrats de fermentation de la flore bénéfique du colon et des probiotiques. Cet effet est confirmé par la non détection des prébiotiques (inuline, FOS) dans les selles après administration orale (MOLIS *et al.*, 1996) alors qu'ils sont non assimilables par l'hôte.

La fermentation des polysaccharides alimentaires génère des acides gras à courte chaîne (AGCC) tels que l'acétate, le butyrate et le propionate au niveau de l'épithélium du côlon humain (NEISH, 2009). D'autres métabolites tels que le lactate, le pyruvate, l'éthanol, le succinate et des gaz (H₂, CO₂, CH₄ et H₂S) sont également produits par cette activité fermentaire (LEVITT *et al.*, 1995). Les AGCC en acidifiant le pH luminal inhibent la croissance des pathogènes (BLAUT, 2002) et influencent la motilité intestinale (DASS *et al.*, 2007). Ils sont rapidement absorbés par la muqueuse du côlon et fournissent 5 à 15% des besoins énergétiques totaux notamment ceux de l'épithélium du côlon humain. Les AGCC sont également métabolisés dans le muscle, le foie, le rein ou le cœur où ils ont plusieurs effets bénéfiques sur la santé (métabolisme des lipides, cancer, etc.) (NEISH, 2009 ; ROBERFROID *et al.*, 2010). Les protéines atteignant le colon sont fermentées en acides gras à chaînes ramifiées tels que l'isobutyrate ou l'isovalérate et toute une gamme de composés azotés et sulfurés. A la différence des produits de fermentation des polysaccharides qui sont identifiés comme bénéfiques pour la santé, certains des produits finaux du métabolisme des acides aminés tels que l'ammoniaque et les amines peuvent être toxiques pour l'hôte (MACFARLANE *et al.*, 1995). Une fermentation excessive des protéines, particulièrement dans le colon distal, est liée à certaines maladies telles que le cancer du colon et les maladies inflammatoires de l'intestin.

4.1.3 Effets biologiques des prébiotiques

Les prébiotiques exercent plusieurs activités biologiques. Leurs effets sont un changement dans la composition des AGCC produits au niveau intestinal, une augmentation du poids fécal, une réduction du pH et une modulation de système immunitaire de l'hôte (SAAD *et al.*, 2013). Les effets bénéfiques exercés par les prébiotiques sont récapitulés dans le tableau XIII.

Les principaux effets des prébiotiques sont la modulation de la microflore intestinale, la prévention de l'adhérence à l'épithélium intestinal et de la colonisation du colon par des microorganismes pathogènes, l'induction d'effets anti-inflammatoires et la régulation du métabolisme des lipides et du Glc. Ils s'expliquent par la résistance des prébiotiques aux enzymes digestives des mammifères et par leur capacité à stimuler la croissance de bifidobactéries et de lactobacilles. Cette évolution au sein du microbiote intestinal conduit à une production importante d'AGCC et d'autres acides organiques qui induisent diverses réponses biologiques chez l'hôte (ROBERFROID, 2007 ; CANDELA *et al.*, 2010 ; LAPARRA *et SANZ*, 2010). Les prébiotiques tels que FOS, GOS et inuline ainsi que leur combinaison avec des bactéries probiotiques, qualifiée de symbiotique, augmentent la croissance des bifidobactéries et des lactobacilles et inhibent la croissance de plusieurs bactéries pathogènes telles que *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacterium sp.* et *Salmonella enteritidis* (SAAD *et al.*, 2013).

Les effets immunomodulateurs exercés par les prébiotiques s'expliquent par leur action sur le tissu lymphoïde associé au tube digestif (modulation du type et de la fonction des cellules immunitaires et de l'expression des cytokines) et par l'activation de l'immunité innée telle que celle due à l'activité des macrophages et des cellules dendritiques (SCHEPPACH *et al.*, 1992 ; NEZLIN *et GHETIE*, 2004 ; ARNOLD *et al.*, 2006). L'administration de prébiotiques (tels que l'inuline, les FOS, la pectine et le lactulose) induit une sécrétion d'interleukines 10, 4 et 2 et d'interféron (IFN- γ) par les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques mésentériques (YUN *et al.*, 1998 ; HOSONO *et al.*, 2003 ; SANDERSON, 2007), augmente le nombre et l'activité des cellules NK (cellules Natural Killer), induit la prolifération des lymphocytes (HOENTJEN *et al.*, 2005) et la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) IgA, IgG, IgE et IgM intestinaux et sériques (PIERRE *et al.*, 1997 ; SCHLEY *et FIELD*, 2002).

Tableau XIII : Activités biologiques des prébiotiques (GULLÓN et al., 2013; SAAD et al., 2013).

Substrat (s)	Activités biologiques
FOS, inuline et/ou Symbiotiques associés	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition des agents pathogènes humains et animaux - Amélioration de colite distale - Stimulation de l'absorption intestinale du Ca et de Mg. - Simulation de la croissance des lactobacilles et des bifidobactéries -Augmentation du taux d'AGCC dans le gros intestin -Réduction des dommages de la colite ulcéreuse -Modulation de l'immunité -Prévention du cancer
FOS/GOS	<ul style="list-style-type: none"> -Effet sur la réduction du cholestérol total et des LDL-cholestérol -Augmentation de la population de bifidobactéries
XOS	<ul style="list-style-type: none"> -Effets bifidogéniques et augmentation du taux d'AGCC
AXOS	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition du développement de lésions précancéreuses du colon et effet bifidogène
GOS	<ul style="list-style-type: none"> -Soulagement des maladies inflammatoires du colon et effet bifidogène; -Stimulation de la croissance des probiotiques et de la réponse immunitaire chez les personnes âgées
AraGOS ,OGalA et RhaGalaOS	<ul style="list-style-type: none"> - Effet bifidogène
AraOS (pectine de la pomme et de la peau de betterave à sucre)	<ul style="list-style-type: none"> - Effet bifidogène
-POS (Orange, pomme, citron, bergamote, betterave à sucre, carottes, aubépine)	<ul style="list-style-type: none"> -Augmentation de la population de bifidobactéries et de lactobacilles et diminution de celle des bacteroides et des <i>clostridia</i> - Augmentation de la concentration en AGCC - Diminution de l'adhérence d'<i>E. coli</i> aux cellules uroépithéliales - Stimulation de l'apoptose des cellules d'adénocarcinome du colon - Diminution du taux sérique de cholestérol et de triglycérides et inhibition de l'accumulation de la graisse corporelle.
Mélange de POS, GOS et de FOS	<ul style="list-style-type: none"> - Effet bifidogène - Diminution de population de Bacteroides et de <i>Clostridium coccoides</i>

AraGOS: arabinogalactooligosaccharides ; AraOS: arabinooligosaccharides; AXOS: arabinoxylo-oligosaccharides ; FOS: Fructo-oligosaccharides ; GOS: galactooligosaccharides; OGalA: oligogalacturonides ; POS: Oligosaccharides dérivés des pectines; RhaGalaOS: rhamnogalacturonoligosaccharides ; XOS: Xylo-oligosaccharides.

Plusieurs études ont montré que l'administration de prébiotiques pouvait se révéler bénéfique dans la réduction du risque de cancer via la prévention de dommages sur l'ADN de mutations, le changement de certaines activités enzymatiques bactériennes impliquées dans l'activation d'oncogènes, la régulation de l'apoptose, l'induction d'enzymes protectrices et la production de métabolites anticancéreux comme le butyrate. Le potentiel antitoxique des prébiotiques s'exerce également par la liaison du glutathion aux carcinogènes présents dans les aliments tels que les amines hétérocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces réactions de détoxifications sont catalysées par la glutathion transférase dont l'activité pourrait être induite par les AGCC tels que le butyrate (ROBERFROID et *al.*, 2010). Il a été rapporté que les produits de fermentation (butyrate et propionate) de l'inuline diminuent la survie des cellules tumorales du colon en induisant l'apoptose et en inhibant leur prolifération. De plus, les AGCC réduisent la conversion des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires, ayant un effet carcinogène, en diminuant le pH (MUNJAL et *al.*, 2009). La combinaison des probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) et *Bifidobacterium lactis* avec l'inuline enrichie avec des FOS a montré une action antitumorogénique sur la carcinogenèse du colon chez les rats (FEMIA et *al.*, 2002).

Les prébiotiques peuvent stimuler indirectement l'absorption digestive des minéraux notamment celle du calcium et du magnésium ce qui améliore la densité minérale osseuse (DEMIGNE et *al.*, 2008). La fermentation des prébiotiques dans le colon conduit à l'augmentation de la production des AGCC et à la diminution du pH ce qui augmente la solubilité des minéraux et stimule l'absorption passive (MANNING and GIBSON, 2004 ; OTLES, 2013). De plus, les AGCC (tels que le lactate et le butyrate) stimulent la prolifération des entérocytes ce qui conduit à l'élargissement de la surface absorbante notamment au niveau du caecum. Les prébiotiques favorisent également l'absorption du calcium en augmentant l'expression de gènes codant pour des protéines (calbindine d9k) liant et séquestrant le calcium (RASCHKA et DANIEL, 2005 ; KLOBUKOWSKI et *al.*, 2009 ; YANG et *al.*, 2013).

L'ingestion de prébiotiques a un effet sur le métabolisme des lipides en diminuant la cholestérolémie et la triglycéridémie (FIORDALISO et *al.*, 1995 ; DELZENNE et *al.*, 2002). Ces diminutions sont provoquées par une réduction du taux des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sériques suite à la réduction de l'activité des enzymes lipogéniques hépatiques (telles que l'acides gras synthase, l'ATP citrate lyase et l'acetyl-coA carboxylase) (DELZENNE et *al.*, 2008). Il a été suggéré que les prébiotiques pourraient modifier l'expression de gènes codant pour les enzymes lipogéniques (SAMANTA et *al.*, 2013).

L'effet des prébiotiques sur la diminution du taux de cholestérol sérique s'explique par la diminution de son absorption et par l'augmentation du taux des ARNm des récepteurs des lipoprotéines de faible densité (LDL) (DELZENNE et *al.*, 2008). La production d'AGCC tels que le propionate par le processus de fermentation joue un rôle dans la régulation du métabolisme des lipides. Le propionate agit comme un inhibiteur compétitif de protéines régulant l'entrée de l'acétate, un AGCC impliqué dans la lipogenèse, dans les cellules hépatiques (DELZENNE et *al.*, 2002 ; SAMANTA et *al.*, 2013).

Plusieurs études ont rapporté une diminution de la prise alimentaire, de la masse grasseuse et du poids corporel chez les animaux recevant des prébiotiques. En effet, les prébiotiques tels que l'inuline et FOS peuvent jouer un rôle potentiel dans la sécrétion des peptides intestinaux anorexigéniques qui régulent l'homéostasie de la prise alimentaire et d'énergie comme le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et le peptide YY (PYY) par les cellules intestinales (DELZENNE et *al.*, 2008 ; SAAD et *al.*, 2013). De plus, certains prébiotiques diminuent le taux de leptine sérique comme conséquence de la diminution de la masse.

4.1.4 Prébiotiques et probiotiques

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) et les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (FAO/WHO, 2002), les probiotiques sont des micro-organismes apportés par l'alimentation qui doivent survivre au passage du tractus digestif qu'ils colonisent. Cela signifie qu'ils doivent avoir la capacité de résister au suc gastrique et à l'exposition à la bile. Les probiotiques sont stimulés en termes de croissance par les prébiotiques qu'ils catabolisent en AGCC.

Les micro-organismes les plus généralement utilisés comme probiotiques appartiennent au groupe hétérogène des bactéries lactiques (Lactobacille, Entérocoque,...) et au genre *Bifidobacterium* (FAO/WHO, 2001; HOLZAPFEL et *al.*, 2001). Le tableau XIV liste les principaux microorganismes probiotiques.

Les mécanismes d'action des probiotiques contre les germes pathogènes gastro-intestinaux consistent principalement en: (i) la compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion, (ii) la production des métabolites antimicrobiens (ALVAREZ-OLMOS et OBERHELMAN, 2001), (iii) les changements dans les conditions environnementales et, (iv) la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (TIEN et *al.*, 2006). Le tableau XV présente les principaux effets bénéfiques des probiotiques.

Tableau XIV: Microorganismes utilisés comme probiotiques (SAAD et al., 2013)

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Autres souches
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Lactobacillus : L ; *Bifidobacterium* : B

Les probiotiques peuvent être utilisés en association avec les prébiotiques. C'est le concept de symbiotiques défini par GIBSON et ROBERFROID en 1995 puis validé par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments en 2003. Les symbiotiques sont définis comme des mélanges de probiotique(s) et de prébiotique(s) qui ont des effets bénéfiques chez l'hôte en améliorant la survie et l'implantation de compléments alimentaires microbiens vivants dans le tractus gastro-intestinal de l'hôte (ANDERSSON et al., 2001).

4.2 Activité antioxydante

4.2.1 Radicaux libres et antioxydants

4.2.1.1 Chimie et source des radicaux libres

➤ Définition

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un électron non apparié sur l'orbitale externe. Cette caractéristique lui confère une grande réactivité (demi-vie courte). Les radicaux libres peuvent être des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou des espèces réactives de l'azote (ERA) (HALLIWELL, 1994). Ce sont des molécules très réactives qui réagissent avec d'autres molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (AFONSO et al., 2007). Les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électrons à partir de l'oxygène (O₂) lorsque sa réduction n'est pas complète, donnant lieu à des espèces

Tableau XV : Activités biologiques des probiotiques (GOVENDER et al., 2013).

<i>Stimulation du système immunitaire</i>	<i>Protection de la barrière intestinale</i>	<i>Activités antimicrobiennes</i>	<i>Autres effets bénéfiques</i>
Augmentation de la production d'anticorps	Stimulation de la phosphorylation des protéines des jonctions serrées	Production d'acides, de peroxydes ou de bactériocines contre les pathogènes	Diminution de l'intolérance au lactose Réduction du cholestérol Ciblage des tumeurs
Augmentation de l'activité des cellules Naturel Killer Modulation du phénotype et de la fonction des cellules dendritiques.	Activation de la production du mucus Augmentation de la glycosylation des cellules épithéliales.	Stimulation de la sécrétion de la défensine Sécrétion de peptides anti-microbiens	
Modulation de la voie de NF-kB et de AP-1	Augmentation de la production d'IgA.	Inhibition des bactéries pathogènes	
Altération de la sécrétion de cytokines.	Compétition avec les pathogènes pour les sites de liaison à la muqueuse	Blocage de d'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales	
Induction des cellules T régulateurs Compétition pour les substrats Libération (ou sécrétion) d'oxyde nitrique Induction de PPAR- γ Modulation de l'apoptose Inhibition de l'activité du protéasome	Compétition pour les substrats.	production d'oxyde nitrique	

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor,

radicalaires dites primaires telles que le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) (JANUEL, 2003; GUEYE, 2007). Les ERO regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l' O_2 ($O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$, peroxydes ROO^{\cdot} , alkoxydes RO^{\cdot}) mais également les composés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2), les hydroperoxydes ($ROOH$), le nitroperoxyde ou l'acide peroxy-nitrique ($ONOOH$), l'acide hypochloreux ($HOCl$) et l'ozone (O_3) (ARUOMA, 1998 ; FONTAINE *et al.*, 2002 ; FAVIER, 2003). Certains radicaux libres tels que $O_2^{\cdot -}$ ou l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) ne sont pas très réactifs, ce qui explique leur production endogène chez certains organismes chez qui ils jouent le rôle de médiateurs régulant des fonctions biologiques (vasodilatation, prolifération neuronale, etc.). Ils peuvent également intervenir lors de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus (HENNEBELLE, 2006 ; BERARD, 1997). Des espèces comme ROO^{\cdot} et $\cdot OH$ sont particulièrement réactives (HENNEBELLE, 2006) avec la plupart des molécules biologiques et sont issues respectivement de l'oxydation des lipides et du clivage de H_2O_2 par la réaction de Fenton sous l'influence de cations métalliques tels que Fe^{2+} ou Cu^+ (HALLIWELL *et al.*, 2000). D'autres ERO comme 1O_2 , H_2O_2 ou $ONOOH$ sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (FAVIER, 2003). En effet H_2O_2 qui est le produit de la dismutation de $O_2^{\cdot -}$ est beaucoup plus stable que ce dernier et a la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques.

➤ **Source des dérivés réactifs de l'oxygène**

Dans l'organisme il y'a de nombreuses sources d'ERO dont l'importance varie selon les tissus. En plus de la réaction de Fenton, les autres sources cellulaires des ERO sont enzymatiques et non enzymatiques.

Des enzymes comme la NADPH oxydase et la xanthine oxydase participent activement à la génération de radicaux libres. La NADPH oxydase interagit avec des substrats intracellulaires ($NADH$, H^+ , ou $NADPH$, H^+) et libère des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot -}$). Ces derniers seront à l'origine de la synthèse de H_2O_2 et d'hypochlorite ($ClO^{\cdot -}$) (FONTAINE *et al.*, 2002). La xanthine oxydase est une enzyme qui génère l'anion superoxyde en présence d'oxygène et de xanthine ou d'hypoxanthine. La mitochondrie est considérée comme une des principales sources d'ERO dans la cellule de par le fonctionnement de la chaîne respiratoire. En effet, au cours du transfert des électrons dans la chaîne respiratoire, le radical $O_2^{\cdot -}$ est produit par réaction de l'oxygène avec un radical semiubiquinone (FONTAINE *et al.*, 2002; HALLIWELL, 2006).

D'autres sources cytosoliques ou présentes dans divers organites cellulaires (peroxysome, réticulum endoplasmique, etc.) peuvent avoir un rôle dans la production des ERO. Ce sont les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450), les NO synthases et les enzymes de la voie de l'acide arachidonique. L'auto-oxydation des petites molécules telles que les monoamines, le Glc et l'hémoglobine peut également être à l'origine de la production d'ERO. Le produit direct de ces autooxydations est souvent l'anion superoxyde (SERVAIS, 2004 ; GUEYE, 2007).

4.2.1.2 Systèmes de défenses antioxydants

Les ERO sont utiles à l'organisme jusqu'à une certaine concentration. Leur production peut devenir excessive ou résulter de mécanismes toxiques exogènes (GUEYE, 2007). L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défense très efficace contre la surproduction d'ERO et d'ERN.

Le terme antioxydant désigne toute substance qui, à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable (protéines, lipides et acides nucléiques), retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (HALLIWEL, 1995). La nature du système antioxydant varie en fonction des tissus et les types cellulaires et selon qu'il s'agisse de milieux intracellulaire ou extracellulaire (CHAUDIERE et FERRARIILIOU, 1999). Dans l'organisme, on distingue des systèmes antioxydants enzymatiques et des systèmes non enzymatiques.

4.2.1.2.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes entrant dans le système de défense antioxydant sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). D'autres enzymes comme les thiorédoxine réductases et l'hème oxygénase présentent également une activité antioxydante relativement importante (RAHMAN *et al.*, 2006).

4.2.1.2.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques

L'action protectrice d'enzymes endogènes aux organismes contre les radicaux libres est complétée par des composés antioxydants exogènes apportés par l'alimentation et endogènes issus de voies de biosynthèse.

- **Composés endogènes**

Ce groupe renferme de nombreuses substances parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, l'acide lipoïque, le coenzyme Q, l'albumine, etc. Des protéines comme la transferrine, la ferritine, la céruléoplasmine, agissent

en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^{+} et les maintiennent dans un état inactif pour la formation d'ERO par la réaction de Fenton (PINCEMAIL et al., 2002 ; SERAFINI, 2006).

Les protéines du choc thermique ("heat shock protein") interviennent aussi en protégeant les biomolécules contre les oxydations (PENG et al., 2000 ; WIRTH et al., 2003).

- **Composés exogènes**

Des composés tels que les vitamines E (tocophérol), C (vit C), Q (ubiquinone), les caroténoïdes et les CP apportés par l'alimentation agissent en piégeant les radicaux libres et en neutralisant les électrons non appariés, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (KRINSKY, 1989). Le tableau XVI donne la liste des différentes catégories d'antioxydants avec quelques exemples illustratifs.

Tableau XVI: Exemples d'antioxydants.

Catégories d'antioxydant	Exemples	Références
Caroténoïdes et xanthophylles	β -carotène, lycopène, lutéine, zéaxanthine, canthaxanthine	
Enzymes	SOD, Catalase, GPx	
Hormones	mélatonine, œstrogène	
Composés associés aux lipides	ubiquinol-10, N-acétyl cystine, acide lipoïque	
Minéraux	zinc, sélénium, cuivre	
CP	flavonoïdes, secoiridoïdes, acides phénoliques	CAO et IKEDA, 2009 ;
Saponines, Stéroïdes	cortisone, estradiol, estriol	FLORA et al., 2009 ; SEN et al., 2010 ;
Vitamines	α -tocophérol, vitamine C	BARAHONA et al., 2012
Alcaloïdes	protopine, cryptonine, stylopine, fumariline, phtalidiisoquinoline, fumaritine	
Lignanes	lignanes de <i>Myristica fragrans</i>	
Phytostérols	beta-sitostérol de <i>Morinda citrifolia</i>	
Polysaccharides	arabinoxylanes, xyloglucane, galactane	

La figure 17 récapitule les différentes voies métaboliques des ERO.

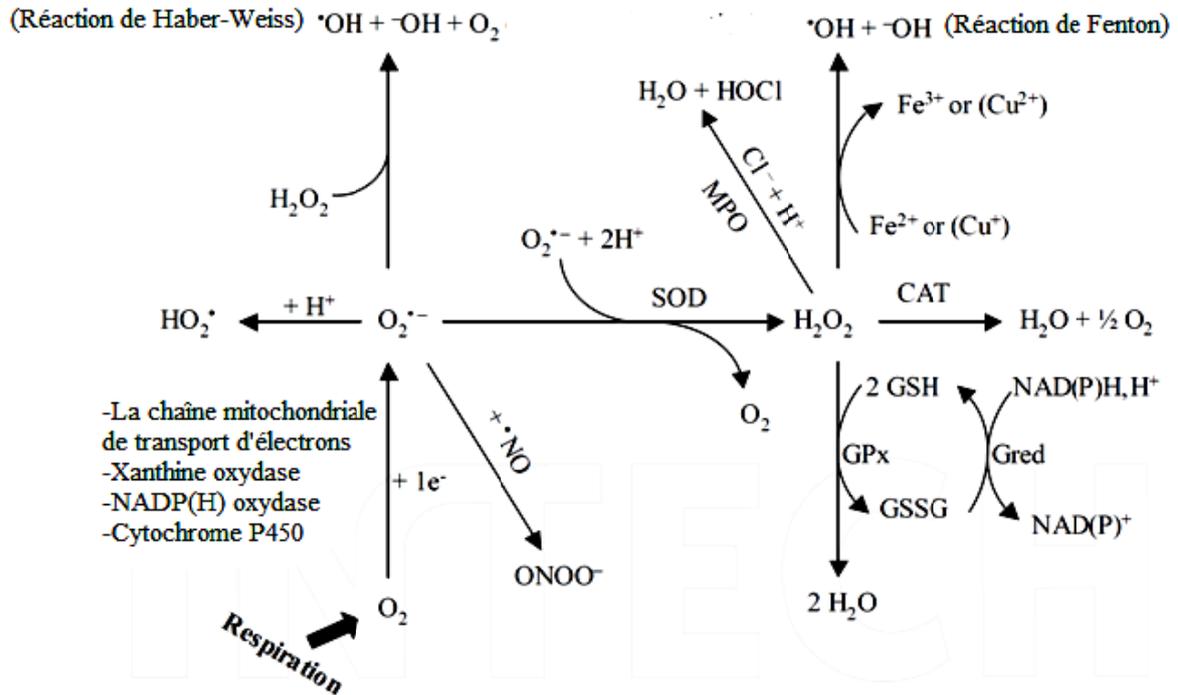


Figure 17 : Les voies métaboliques des ERO (BOUAYED et BOHN, 2012). SOD, CAT, GPx, Gred et MPO correspondent à superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, glutathion réductase et myéloperoxydase respectivement. La réaction avec MPO est spécifique des cellules phagocytaires. GSSG et GSH correspondent à la forme oxydée et réduite du glutathion respectivement.

4.2.2 Le stress oxydant

➤ Définition, origines et conséquences

A faibles concentrations, les ERO ou les ERA, sont impliquées dans la modulation de la fonction cellulaire (différenciation, prolifération et apoptose), dans les voies de signalisation cellulaire (second messenger, action sur l'expression des gènes) et dans la modulation de la réponse immunitaire (THANNICKAL et FANBURG, 2000 ; SEIFRIED et *al.*, 2007). A des concentrations plus élevées, ces radicaux peuvent être néfastes (COULON, 2004).

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défense antioxydants et la production d'ERO, en faveur de ces derniers (BACOT, 2004; BERGER, 2006). Une surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, rayons UV et gamma, herbicides et métaux toxiques), une activité physique intense (NEVE, 2002 ; COULON, 2004 ; GUEYE, 2007), sont autant de facteurs pouvant être à l'origine du stress oxydant.

Les dommages liés à un stress oxydant se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN, des protéines (WINYARD *et al.*, 2005) et des lipides (RABILLOUD *et al.*, 2005). En faisant apparaître des molécules anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant est ainsi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles (maladies cardiovasculaires, cancer, diabète, rhumatisme, maladies neurodégénératives, etc.) et l'accélération du processus du vieillissement (VALKO *et al.*, 2007).

➤ **Marqueurs du stress oxydant**

- **Marqueurs de la peroxydation lipidique**

La peroxydation lipidique désigne l'attaque des lipides (principalement les acides gras polyinsaturés) par des radicaux libres, comme le radical hydroxyle. Cette attaque conduit à l'oxydation de diènes conjugués en radicaux peroxydes qui se transforment ensuite en radicaux hydroperoxydes. Cette oxydation des lipides touche aussi bien les phospholipides membranaires que les lipoprotéines circulantes (GUEYE, 2007).

Selon LEFEVRE *et al.* (1998), les produits issus de la peroxydation lipidique tels que l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonéal sont les marqueurs les plus utilisés pour évaluer une situation de stress oxydant (DE ZWART *et al.*, 1999 ; ZARKOVIC, 2003). Les principales réactions (1 à 6) de la peroxydation lipidique sont données par la figure 18.

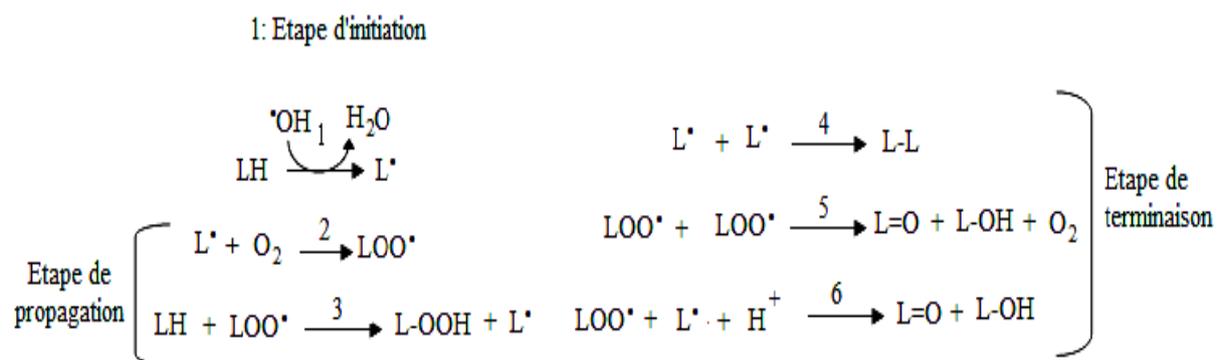


Figure 18 : Les principales réactions de la peroxydation lipidique (WLODEK et KUSIOR, 2006).

La peroxydation lipidique est déclenchée par la capture d'un atome d'hydrogène d'un acide gras polyinsaturé par un radical initiateur de l'oxydation tel que OH^\bullet , qui mène à la formation du radical alkyl L^\bullet (réaction 1 : étape d'initiation). Ce dernier réagit avec l'oxygène pour

former les radicaux peroxydes LOO^\bullet (réaction 2), qui peuvent capturer des atomes d'hydrogène de molécules avoisinantes (LH) et produire des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) (Réaction 3). La répétition des réactions 2 et 3 constitue l'étape de propagation (réactions en chaîne). Cette étape prend fin par la réaction entre deux radicaux libres, produisant des produits non radicalaires: c'est l'étape de terminaison (réactions 4–6).

Un exemple de mécanisme d'oxydation d'un acide gras qu'est l'acide arachidonique ainsi que les produits d'oxydation obtenus sont illustrés dans la figure 19.

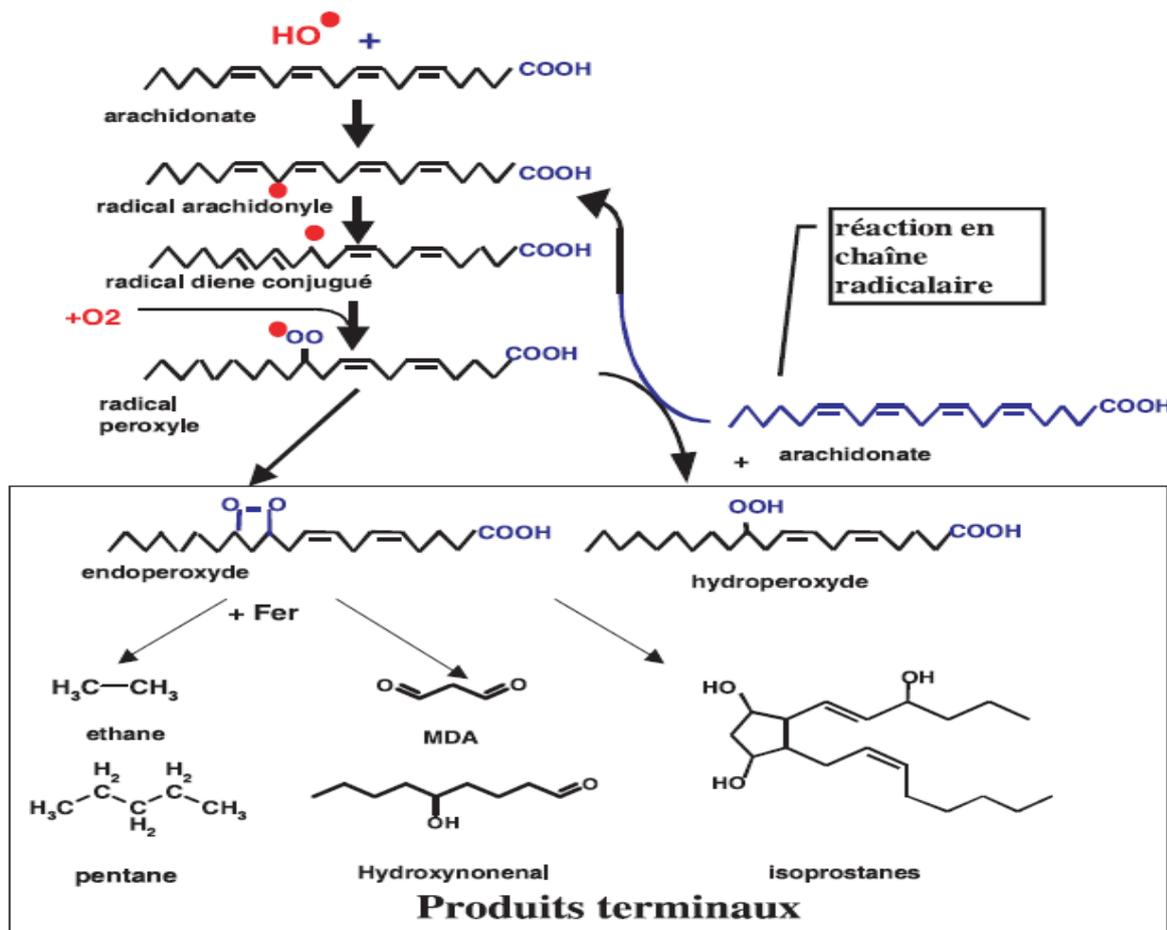


Figure 19: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (FAVIER, 2003).

- **Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés**

Les dommages oxydatifs des radicaux libres sur les protéines peuvent conduire à des modifications structurales (dimérisation, polymérisation, fragmentation et modification des

acides aminés) et fonctionnelles (perte d'activité enzymatique, altération du processus de la protéolyse) (DE ZWART et *al.*, 1999; FAVIER, 2003 ; HENNEBELLE, 2006). Le sulfoxyde de méthionine, la nitrotyrosine et l'ortho-tyrosine, les groupements carbonylés ou dicarbonylés ont été décrits comme marqueurs spécifiques de l'oxydation des protéines. (DAVIES et *al.*, 1999; FAVIER, 2003).

L'essentiel du mécanisme de la formation de groupements carbonylés protéiques est donné par la figure 20.

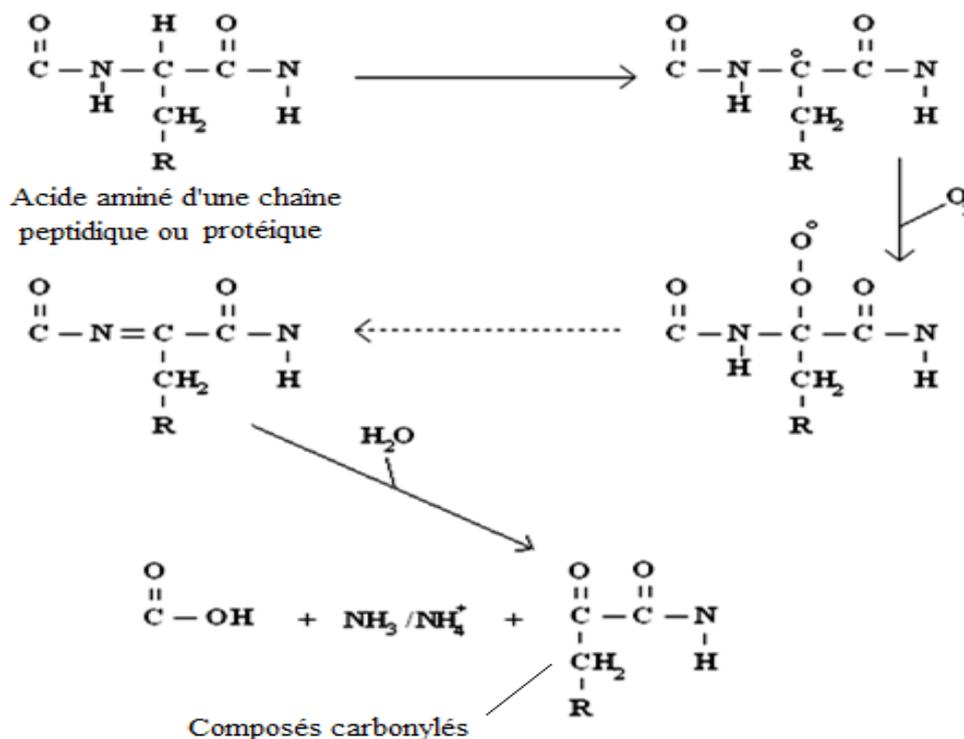


Figure 20 : Mécanisme de formation de groupements carbonylés (BOURDON, 2004).

Un radical libre à l'exemple du radical hydroxyle, peut provoquer la coupure de la chaîne peptidique avec formation d'un groupement carbonylé. Brièvement l'arrachement d'un hydrogène par $\cdot\text{OH}$ sur le C_α forme un C^\cdot qui peut réagir avec O_2 et former un radical hydroperoxyde. Celui-ci peut se dégrader après formation d'intermédiaires en composés carbonylés (LEVINE et *al.*, 2000 ; BOURDON et *al.*, 2004). La modification des protéines par oxydation est un agent causal et un facteur de risque de plusieurs maladies liées au vieillissement (maladie d'Alzheimer, parkinson, etc.) (HOUSSET, 1990 ; HENNEBELLE, 2006).

- **Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques**

Les acides ribo- et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) constituent des cibles cellulaires importantes pour les attaques radicalaires (HALLIWELL, 2002). Des modifications de bases, des cassures simple-brin ou double-brin de la chaîne oligonucléotidique peuvent être produits (FAVIER, 2003 ; HENNEBELLE, 2006). Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome. De nombreux produits de réaction des radicaux libres sur l'ADN ont été identifiés, tels que la 8-hydroxy-2-déoxyguanosine et la thymidine glycol. Ces derniers se sont révélés être les marqueurs les plus intéressants de l'oxydation de l'ADN (DE ZWART *et al.*, 1999).

Le tableau XVII donne quelques exemples de stress oxydant impliqués dans certaines maladies, ainsi que quelques antioxydants ayant prouvé leur effet protecteur *in vitro* et/ou *in vivo*.

Tableau XVII: Exemples d'antioxydants protecteurs contre des pathologies liées au stress oxydant.

Maladies	Types de stress oxydant	Antioxydants exogènes protecteurs	Références
Maladies cardiovasculaires	-Peroxydation des lipides et oxydation des groupements thiols des protéines -Changement de la perméabilité membranaire, rupture de la bicouche lipidique membranaire et modification de la fonction des diverses protéines membranaires.	-Vitamines (E, E+C) -Caroténoïdes (β -carotène + lycopène) -CP (flavonoïdes + acides phénoliques, quercétine, résveratrol, hydroxytyrosol et oleuropeine) -Polysaccharides	PALA et GÜRKAN, 2007 ; PANDEY et RIZVI, 2009 ; VILLARES et <i>al.</i> , 2012 ; ALISSA, 2014 ; BULOTTA et <i>al.</i> , 2014 ; EL-SABBAN et <i>al.</i> , 2014
Cancers	-ERO induisant des dommages de l'ADN, mutations, et altération de l'expression des gènes -Peroxydation lipidique	-Caroténoïdes (α et β -carotène, lycopène, β -cytotoxanthine et canthaxanthine) -Huile essentielles (carvacrol, azadirachtine, nimbolide, D-limonène et eugénol) -CP (anthocyanines, kaempférol, quercétine et esters d'acide coumarique et d'acide ellagique) -Stérols -Polysaccharides	PALA et GÜRKAN, 2007 ; DAI et MUMPER, 2010 ; TANAKA et <i>al.</i> , 2012 ; VILLARES et <i>al.</i> , 2012 ; GRATTAN, 2013 ; KAO et <i>al.</i> , 2013 ; GAUTAM et <i>al.</i> , 2014
Maladies neurodégénératives	-Oxydation des protéines -Peroxydation lipidique -Accumulation de peptides β amyloïde dans la maladie d'Alzheimer ; -Dégénérescence des cellules de la substantia nigra et accumulation de protéines α -synucléine dans la maladie de Parkinson.	-CP (épigallocatechine 3-gallate, quercétine, résveratrol, curcumine et oleuropeine) -Caroténoïdes (β -carotène et lycopène) -Vitamine D3 -Polysaccharides	KALUEFF et <i>al.</i> , 2004 ; PALA et GÜRKAN, 2007 ; HUANG et <i>al.</i> , 2009 ; KELSEY et <i>al.</i> , 2010 ; OMAR, 2010 ; KAUR et <i>al.</i> , 2011 ; CARUANA et <i>al.</i> , 2011 ; BARBARO et <i>al.</i> , 2014

2^{ème} Partie :

Partie expérimentale

2^{EME} PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

Le travail expérimental de cette thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et au sein de l'Institut Pascal (UMR CNRS 6602) de l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand (France).

1.1 Matériel

➤ Appareils

Les appareils utilisés sont les suivants:

- Chromatographie Haute Performance Echangeuse d'Anions à détection ampérométrique pulsée (HPAE-PAD) (Dionex, USA) ;
- Chromatographie liquide basse pression (ÅKTA purifier system, Amersham Biosciences) ;
- Chromatographie phase gazeuse (CPG) Agilent 6890 Series GC couplée à un spectromètre de masse quadripôle (Agilent);
- Spectromètre Infra Rouge à Transformée de Fourier (FTIR) Nicolet 380 (Thermoelectron Corporation, France).
- Electrophorèse sur mini cuves verticales (Hoeffler SE 200)
- Evaporateur rotatif (IKA-DEST);
- Spectrophotomètre UV Visible (SCHIMADZU, Japon) ;
- Colorimètre série DR/800 HACH
- pH mètre (Hanna-instruments) ;
- Autoclave de paillasse (PB INTERNATIONAL);
- Etuves (MEMMERT);
- Four pasteur (BINDER);
- Microscope photonique (MOTIC);
- Bain-Marie (MEMMERT);
- Centrifugeuses non réfrigérée (max 16000 g, SIGMA); réfrigérée (max 28000 g, SIGMA);
- Agitateurs (IKA, HANNA, HEIDOLPH HEI, LABINCO);
- Cellule d'ultrafiltration tangentielle Amicon ;
- Lyophilisateur (Heto modèle powerdry PL6000) ;
- Balances (Precisa, Kern).

➤ Consommable

- Plaques CCM gel de silice 60, verrerie, micropipettes, micro-seringues, verre fritté G3, papier Watman N° 40 ; boudins de dialyse (3,5 kDa et 10 kDa), filtres à 0,22 et 0,45 µm.

➤ **Produits et réactifs**

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, peroxyde d'hydrogène, méta hydroxybiphényle, 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline, résorcinol, monosaccharides, L-sérine, réactif de Bradford, BSTFA ((N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoroacetamide), TMCS (trimethylchlorosilane, pyridine, érythritol, 1-méthylimidazole, anhydride acétique, iodométhane, pyrogallol, inuline, fructooligosaccharides, Milieu de De Man Rogo Sharpe; Protéines et enzymes (Sérum albumine bovine, α -lactalbumine, β -lactoglobuline, l'ovalbumin, hémoglobine, α -amylase et amyloglucosidase, peptone animale, extrait de viande, yeast nitrogen base, Tween 80, acrylamide, N, N'-méthylène-bis-acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, dodécyl sulfate de sodium, glycine, β -mercaptoéthanol, persulfate d'ammonium, N, N, N', N' tétraméthyléthylène diamine, réactif de Folin-Ciocalteu, composés phénoliques (acide caféique, acide férulique, acide gallique, acide cinnamique, acide coumarique, acide tannique et oleuropeine), vitamine C, réactif de bradford.

Chlorure de sodium, chlorure de calcium, chlorure de potassium, chlorure de magnésium, chlorure de fer, persulfate d'ammonium, sulfate d'ammonium, citrate de triammonium, tartrate de sodium, bicarbonate de sodium, carbonate de sodium, phosphate de sodium, acétate de sodium, azide de sodium, phosphate dipotassique, ferricyanure de potassium, bromure de potassium, sulfate de fer, sulfate de manganèse, sulfate de cuivre, trishydroxyméthylaminométhane, borohydrure de sodium, Trizma-base.

✓ **Acides et bases**

Acide acétique, acide chlorhydrique, acide trichloroacétique, acide sulfurique, acide trifluoroacétique, hydroxyde de sodium, hydroxyde d'ammonium.

✓ **Solvants organiques**

Méthanol, acétate d'éthyle, diéthyl éther, hexane, chloroforme, éthanol, glycérol, diméthylsulfoxyde, dichlorométhane.

➤ **Matière première**

✓ **Olives**

Des olives vertes de la variété *chamlal* ont été récoltées dans la région de Kabylie (Tizi-Ouzou) au village de Mezdatat-Betrouna le 27 Octobre 2007. Après leur récolte, les olives ont été nettoyées et échantillonnées en fractions de 200 g dans des sachets plastiques avant d'être congelées à -20°C.

✓ **Sous-produits oléicoles**

Des échantillons de margines et de grignons d'olives issus d'olives de variété *Olea europaea* ont été obtenus dans une huilerie utilisant le système d'extraction à trois phases dans la région

de Kabylie (Tizi-Ouzou) en 2010. Les échantillons de margines ont été répartis en aliquotes de 500 mL et congelés à -20°C jusqu'à utilisation. Les grignons d'olive sont gardés à température ambiante.

➤ **Matériel biologique**

✓ **Sang**

Du sang sain humain sur héparine ou citrate (anticoagulants) a été utilisé. Les échantillons de sang sont récupérés d'un centre médical (polyclinique Nabila Djahnine de Tizi-Ouzou). Le sang de patients dont la formule numérotation sanguine est normale a été utilisé. Le sang est traité immédiatement après récolte pour la préparation des érythrocytes comme expliqué ci-après.

- **Préparation des érythrocytes**

Les érythrocytes sont isolés et stockés à 4°C selon le protocole développé par YUAN, WANG *et al.*, (2005). Le sang hépariné est centrifugé à 3000 g pendant 10 min à 4°C. Le plasma et la couche de globules blancs (buffy coat) contenus dans le surnageant sont prélevés par aspiration. Les érythrocytes présents dans le culot ont été repris dans un tampon phosphate salin (PBS) 160 mM, pH 7,4 contenant NaCl (150 mM), NaH₂PO₄ (1,9 mM) et Na₂HPO₄ (8,1 mM). Après mélange par retournement, l'échantillon est à nouveau centrifugé (3000 g, 10 min, 4°C) et le surnageant est évacué au moyen d'une pipette pasteur ou d'une micropipette. Le lavage du culot est répété 2 fois. Les érythrocytes lavés sont resuspendus dans le même volume de PBS. Les échantillons sont conservés à 4°C pendant 2 à 4 jours.

- **Préparation des membranes érythrocytaires**

La préparation des membranes érythrocytaires a été réalisée en utilisant la méthode proposée par SHIVA SHANKAR REDDY *et al.* (2007). Deux mL de sédiment érythrocytaire lavé sont mélangés à 28 mL de tampon PBS hypotonique (160 mM, pH 7,4) contenant du NaCl (10 mM), du NaH₂PO₄ (1,9 mM) et du Na₂HPO₄ (8,1 mM) (tampon de lyse). Après agitation douce, les tubes sont centrifugés à 20000 g pendant 40 min à 4°C. Le surnageant est éliminé par aspiration, tandis que le culot est remis en suspension dans le même volume de tampon de lyse puis centrifugé dans les mêmes conditions. Cette opération est répétée 4 fois puis les membranes sont stockées à 4°C en tampon isotonique pendant une journée.

➤ **Souches bactériennes**

Les souches de lactobacilles utilisées sont issues des collections de culture ATCC (American Type Culture Collection, Rockville) et DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen, Braunschweig, Allemagne) et fournies par l'institut Pascal de Clermont Ferrand (France).

1.2 Méthodes

1.2.1 Procédés d'extraction

1.2.1.1 Extraction des polysaccharides

1.2.1.1.1 Extraction du RIA à partir des margines

L'extraction du RIA des margines est réalisée selon le protocole décrit par GALANAKIS *et al.* (2010a). Une délipidation partielle des margines est d'abord réalisée par centrifugation de 500 mL de margines à 3000 g pendant 30 min à 20°C. La phase apolaire est alors éliminée. Le culot est mis en suspension dans la phase aqueuse (surnageant) par agitation au vortex. Les margines délipidées sont ensuite concentrées au rotavapor à 60°C jusqu'à la réduction du volume initial d'un facteur 3,5.

L'extraction des RIA est réalisée en mélangeant 100 mL de margines délipidées avec 5 mL d'éthanol absolu et 1 g d'acide citrique sous agitation continue pendant 25 min, dans un bain marie à 80°C. Ensuite, le mélange est dispersé dans l'éthanol à 95% (v/v) pour une concentration finale de 85% (v/v) et porté à ébullition dans un bain marie pendant 10 min. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est filtré à travers un verre fritté G3 (15-40µm). Le précipité est lavé 3 fois avec du chloroforme (3 fois le volume initial) pendant 30 min sous agitation puis filtré. Le précipité résiduel est lavé ensuite avec de l'acétone avant d'être filtré puis séché à température ambiante. La poudre obtenue est le RIA (Figure 21).

1.2.1.1.2 Extraction du RIA à partir des grignons

L'extraction du RIA à partir des grignons est réalisée suivant le protocole de CARDOSO *et al.* (2003a) (Figure 22). Dix kg de grignons sont dispersés dans de l'éthanol à 85% (v/v). Le mélange est ensuite porté à ébullition pendant 10 min, refroidi et filtré sur un verre fritté G3. Le résidu est extrait 3 fois avec un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v, 3 fois la masse initiale) pendant 30 min sous agitation. Le résidu obtenu est lavé au diéthyl éther puis à l'acétone et séché à température ambiante. Cette fraction constitue le RIA.

1.2.1.1.3 Extraction des fractions soluble et insoluble à partir des RIA

Une extraction aqueuse à une température de 50°C est réalisée pour les RIA de margines et de grignons (Figure 23). Deux g de RIA sont dispersés dans 100 mL d'eau distillée, sous agitation pendant 18 h à 50°C. Après extraction, les solutions sont centrifugées à 3000 g, à 20°C pendant 20 min afin de séparer surnageants (fractions solubles) et culots (fractions insolubles) qui sont lyophilisés. La fraction soluble est filtrée à travers un verre fritté G3 avant lyophilisation.

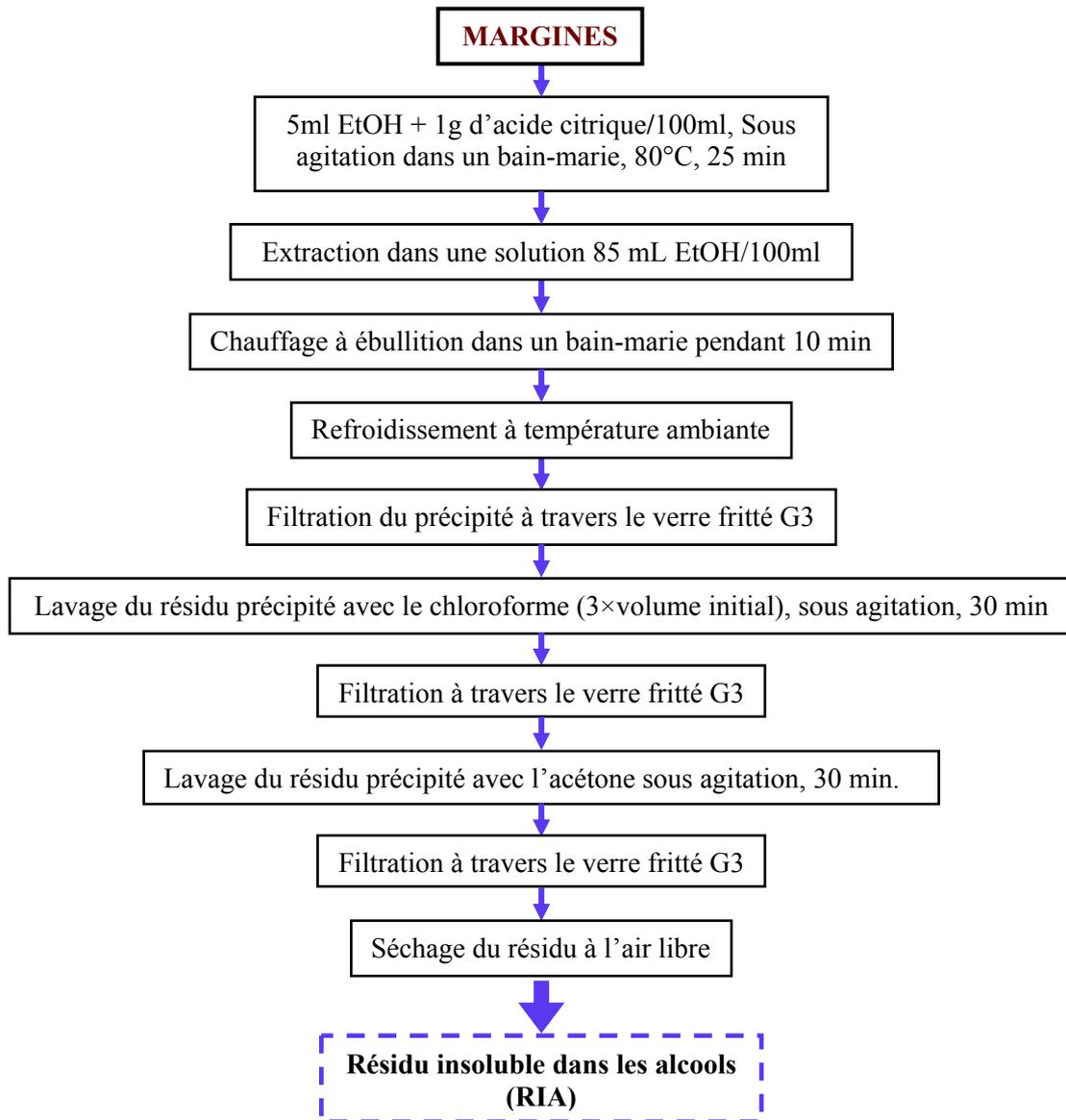


Figure 21 : Protocole d'extraction du RIA à partir des margines (GALANAKIS et *al.*, 2010).

1.2.1.2 Extraction des composés phénoliques

La procédure suivie pour l'extraction des CP totaux de la pulpe d'olives vertes est basée sur la méthode décrite par BRENES et *al.*, (1995) et modifiée par SAVARESE et *al.*, (2007). La pulpe d'olive (10 g) a été broyée puis mélangée à du méthanol 80 % (v/v) sous agitation à température ambiante pendant 30 min. Le mélange est par la suite centrifugé pendant 10 min à 3000 g. Le surnageant est filtré sous vide à travers un papier Watman n° 40. Cette extraction est répétée trois fois sur le culot de pulpe récupéré après chaque centrifugation. Les différents extraits méthanoliques sont ensuite mélangés et le méthanol est

éliminé sous vide à 40°C. La phase aqueuse est ensuite délipidée par lavage 3 fois dans 20 mL d'hexane et agitation dans une ampoule à décanter. La phase aqueuse délipidée est récupérée après décantation. Les CP sont alors extraits par 20 mL d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter et cette opération est répétée 5 fois. Les phases organiques sont récupérés et mélangées et l'acétate d'éthyle est éliminé sous vide à 40°C. Le résidu sec est solubilisé dans 2 mL de méthanol et correspond aux CP de l'olive (CPO) (Figure 24).

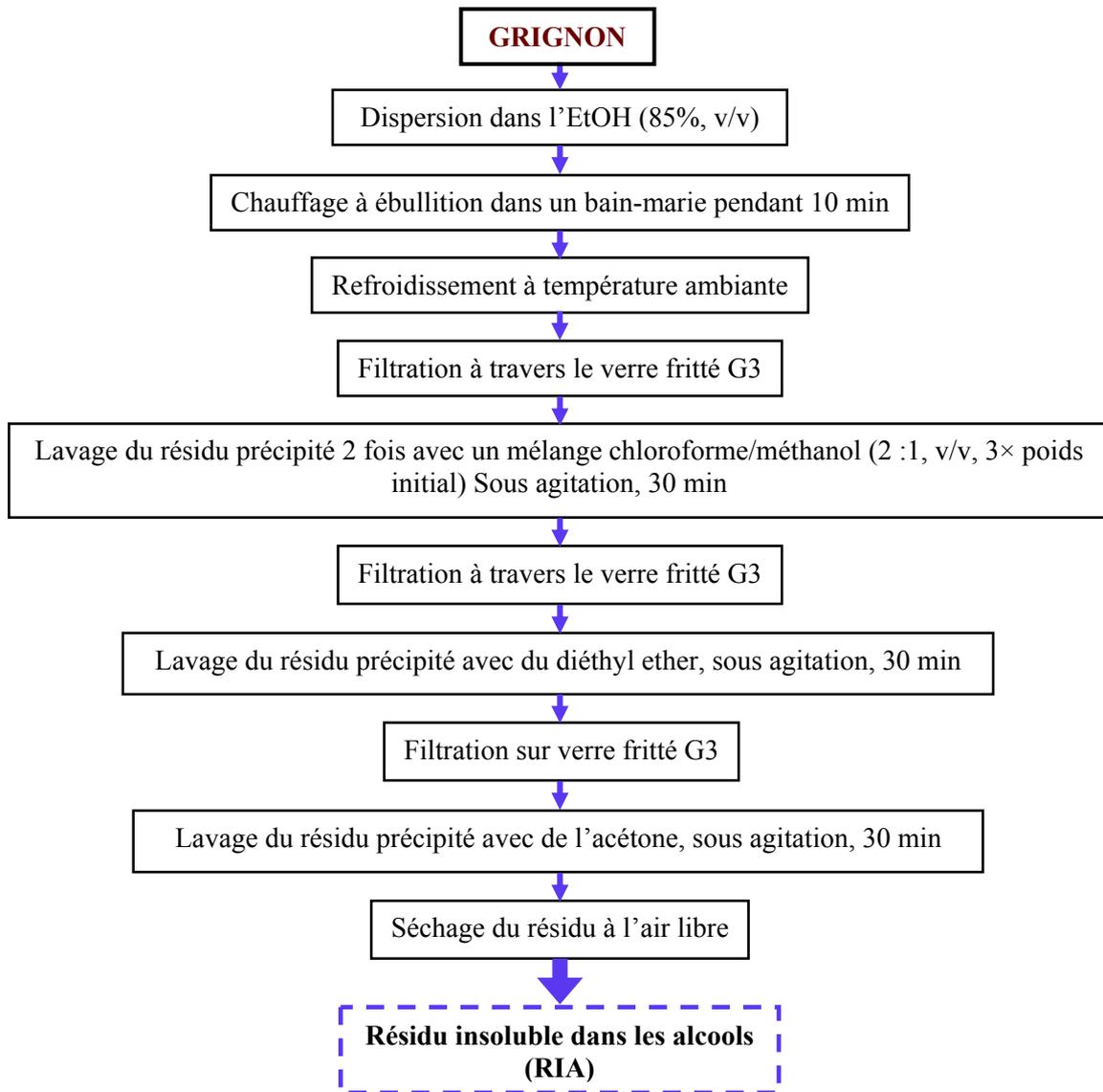


Figure 22 : protocole d'extraction du RIA à partir des grignons (CARDOSO *et al.* 2003a).

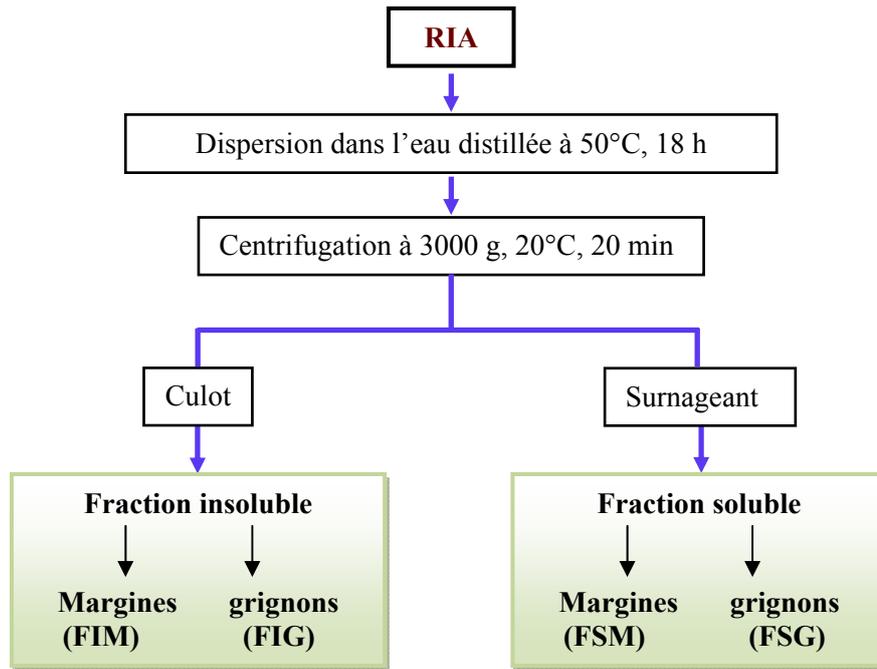


Figure 23 : Extraction des fractions soluble et insoluble à partir des sous-produits oléicoles.

1.2.2 Dosages colorimétriques

1.2.2.1 Dosage des oses neutres et des oses acides

Principe

En présence d'acide sulfurique concentré à chaud, les polysaccharides subissent une hydrolyse quantitative. Les unités monosaccharidiques libérées sont déshydratées par réaction avec l'acide sulfurique et produisent les dérivés furfurals. D'autres réactions ont lieu entre les dérivés furfuriques et un phénol conduisant à l'apparition d'une couleur détectable.

Pour les oses neutres (ON), les dérivés furfurals se condensent avec le résorcinol (MONSIGNY et *al.*, 1988) et dans le cas des oses acides (OA) la condensation se fait avec le méta-hydroxybiphényle (m-HBP) (BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN, 1973). Ces tests sont très sensibles et permettent de détecter jusqu'à 1 µg de composé.

1.2.2.1.1 Dosage des oses neutres par le résorcinol

200 µL de chaque échantillon sont mélangés à 200 µL d'une solution de résorcinol (6 mg/mL) et 1 mL d'H₂SO₄ (80%). Après incubation pendant 30 min à 90°C, le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante pendant 30 min, puis dilué de moitié avec de l'eau distillée. Les DO sont mesurées à 450 nm. Une gamme étalon est préparée avec des solutions de Glc comprises entre 0 et 0,1 g/L.

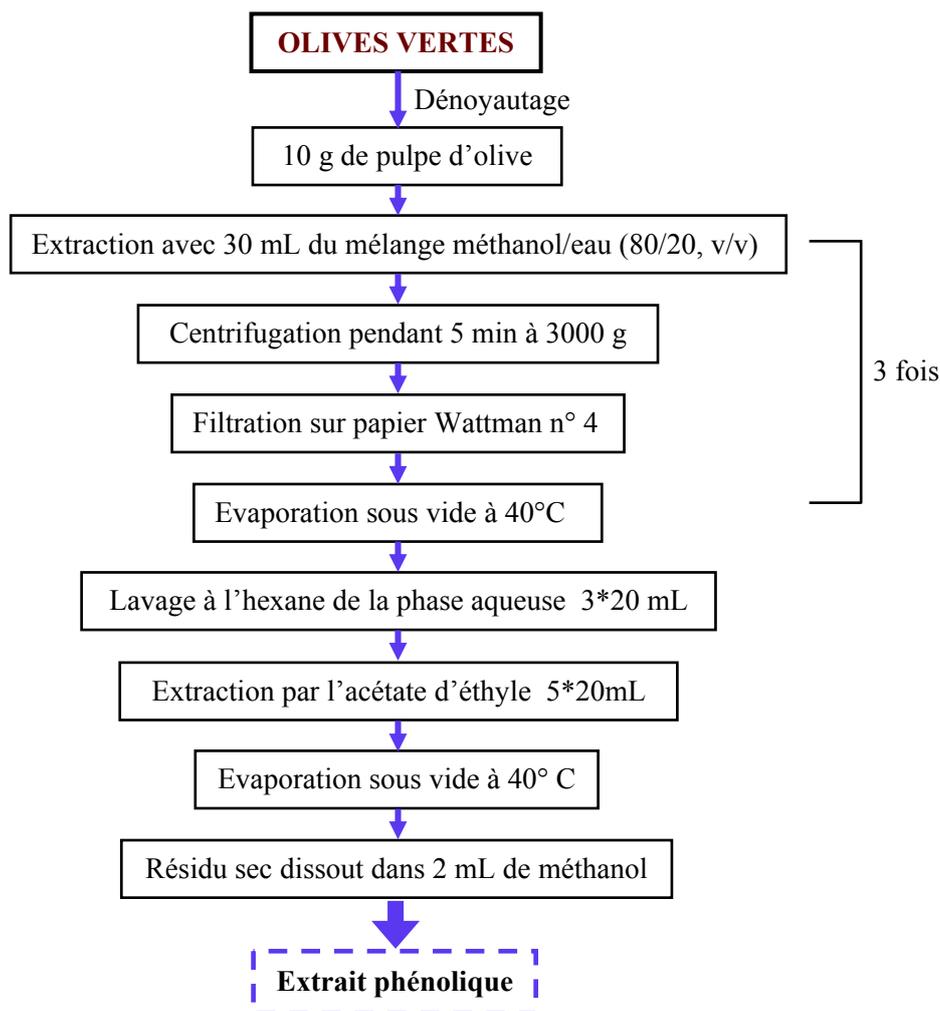


Figure 24 : Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe d'olive (BRENES *et al.*, 1995 ; SAVARESE *et al.*, 2007).

1.2.2.1.2 Dosage des oses acides par méta-hydroxybiphényle

4,576 g de tétraborate de sodium ou Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) sont dissous dans 100 mL d'acide sulfurique à 95-97%. Cette solution correspond à la solution de borax.

100 mg de m-HPB sont dissous dans 1 mL de DMSO. Cette solution est maintenue à 4°C à l'abri de la lumière. Avant utilisation, un volume de 5 mL de H_2SO_4 à 80% est ajouté à 102 μL de la solution de m-HBP. Une coloration jaune apparaît. 200 μL de chaque échantillon sont additionnés de 1 mL de borax. Après agitation et incubation à 90°C pendant 1 h, 200 μL de solution de m-HBP fraîchement préparée sont ajoutés et l'incubation à 90°C est maintenue pendant 2 min. L'absorbance est par la suite mesurée à 540 nm. Une courbe d'étalonnage est préparée avec des solutions d'AGlc de 0 à 0,1 g/L.

1.2.2.1.3 Détermination des concentrations en oses neutres et oses acides

En raison de l'interférence des acides uroniques dans le dosage des ON, il est nécessaire de corriger les concentrations par la méthode de SPIK et MONTREUIL (1964).

L'analyse spectrophotométrique des solutions étalons d'ON (Glc) et d'OA (AGlc) va permettre de tracer les droites étalons à partir desquelles les pentes suivantes sont déterminées :

α : pente de la gamme étalon d'ON obtenue par le dosage du résorcinol

β : pente de la gamme étalon d'OA obtenue par le dosage du résorcinol

α' : pente de la gamme étalon d'ON obtenue par le dosage au m-HBP

β' : pente de la gamme étalon d'OA obtenue par le dosage au m-HBP

Les concentrations en ON et en OA sont calculées en utilisant les équations 1 et 2 comme démontré ci-dessous:

On a : $DO_{\text{résorcinol}} = \alpha [\text{ON}] + \beta [\text{OA}]$

$DO_{\text{m-HBP}} = \alpha' [\text{ON}] + \beta' [\text{OA}] \approx \beta' [\text{OA}]$ d'où:

Equation (1) : $[\text{OA}] = DO_{\text{m-HBP}}/\beta'$

Equation (2) : $[\text{ON}] = [DO_{\text{résorcinol}} - (\beta (DO_{\text{m-HBP}}/\beta'))]/\alpha$

A noter que la concentration en oses totaux (OT) correspond à la concentration en ON sans correction de l'interférence des OA.

1.2.2.2 Dosage des sucres réducteurs à l'acide bicinchoninique

Principe

Ce test colorimétrique est basé sur la réduction du cuivre. Le couple L-sérine/ Cu^{2+} en présence d'une extrémité réductrice est réduit en L-sérine/ Cu^+ . La détection des ions Cu^+ est réalisée à l'aide de l'acide bicinchoninique (4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline) qui forme un complexe coloré avec le couple en L-sérine/ Cu^+ (WAFFENSCHMIDT and JAENICKE, 1987).

Mode opératoire

Deux solutions sont préparées pour le dosage.

La solution A : 2,42 g de Na_2CO_3 , 6,35 g de NaHCO_3 et 194,2 mg de 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline sont dissous dans 100 mL d'eau distillée.

La solution B : 126,2 mg de L-sérine et 124,8 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 100 mL d'eau distillée.

200 μL de chaque échantillon sont mélangés avec 800 μL d'eau distillée et 500 μL de réactif A+B (v/v). Le mélange réactionnel est incubé à 100°C pendant 15 min puis refroidi pendant

10 min dans un bain d'eau à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 540 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des solutions de Glc de concentrations comprises entre 0,0025 et 0,020 g/L.

1.2.2.3 Dosage des protéines

➤ Méthode de BRADFORD

Principe

La teneur en protéines dans les extraits polysaccharidiques est mesurée par la méthode de BRADFORD (1976). Cette technique utilise du bleu de Coomassie qui a la propriété de s'adsorber sur les protéines. Cette adsorption s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption de la molécule qui est décalé vers le bleu à 595 nm. Le développement de la couleur bleu est associé à la présence de certains acides aminés basiques tels que l'arginine, la lysine et l'histidine dans la structure protéique.

Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'échantillon est mélangé avec 5 mL de réactif de Bradford (dilué au 1/5). Le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Après incubation, les DO sont lues à 595 nm. La Bovin Serum Albumin (BSA) est utilisée comme standard pour la réalisation de la courbe étalon avec des concentrations comprises entre 0,2 et 1 g/L.

➤ Méthode de LOWRY

Pour les échantillons de membranes érythrocytaires, la teneur en protéines est déterminée par la méthode de Lowry.

Principe

La méthode de LOWRY et *al.* (1951) a été utilisée pour la détermination de la teneur en protéines dans l'échantillon de membranes érythrocytaires. C'est un dosage colorimétrique basé sur deux réactions. Une réaction de type Biuret, par laquelle les polypeptides donnent en milieu basique un complexe cuivrique coloré, est une réaction au cours de laquelle les groupements aromatiques de la tyrosine et du tryptophane, réduisent le réactif de Folin-ciocalteu. L'intensité de la coloration développée est proportionnelle à la concentration en protéines. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 750 nm.

Mode opératoire

Une solution alcaline et une solution cuivrique sont utilisées dans ce dosage. La solution alcaline est préparée par dissolution de 10 g de carbonate de sodium anhydre dans 500 mL de NaOH (0,1 M) (solution A). La solution cuivrique est formée par le mélange de même

volumes d'une solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,32%, m/v) et d'une solution de tartrate double de potassium et sodium (1%, m/v) (solution B). La solution C est constituée par le mélange des solutions A et B dans le rapport 50:1 respectivement. A 1 mL d'échantillon, contenant entre 25 μg -100 μg de protéines, est rajouté 5 mL de la solution. Ce mélange est incubé 10 min à température ambiante. 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu sont additionnés au mélange. Après incubation à l'abri de la lumière pendant 30 min, les DO sont lues à 750 nm. Une droite d'étalonnage a été réalisée avec des solutions de concentrations croissantes de BSA (0 à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans les mêmes conditions.

1.2.2.4 Dosage de l'azote total

Principe

La mesure de l'azote total correspond au dosage de l'ensemble de l'azote sous forme organique, ammonium, nitrate et nitrite. Ce dosage est réalisé par la méthode HACH Test N Tube 10072 (Hach Company, 1997-2009, www.hach.com). Cette méthode permet une analyse simple et rapide en tubes prêts à l'emploi et donne des résultats précis et répétables puisque elle minimise la manipulation des produits. Une digestion au persulfate à chaud, dans une gamme de 10 à 150 mg/L est effectuée en milieu alcalin et convertit toutes les formes d'azote en nitrates. Le métabisulfite de sodium est ajouté après la digestion pour éliminer l'interférence des oxyhalogénures. Le nitrate réagit avec l'acide chromotropique en milieu acide fort pour former un complexe jaune avec une absorbance maximale proche de 420 nm.

Mode opératoire

Le blanc et l'échantillon (0,5 mL) sont préparés dans un tube de réactif hydroxyde 0,1 M pour azote total (milieu alcalin), auquel est ajoutée une gélule de réactif persulfate pour azote total. Les tubes sont bouchés et agités pendant 30 secondes puis placés dans le réacteur DCO pour chauffage pendant 30 min à 105°C. Après refroidissement à température ambiante, une gélule de réactif NT A (bisulfite) est ajoutée à chaque tube avec agitation pendant 15 secondes. Une gélule de réactif NT B (indicateur) est par la suite ajoutée à chaque tube avec agitation pendant 15 secondes. Deux mL de chaque tube (échantillon et blanc) sont ajoutés à deux tubes de réactif NT C (solution acide). Les tubes sont ensuite agités par retournement. Après une période de réaction de 5 min, les teneurs en azote total sont données en mg/mL par mesure de la DO à 420 nm (Annexe 1).

1.2.2.5 Dosage des composés phénoliques totaux

Principe

La concentration des CP totaux a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu qui repose sur la grande oxydabilité de ces composés. Le réactif utilisé est un mélange de phosphomolybdate et tungstate de sodium, qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en milieu alcalin en un chromogène de couleur bleu. La coloration produite est proportionnelle (absorption maximale comprise entre 725 et 750 nm) à la quantité en CP totaux.

Mode opératoire

Le dosage des CP est réalisé selon la procédure décrite par GUTFINGER (1981).

0,1 mL de l'échantillon sont dilués avec l'eau distillée 50 fois (5 mL) puis additionnés de 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min d'incubation, 1 mL de la solution de carbonate de sodium NaCO₃ (35%) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité puis dilué jusqu'à un volume final de 10 mL. Les DO sont mesurées à 725 nm après 1 h d'incubation. L'acide gallique (AG) est utilisé comme standard pour la préparation de la courbe d'étalonnage dans une gamme allant de 0-10 µg/mL de la solution d'échantillon.

1.2.3 Analyse des monosaccharides constitutifs des polysaccharidiques par chromatographie haute performance échangeuse d'anions

Principe

La Chromatographie haute performance échangeuse d'anions (HPAEC), couplée à un système de détection ampérométrique pulsé (HPAE-PAD), est une technique qualitative et quantitative très performante pour l'analyse directe d'une large variété de mono-, et oligosaccharides sous forme d'alcoolates (R-O⁻) à pH alcalin. Les sucres sont des acides faibles ayant des pKa dans la gamme 12-14 et, par conséquent, à des pH élevés leurs groupes hydroxyles sont partiellement ou totalement transformés en oxyanions ce qui permet leur élution sélective par échange anionique. La rétention est d'autant plus élevée que la valeur de pKa est faible. La figure 25 présente le système HPAE-PAD pour l'analyse des monosaccharides.

Des colonnes CarboPac PA1 sont utilisées. La phase stationnaire est constituée de billes de 10 µm de diamètre formées d'une résine macroporeuse obtenue à partir de la copolymérisation de polystyrène et de divinylbenzène qui sont agglomérés avec des particules de latex fonctionnalisées par des groupements NR₄⁺ (Figure 26). Cette phase stationnaire présente l'avantage d'être stable sur une large gamme de pH (0 à 14) jusqu'à des pressions de 4000 psi (275 bars).

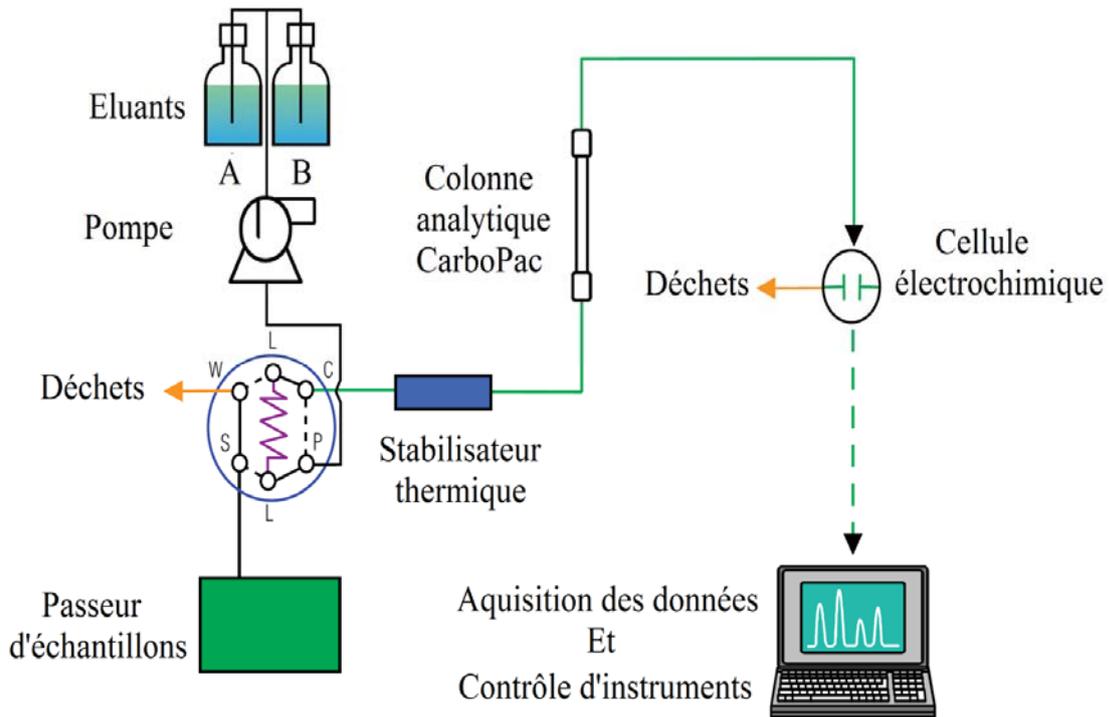


Figure 25 : Système HPAE-PAD pour l'analyse des monosaccharides (www.dionex.com).

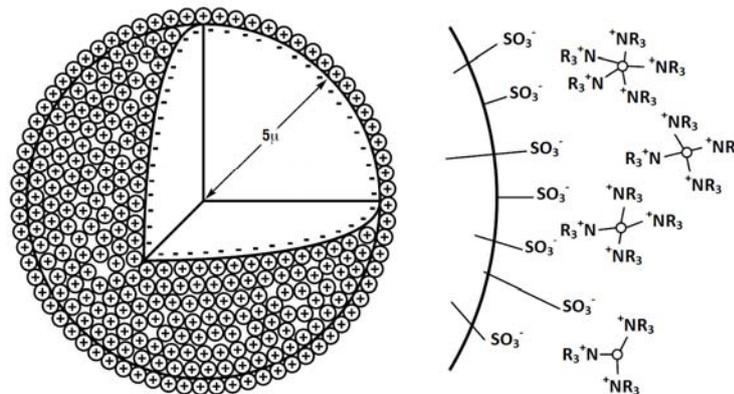


Figure 26 : Représentation schématique d'une bille de résine échangeuse d'anions pour la colonne CarboPac PA1 (www.dionex.com).

La détection ampérométrique est utilisée pour la détermination de composés contenant des groupes électroactifs tels que les groupes aldéhyde et alcools des mono- ou oligosaccharides. En sortie de colonne, les mono- et oligosaccharides sont détectés en mesurant le courant électrique produit par leur oxydation à la surface d'une électrode d'or. Le courant généré par cette oxydation est proportionnel à la concentration du composé élué, ce qui rend l'analyse quantitative.

Un premier potentiel positif (E1) oxyde les sucres. Un second potentiel E2, supérieur à E1, oxyde l'électrode d'or et la nettoie des produits de l'oxydation. Un dernier potentiel (E3) négatif réduit les oxydes formés à la surface de l'électrode pour retrouver l'état initial (Figure 27). Les potentiels E1, E2 et E3 sont appliqués respectivement pendant les temps t1, t2 et t3. La première période (t1) est subdivisée en une période d'attente et une de détection. La période d'attente est la durée nécessaire pour que seul le courant, lié à l'oxydation de l'analyte soit mesuré pendant la période de détection. Après l'attente, le signal est mesuré en intégrant le courant pendant un temps fixé. Le courant intégré pendant un temps fixé est une charge et son unité est le coulomb.

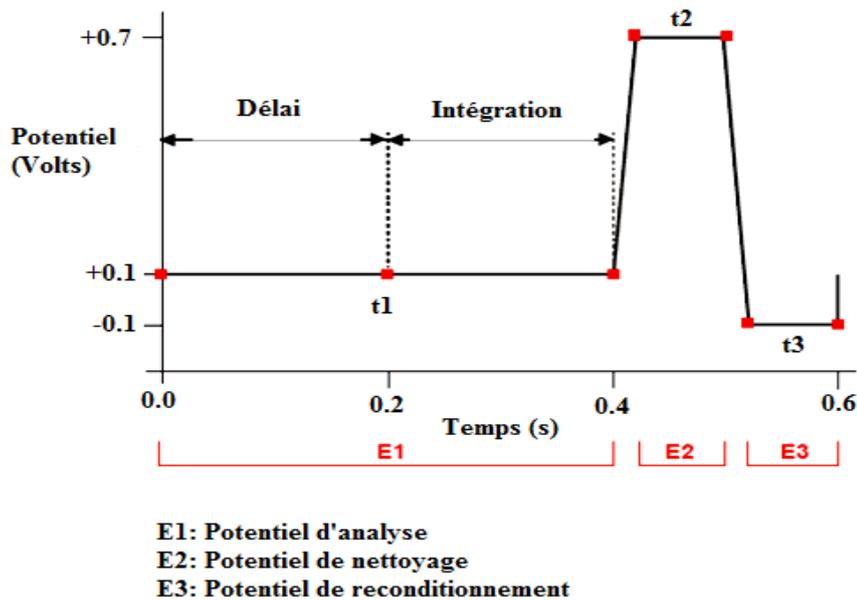


Figure 27 : Diagramme des potentiels appliqués à l'électrode d'or d'un détecteur ampérométrique pour la détection des sucres (www.dionex.com).

Mode opératoire

L'appareillage utilisé est une chaîne de chromatographie ionique ICS 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale (CA), USA) composée d'un module de pompe pouvant fonctionner en gradient et d'un détecteur ampérométrique pulsé (HPAE-PAD). L'acquisition des données et leur traitement sont réalisés par le logiciel Chromeleon (version 6.8). La boucle d'injection fait 25 µL. L'analyse des monosaccharides est réalisée en utilisant une précolonne CarboPac PA1 (4 x 50 mm) et une colonne analytique CarboPac PA1 (4 x 250 mm). Avant injection, les colonnes sont équilibrées par élution pendant 15 min avec une solution de NaOH 18 mM. Les échantillons sont ensuite élués avec une solution de NaOH 18 mM pendant 30 min, suivi par un gradient linéaire entre 0 et 1 M d'acétate de sodium dans une solution de NaOH 200 mM pendant 20 min pour éluer les monosaccharides acides. Les colonnes sont ensuite lavées pendant 15 min avec une solution de NaOH 200 mM. Le débit d'élution est maintenu à 1 mL/min et les colonnes sont thermostatées à 25°C. Les données sont collectées et analysées avec le logiciel Chromeleon.

Avant l'analyse des monosaccharides constituant les échantillons de polysaccharides par HPAE-PAD, une hydrolyse préalable est réalisée sous l'action de l'acide sulfurique ou de l'acide trifluoroacétique (TFA) comme suit :

-Hydrolyse à l'acide sulfurique

Dix mg de chaque échantillon (RIA, FSM, FIM, FSG et FIG) sont additionnés de 125 µL d' H_2SO_4 (13,50 M). Le mélange est incubé 45 min à température ambiante. Après incubation, 1,35 mL d'eau distillée ajuste la concentration de l'acide sulfurique à 1 M. Les échantillons sont par la suite incubés pendant 3 h à 100°C. Après refroidissement, l'acide est neutralisé par une solution d'ammoniaque.

-Hydrolyse à l'acide trifluoroacétique (TFA)

Dix mg de chaque échantillon (RIA, FSM, FIM, FSG et FIG) sont mélangés avec 1 mL de TFA (4 M). Les échantillons sont incubés à une température de 100°C pendant 8 h et après refroidissement à température ambiante ils sont neutralisés par une solution d'ammoniaque.

La comparaison des différents temps d'élution avec ceux de standards permet leur identification et leur quantification.

Deux mélanges de monosaccharides standards, a et b, ont été constitués de telle manière que les temps de rétention des oses faisant partie d'un même mélange soient éloignés pour une meilleure résolution :

Mélange a : Fuc, Rha, Gal, Man et AGal.

Mélange b : Ara, Glc, Xyl et AGlc.

Chaque mélange d'oses est préparé à quatre concentrations différentes (0,5 ; 0,1 ; 0,15 et 0,2 g/L).

A noter que la composition en monosaccharides de la FSM est confirmée par la méthode de l'étalon interne. L'échantillon FSM est préparé à chaque fois à une concentration de 1 g/L additionné d'une certaine quantité de l'ose (étalon interne) dont la présence est à confirmer. La quantité ajoutée de l'étalon interne est choisie convenablement de telle manière que le signal du pic résultant ne soit pas trop élevé et reste dans la gamme des autres pics détectés.

1.2.4 Etude de la fraction soluble extraite des margines

1.2.4.1 Analyse de la FSM par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

-Principe et équipement

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique d'analyse rapide, sensible, et capable de séparer des mélanges complexes permettant une analyse qualitative et quantitative des différents constituants glucidiques après dérivatisation. Les méthodes de dérivatisation les plus appliquées aux sucres sont la triméthylsilylation et la réduction des monosaccharides en alditols. En CPG couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), l'identité des sucres est déterminée sur la base des temps de rétention relatifs et des modèles de fragmentation.

Un spectromètre de masse comprend successivement : l'injecteur, la source d'ions, le détecteur et l'enregistreur. Il existe différents type d'ionisation et l'ionisation par impact électronique utilisé lors de nos travaux est le plus répandu. Dans la spectrométrie de masse par impact électronique, les molécules pénètrent dans la chambre d'ionisation où elles sont bombardées par des électrons libres émis à partir d'un filament. Ce phénomène conduit à une ionisation forte qui fragmente la molécule et la transforme en particules chargées positivement qualifiées d'ions. Ces derniers passent à travers l'analyseur (trappe) qui filtre les ions en fonction du rapport masse sur charge (m/z). Les spectres de masse sont donc enregistrés en mode positif. La fragmentation et l'abondance des fragments donnent à chaque composé un spectre de masse caractéristique.

Les échantillons sont analysés sur un chromatographe Agilent 6890 Series GC System équipé d'un passeur automatique Agilent 7683 Series Injector et couplé à un spectromètre de masse Agilent 5973 Network Mass Selective Detector. Une colonne apolaire Agilent HP-1 (de 30 m de longueur, de 0,320 mm de diamètre et dont l'épaisseur du film de la phase stationnaire est

de, 0,25 μm), composée d'une phase stationnaire constituée de 100% diméthyle polysiloxane, est installée sur l'appareil. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium à un débit de 2,3 mL/min. La pression de l'hélium est de 8,8 psi. Un μL d'échantillon est injecté en mode split (1% de l'échantillon analysé est passé dans la colonne, le reste est éliminé). Le mode d'ionisation utilisé est l'ionisation par impact électronique (EI, 70 eV). La température à la trappe est de 150°C et la plage de masse va de 40-800 m/z. La figure 28 présente le schéma d'une source à ionisation par impact électronique.

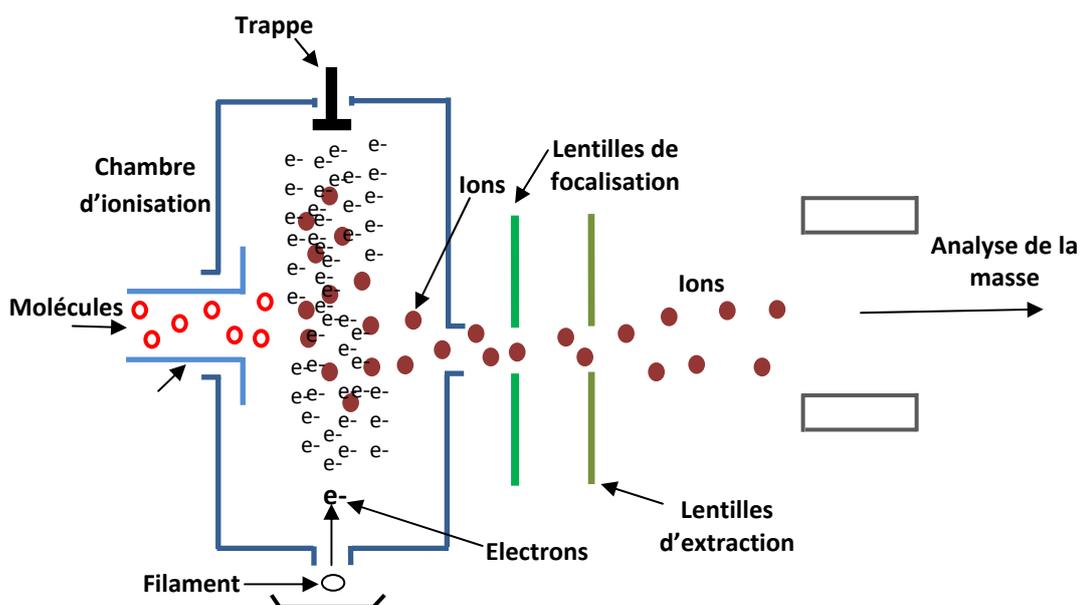


Figure 28 : Schéma d'une source à ionisation par impact électronique.

1.2.4.1.1 Dérivatisation par triméthylsilylation

Principe

La silylation est la méthode de dérivation la plus utilisée pour l'analyse des monosaccharides en CPG. Lors de la silylation, un hydrogène réactif est remplacé par un groupement alkyl-silyle, le plus souvent le triméthylsilyle (TMS). Le remplacement d'hydrogène par un groupe silyle réduit la polarité du composé (PIERCE, 1968). Les dérivés silyles (ex : dérivés de triméthylsilyle) sont plus volatils, moins polaires et plus thermostables comparativement aux autres composés volatiles générés (KATAOKA, 2005).

Le BSTFA (Bis (triméthylsilyle) trifluoroacétamide) et le TMCS (trimethylchlorosilane) sont les réactifs les plus utilisés pour la triméthylsilylation de plusieurs substances (alcools, alcaloïdes, amines, acides carboxyliques, phénols, etc). L'agent de silylation le BSTFA agit

comme donneur triméthyle silylique puissant alors que le TMCS joue le rôle d'un catalyseur et augmente la réactivité de BSTFA améliorant ainsi l'efficacité de la dérivation (SHAREEF *et al.*, 2004). La figure 29 donne la réaction de triméthylsilylation.

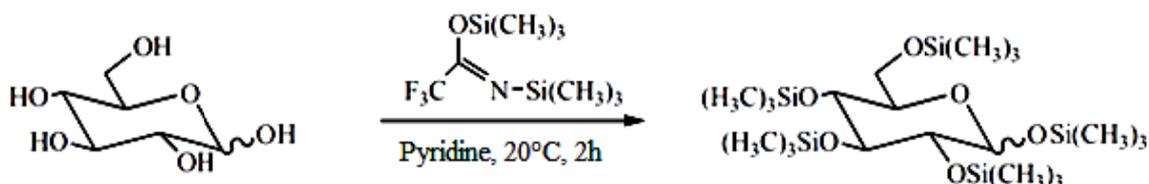


Figure 29 : Réaction de triméthylsilylation (GAËL, 2005).

Mode opératoire

L'hydrolyse de 10 mg de polysaccharide est réalisée par solubilisation dans du TFA 2 M (2 mL) et est suivie d'un chauffage à 120°C pendant 90 min. La préparation est ensuite évaporée sous azote. La dérivation avec le mélange BSTFA : TMCS (99 :1) est réalisée par la méthode adaptée par PIERRE *et al.* (2013). Deux mg d'un hydrolysate acide de polysaccharide sont mis en présence de 400 µL de pyridine, utilisé comme solvant, et 400 µL de BSTFA : TMCS (99 : 1). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 2 h à température ambiante. Les réactifs en excès sont évaporés sous jet d'azote. Les résidus O-triméthylsilylés sont ensuite repris dans 500 µL de dichlorométhane. Le même protocole est suivi pour la préparation de standards monosaccharidiques.

Dans ce cas, le programme du gradient de température utilisé pour l'analyse en CPG est le suivant : 3 min à 100°C puis une montée en température de 8°C/min jusqu'à 200°C puis palier à 200°C pendant 1 min et ensuite une dernière augmentation de température de 5°C/min jusqu'à 250°C puis palier à 250°C pendant 5 min.

1.2.4.1.2 Dérivation par acétylation

Principe

L'acétylation des monosaccharides génère des acétates d'alditols volatils par remplacement des hydrogènes de groupes hydroxyles par des groupes acétyles diminuant ainsi le taux de liaisons hydrogènes susceptibles d'être formées et de ce fait le point d'ébullition du composé (DEPASS, 2011).

La préparation des acétates d'alditols nécessite la réduction préalable des monosaccharides par le borohydrure de sodium suivie par leur acétylation en présence d'anhydride acétique

dans la pyridine (Figure 30). Cette méthode est souvent employée du fait de la stabilité des composés formés et de la bonne résolution chromatographique. Dans ce cas, chaque monosaccharide modifié sera identifié sous la forme d'un pic. En effet, l'étape de réduction permet d'éviter le phénomène de mutarotation et par conséquent la formation des isomères α et β des formes furanique et pyranique (RUIZ-MATUTE et *al.*, 2011).

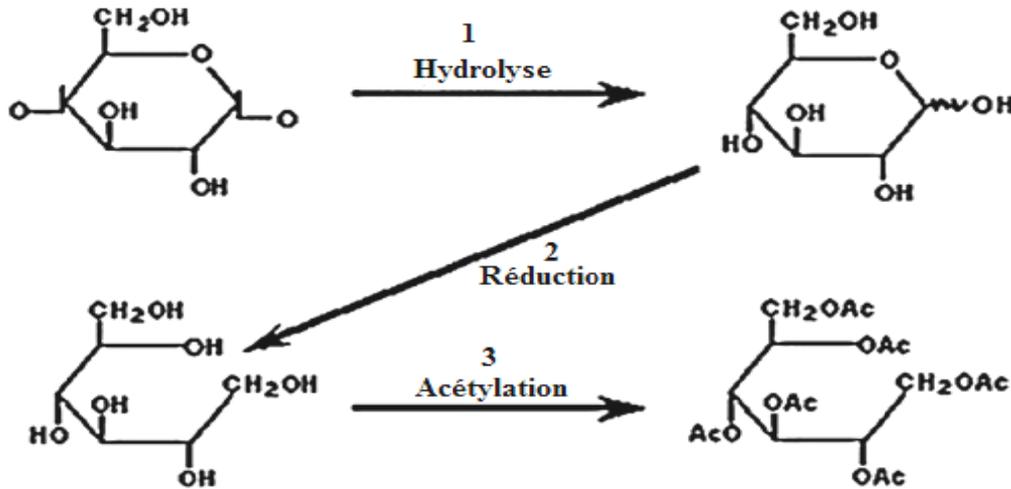


Figure 30 : Préparation d'acétates d'alditols. Ac : COCH₃ (RUIZ-MATUTE et *al.*, 2011).

Mode opératoire

Cinquante mg de polysaccharide sont hydrolysés par 2 mL d'HCl 2 M. La solution est agitée au vortex puis purgée à l'azote. Le mélange est incubé dans un bain sec à 90°C pendant 3 h. Après refroidissement dans la glace, le mélange est neutralisé par NH₄OH (5 M). 500 μ L d'érythritol (1 mg/mL), utilisé comme étalon interne, sont additionnés à l'hydrolysate. Après agitation, 800 μ L de cette solution sont prélevés dans un tube de 20 mL auxquels sont ajoutés 2 mL de la solution de NaBH₄ (20 g/L). Le tube fermé hermétiquement est agité puis incubé pendant 90 min à 40°C dans un bain-marie. Après incubation 0,6 mL d'acide acétique glacial puis 0,4 mL de 1-méthylimidazole et 4 mL d'anhydride acétique sont ajoutés au mélange avant agitation. Après 15 min, 10 mL d'eau distillée diluent le mélange. Après refroidissement le milieu réactionnel est additionné de 3 mL de dichlorométhane, mélangé et décanté. Un mL de la phase inférieure est prélevé, après élimination de la phase supérieure par aspiration, puis évaporé sous jet d'azote. Le résidu est repris dans 500 μ L de dichlorométhane.

Le même protocole est suivi pour la préparation des acétates d'alditols pour les standards monosaccharidiques. Le programme de température se définit comme suit: un palier initial à 50°C pendant 1 min puis une montée en température de 20°C/min jusqu'à 120°C suivie par une montée en température de 10°C/min jusqu'à 240°C puis palier à 240°C pendant 3 min, et une dernière montée en température de 20°C/min jusqu'à 280°C et un palier de 5 min à cette température.

1.2.4.2 Fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique

1.2.4.2.1 Analyse de la FSM par une Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

Principe

Les colonnes de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) séparent les macromolécules biologiques selon leur taille hydrodynamique (ou volume hydrodynamique). Les solutés sont élués dans l'ordre inverse des MM. Les polysaccharides ne sont que rarement globulaires et le plus souvent linéaires ou ramifiés. Par conséquent leur comportement diffère de celui des protéines dans les conditions natives d'exclusion stérique. En général, les polysaccharides linéaires possèdent un temps de rétention plus faible que les polysaccharides ramifiés de même poids moléculaire, à cause de leur volume hydrodynamique plus large.

Mode opératoire

Un mL de solution polysaccharidique à une concentration de 10 mg/mL est filtré sur une membrane à 0,45µm avant analyse sur un système de chromatographie basse pression de type Akta Purifier. La séparation a été réalisée au moyen d'une colonne de type Superdex 200 10/300GL ayant un volume total de 24 mL. Le gel a une limite d'exclusion de $1,3 \cdot 10^6$ Da et présente un domaine de séparation optimum de 10000-600000 Da pour les protéines et entre 1000-100000 pour les dextrans.

Les échantillons sont élués à un débit de 0,5 mL/min par un tampon phosphate (50 mM pH 7,0 additionné de NaCl (150 mM) préalablement filtré et dégazé.

Pour obtenir des valeurs des masses molaires (MM) moyennes des polymères, il est nécessaire d'établir une ou plusieurs courbes d'étalonnage indiquant la MM moyenne en fonction du volume hydrodynamique des macromolécules.

L'étalonnage est réalisé en injectant des dextrans de MM différentes (6, 40, 70, 100, 200 et 500 kDa) ont été utilisés comme standards polysaccharidiques. Ils sont préparés et injectés séparément à une concentration de 2 g/L dans le tampon phosphate. Les composés élués ont été détectés par réfractométrie et par absorbance à 280 nm.

Le tracé du K_{av} , coefficient de partage dont la formule est donnée ci-après, en fonction du logarithme des MM moyennes permet d'établir une courbe d'étalonnage.

$$\text{Equation (3) : } K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

Avec :

V_e : volume d'élution d'un soluté

V_t : volume total du gel

V_0 : volume mort. Ce volume est mesuré par le volume d'élution d'un soluté de MM connue supérieure à la limite d'exclusion du gel.

Les échantillons sont injectés à une concentration de 10 g/L (volume injecté = 11 mL) et élués à 0,5 mL/min. Le contenu en ON et en OA des différentes fractions collectées (0,5mL) a été déterminé.

1.2.4.2.2 Analyse de la FSM par SEC-MALLS

Le principe de la chromatographie de type SEC-MALLS est de coupler une SEC haute performance à un réfractomètre différentiel ainsi qu'à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles (MALLS, *Multi-Angle Laser Light Scattering*). Ainsi, si cette technique sépare dans un premier temps les molécules en fonction de leur volume hydrodynamique, elle permet dans un second temps de concilier une analyse de la concentration et des propriétés de diffusion des macromolécules.

L'analyse par SEC/MALLS est réalisée avec des colonnes shodex SB-806, 804, 803 en série. L'échantillon est injecté (10 mg/mL) avec un débit d'élution de 0,5 mL/min, l'éluant étant constitué d'une solution de NaNO_3 0,1 M additionné de NaN_3 à 2,5 mM.

Un polymère a le plus souvent une distribution de chaînes de longueurs différentes avec :

i = degré de polymérisation

M_i = MM des chaînes de degré de polymérisation i

N_i = nombre de chaînes de MM M_i

On définit une MM moyenne en nombre M_n (moyenne des MM pondérée par le nombre de chaînes de chaque longueur) et une masse MM en poids M_w (moyenne des MM pondérée par la masse des chaînes de chaque longueur) dont les formules sont données ci-dessous :

$$\text{Equation (4) : } M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

$$\text{Equation (5) : } M_w = \frac{\sum_i N_i M_i M_i}{\sum_i N_i M_i}$$

1.2.4.3 Dessalage des fractions

1.2.4.3.1 Dialyse des solutions polysaccharidiques

Mode opératoire

Une solution de polysaccharide à 20 g/L a été préparée, puis dialysée contre de l'eau distillée à l'aide de membranes de dialyse dont le seuil de coupure est de 10 KDa. La dialyse est réalisée pendant 48 h en renouvelant 6 fois le bain de dialyse.

Les fractions dialysées sont lyophilisées et stockées à température ambiante.

1.2.4.3.2 Dessalage par ultrafiltration sur cellule Amicon

Dans ce dispositif, une cellule de filtration tangentielle (cellule Amicon), a été utilisée.

La solution de la fraction de MM la plus élevée issue du fractionnement de la FSM par la SEC est dessalée sur des membranes de seuil de coupure de 3000 Da.

1.2.4.3.3 Dessalage sur Biogel P2

Principe

Les Bio-gel P2 sont des gels poreux constitués de polyacrylamide préparé par copolymérisation d'acrylamide et de N, N'- méthylène-bis-acrylamide. Ces gels sont extrêmement hydrophiles et non chargés. Une colonne de Biogel P2 dont la limite d'exclusion se situe entre 100-18000 Da, a été préparée pour le dessalage de fractions polysaccharidiques.

-Préparation de la colonne de Biogel P2

Les autres fractions issues du fractionnement de la FSM par la SEC ont été injectées puis éluées par du méthanol 5 % (v/v) avec un débit de 0,75 mL/min. Des fractions de 8 mL ont été collectées en sortie de colonne. La conductivité, l'indice de réfraction et l'absorbance à 254 nm ont été enregistrés en sortie de colonne.

1.2.4.4 Fractionnement par chromatographie échangeuse d'anions

Principe

Une colonne Resource Q (1 mL) permet la séparation des molécules par chromatographie échangeuse d'anions. La colonne est constituée d'une matrice hydrophile contenant des particules rigides et monodisperses de polystyrène/divinylbenzène, substituées avec des groupements ammonium quaternaires (Q). Cette combinaison confère une stabilité chimique et physique extrême au milieu. La faible dimension des particules permet une liaison et une dissociation rapide avec une haute résolution tandis que l'uniformité des particules permet de travailler avec des débits élevés à de basses pressions. Les groupes échangeurs d'ions maintiennent leurs charges dans une large gamme de pH.

Mode opératoire

Un tampon phosphate (50 mM, pH 6,5) a été utilisé comme tampon d'équilibration. Lors de l'analyse de l'échantillon, deux types d'éluion en mode gradient ont été appliqués avec un débit d'éluion de 1 mL/min.

Un premier gradient G1 par paliers de NaCl dans le tampon phosphate (50 mM, pH 6,5), est appliqué comme suit :

- Palier 1 : Elution avec le tampon phosphate, NaCl 0 M pendant 8 V de colonne ;
- Palier 2 : Elution avec le tampon phosphate, NaCl 0,125 M pendant 10 V de colonne ;
- Palier 3 : Elution avec le tampon phosphate, NaCl 0,25 M pendant 10 V de colonne ;
- Palier 4 : Elution avec le tampon phosphate, NaCl 0,50 M pendant 10 V de colonne ;
- Palier 5 : Elution avec le tampon phosphate, NaCl 1 M pendant 10 V de colonne.

Un deuxième gradient G2 par paliers de NaCl dans le tampon phosphate (50 mM, pH 6,5), est appliqué comme suit :

- Palier 1 : Elution avec le tampon phosphate, NaCl 0 M pendant 12 V de colonne ;
- Palier 2 : Elution avec le tampon phosphate, NaCl 0,25 M pendant 10 V de colonne ;
- Palier 3 : Elution avec le tampon phosphate, NaCl 1 M pendant 10 V de colonne ;

Des fractions de 0,5 mL sont collectées.

1.2.4.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Principe

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une méthode qualitative qui permet de révéler la présence de certains groupements fonctionnels caractéristiques d'un polymère et de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule (BRÜGEL, 1962).

L'appareillage utilisé est un spectroscope infrarouge à transformée de Fourier. Il est constitué de quatre éléments fondamentaux : la source infrarouge, un interféromètre, un détecteur et un enregistreur (Figure 31). Le faisceau infrarouge, produit généralement par chauffage d'un filament de Nernst, provenant de la source est dirigé vers l'interféromètre de Michelson, le cœur de l'instrument. Dans l'interféromètre le faisceau arrive sur le séparateur de rayons et l'intensité du rayonnement de la source est divisée en deux : 50% retournent à la source et 50% sont recombinaés de manière cohérente et envoyés vers l'échantillon. Un des faisceaux parcourt un chemin optique fixe, l'autre un chemin optique de longueur variable à cause d'un miroir mobile, avant d'être recombinaés, de traverser l'échantillon et de frapper le détecteur. L'intensité des interférences créées par le séparateur de rayons est enregistrée par le détecteur

(BORELLA, 2006). Un interférogramme est d'abord obtenu à partir duquel le spectre est calculé par transformée de Fourier (TF).

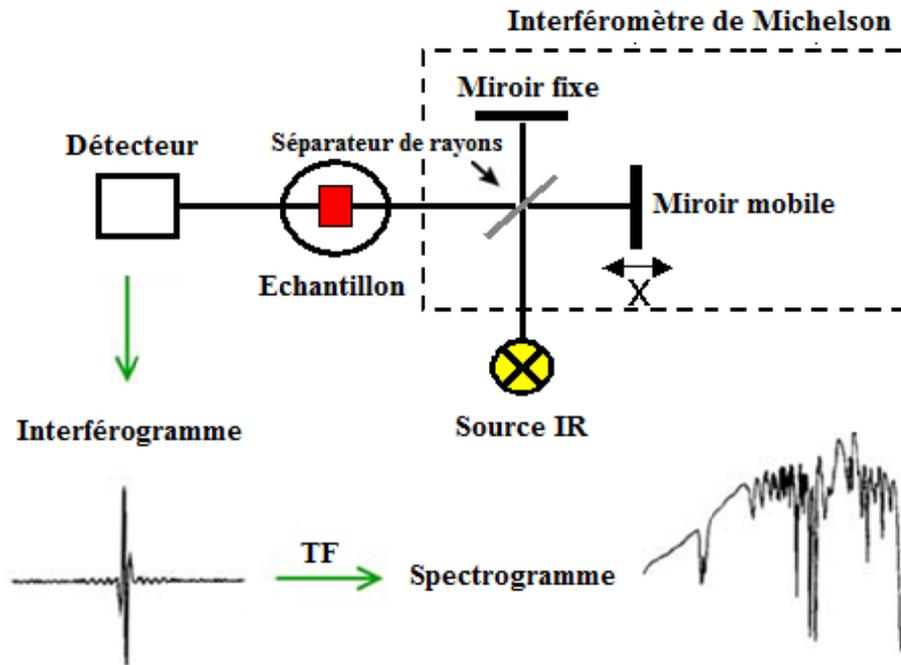


Figure 31 : Schéma du principe de l'analyse par spectroscopie d'absorption infrarouge.

Mode opératoire

L'analyse FT-IR a été réalisée en utilisant un instrument Nicolet 380 FT-IR (Thermoelectron Corporation, France). Cette méthode nécessite d'utiliser un support transparent en infrarouge tel que le bromure de potassium (KBr). Cent mg d'échantillon sont broyés en présence de poudre de KBr sec dans un mortier en agate. Le mélange est ensuite comprimé et pressé pour former une pastille. L'analyse est réalisée à température ambiante dans un intervalle spectral allant de 400 à 4000 cm^{-1} .

1.2.4.6 Hydrolyse de l'amidon

Le protocole décrit par McCLEARY, (2007) pour la mesure des fibres diététiques totales, a été adapté pour l'élimination de l'amidon potentiellement présent dans les échantillons à analyser. L'extrait polysaccharidique est traité par l' α -amylase et l'amyloglucosidase (AMG). Le mélange enzymatique est préparé comme suit : 0,1 g d' α -amylase (50 unités/g) sont dissous dans 290 mL de tampon maléate de sodium (50 mM, pH

6,0) contenant du CaCl₂ (2 mM) et de l'azide de sodium (0,02%, m/v) sous agitation pendant 5 min. Cette solution est ensuite additionnée de 3 mL d'AMG (3,4 unités/mL).

Un g de l'extrait à analyser est incubé dans 40 mL de mélange enzymatique pendant 16 h à 37°C. Au cours de cette période, l'amidon non résistant (si présent) est solubilisé et hydrolysé en D-Glc. La réaction est stoppée par addition de 3 mL d'une solution de Trizma-base, pour ajuster le pH à 8,2, et par incubation à 100°C. Trois volumes d'éthanol sont ajoutés, pour précipiter les fibres diététiques solubles sous forme de polymères et pour éliminer les unités D-Glc dérivées de la dépolymérisation de l'amidon non résistant. Le mélange est centrifugé à 10000 g pendant 10 min et le surnageant est éliminé. Le culot est solubilisé dans 50 mL d'eau distillée puis lyophilisé.

1.2.4.7 Déphénolisation des polysaccharides

1.2.4.7.1 Protocole de déphénolisation

L'objectif de ce protocole est d'extraire la majeure partie des CP liés à la fraction polysaccharidique. Le protocole suivi est celui décrit par SUN et *al.* (2001) et modifié par BURR et FRY (2009) (Figure 32).

Le protocole est réalisé en 3 étapes :

Etape 1 : les CP libres et non liés à l'échantillon sont extraits par l'acétate d'éthyle. Cinq cent mg d'échantillon sont mélangés à 100 mL d'acétate d'éthyle et le mélange est agité pendant 30 min. Le résidu polysaccharidique est récupéré par centrifugation à 10000 g pendant 10 min. Cette opération est répétée trois fois sur le résidu obtenu. Les surnageants récupérés sont combinés puis l'acétate d'éthyle est éliminé sous vide à 40°C. Le résidu sec est solubilisé dans 1 mL de méthanol et constitue la fraction CP1. Le culot résiduel correspond au résidu polysaccharidique R1.

Etape 2 : Cette étape a pour objectif d'extraire les CP qui pourraient être liés aux polysaccharides par des liaisons esters. Le résidu polysaccharidique obtenu après l'étape 1 (R1) est soumis à une hydrolyse alcaline douce en l'incubant dans NaOH 1 M à une concentration de 1% (m/v) pendant 18 h à 30°C. Après acidification du mélange à pH 2, les CP sont extraits 3 fois avec deux volumes d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter. Les phases organiques sont combinées et l'acétate d'éthyle est évaporé sous vide à 40°C. Le résidu sec est solubilisé dans 1 mL de méthanol et correspond à la fraction CP2. Le résidu polysaccharidique contenu dans la phase aqueuse est lyophilisé et le résidu obtenu correspond à R2.

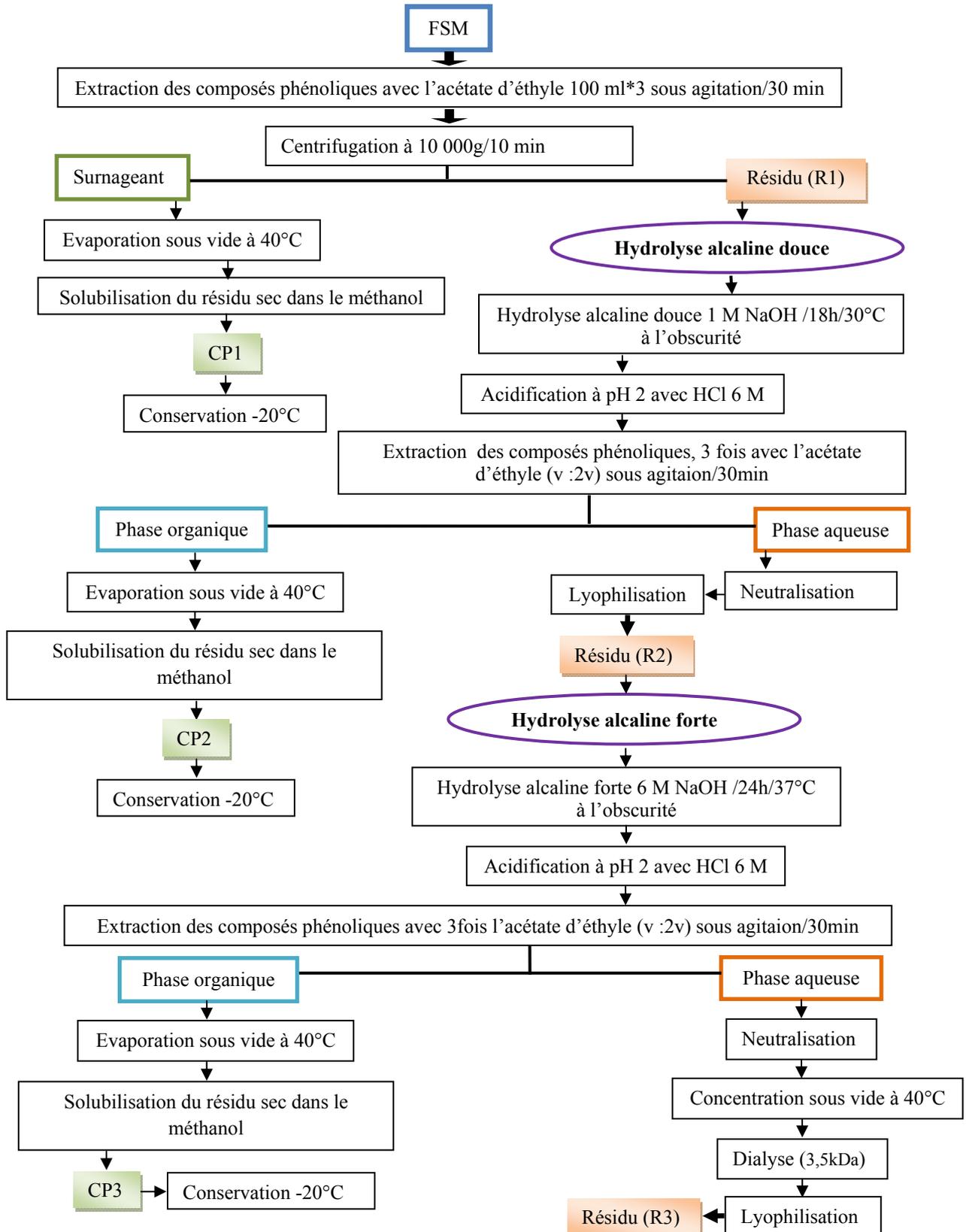


Figure 32 : Protocole de déphénolisation de la FSM.

Etape 3 : le résidu polysaccharidique obtenu à l'issue de l'étape 2 (R2) subit une hydrolyse alcaline forte dans NaOH 6 M à une concentration de 1% (m/v), pendant 24 h à 37°C, dans le but de rompre les liaisons éthers et donc de libérer les CP qui pourraient être liés aux polysaccharides par des liaisons éthers. Les CP correspondant (CP3) sont extraits comme expliqué pour l'étape 2. La phase aqueuse est neutralisée puis concentrée sous vide à 40°C. La solution concentrée est dialysée contre l'eau distillée dans des boudins de dialyse dont le seuil de coupure est de 3,5 kDa. La solution dialysée est ensuite lyophilisée et le résidu obtenu correspond à la fraction R3.

A la fin de chacune de ces étapes le contenu en CP totaux des extraits phénoliques CP1, CP2 et CP3 est déterminé. Le contenu en OT et en CP totaux sont également déterminés pour les fractions R1, R2 et R3.

1.2.4.7.2 Caractérisation des extraits phénoliques obtenus après déphénolisation par chromatographie sur couche mince

Les extraits phénoliques collectés à l'issue du protocole de déphénolisation sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Des plaques de dimension 20 cm x 20 cm et recouvertes avec du gel de silice 60 et un indicateur fluorescent à 254 nm ont été utilisées.

L'éluant de migration utilisé est celui décrit par MABINYA et *al.* (2006) pour la détermination de l'acide férulique et d'autres CP par CCM. Il correspond au mélange de solvants formé par le chloroforme : méthanol : acide formique (85:15:1, v :v :v).

L'éluant a été réalisée dans des cuves en verre contenant 100 mL d'éluant. Les cuves sont laissées pour saturation toute la nuit précédant l'analyse. À l'aide d'une seringue, des dépôts de 10 µL d'une solution de 0,2 mg/mL de standards phénoliques (AC, AG, acide férulique, acide cinnamique, acide coumarique et oleuropeine) ou des extraits phénoliques CP1, CP2 et CP3 ont été appliqués. Les différents dépôts sont espacés de 1 cm afin de prévenir la superposition des taches. Après migration, la plaque est séchée à l'air puis observée à l'aide d'une lampe UV à deux longueurs d'onde (254 nm et 366 nm). Les spots apparents ont été notés au crayon pour chaque longueur d'onde.

1.2.5 Etude des activités biologiques

1.2.5.1 Evaluation de l'activité prébiotique *in vitro* des extraits polysaccharidiques issus des margines

1.2.5.1.1 Test de digestibilité par le jus gastrique humain artificiel

La digestibilité des polysaccharides est testée en calculant leur degré d'hydrolyse après incubation avec un jus gastrique humain artificiel. L'inuline et les FOS sont utilisés comme prébiotiques de référence. Chaque composé est dissous à 1% (m/v) dans l'eau distillée) et leur indigestion est testée selon la méthode décrite par KORAKLI *et al.* (2002). Un jus gastrique artificiel est préparé en utilisant un tampon HCl contenant les réactifs suivant : NaCl (8 g/L), KCl (0,2 g/L), Na₂HPO₄·2H₂O (8,25 g/L), NaHPO₄ (14,35 g/L), CaCl₂·2H₂O (0,1 g/L) and MgCl₂·6H₂O (0,18 g/L).

Le pH du tampon est ajusté à 1, 2, 3, 4 et 5 en utilisant une solution d'HCl (5 M). Cinq mL de l'échantillon sont mélangés avec 5 mL du jus gastrique artificiel pour tous les pH et le mélange réactionnel est incubé dans un bain-marie à une température de 37°C durant 6 h. 1 mL du mélange réactionnel est prélevé après 0, 0,5, 1, 2, 4 et 6 h d'incubation et le contenu en sucres réducteurs et en sucres totaux est déterminé. Le pourcentage d'hydrolyse de l'échantillon est calculé en se basant sur le contenu en sucres réducteurs libérés et le contenu en OT de l'échantillon (équation 6) :

$$\text{Equation (6) : Le \% d'hydrolyse} = \left[\frac{\text{Sucres réducteurs libérés}}{\text{Sucres totaux} - \text{Sucres réducteurs initiaux}} \right] \times 100.$$

Où les sucres réducteurs libérés sont la différence entre les sucres réducteurs finaux et les sucres réducteurs initiaux.

1.2.5.1.2 Fermentation des extraits polysaccharidiques par des souches probiotiques

➤ Souches utilisées pour l'étude

Les lactobacilles ont été utilisées pour étudier les propriétés prébiotiques potentielles des extraits polysaccharidiques des margines. Ces bactéries sont des microorganismes anaérobies facultatifs, appartenant à des genres qui sont commensaux du tractus intestinal. Le tableau XVIII donne les souches utilisées dans cette étude ainsi que leurs températures de croissance optimales.

Tableau XVIII : Souches de lactobacilles utilisées pour l'étude de l'activité prébiotique.

Nom complet	Nom simplifié	Température optimale
<i>Lb acidophilus</i> DSM 20079	<i>Lb acidophilus</i>	37°C
<i>Lb bulgaricus</i> yalacta	<i>Lb bulgaricus</i>	37°C
<i>Lb gasseri</i> DSM 20243	<i>Lb gasseri</i>	37°C
<i>Lb rhamnosus</i> GG ATCC53103	<i>Lb rhamnosus</i>	37°C
<i>Lb brevis</i> DSM 20054	<i>Lb brevis</i>	30°C
<i>Lb casei</i> DSM 20011	<i>Lb casei</i>	30°C
<i>Lb paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> DSM 20312	<i>Lb paracasei</i>	30°C

Lb : *Lactobacillus*

➤ Conditions de culture des souches microbiennes

-Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Man-Rogosa- Sharpe (MRS). Le bouillon MRS est préparé en dissolvant 51 g de poudre de MRS dans 1 L d'eau distillée. Après agitation, 1 mL de Tween 80 est additionné. La gélose MRS est préparée en ajoutant 15 g/L d'agar au bouillon MRS.

Afin d'évaluer la consommation des glucides ou des extraits à tester, des croissances sont réalisées dans des milieux reconstitués où le Glc est remplacé par le glucide à tester (Tableau XIX). Les quantités indiquées dans le tableau XIX correspondent aux quantités à dissoudre dans 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu est ensuite ajusté à pH 6,3 avec une solution de NaOH 3 M et les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 15 min.

-Conservation

Les souches de lactobacilles sont conservées à -20°C en mélangeant 800 µL d'une culture en phase exponentielle de croissance avec 300 µL de glycérol stérile (50% v/v) dans un microtube. Sur des périodes courtes (inférieures à 2 semaines) les souches sont conservées sur milieu MRS gélosé 4°C.

-Mise en culture

Après décongélation, le contenu des microtubes est dilué dans 10 mL de bouillon MRS en tube puis incubé pendant 30 h à la température optimale de culture.

Tableau XIX : Composition du milieu MRS modifié.

MRS modifié	
Constituants	Quantité
Peptone animale	10 g
Extrait de viande	8 g
Yeast nitrogen base	4 g
K ₂ HPO ₄	4 g
CH ₃ COONa, 3H ₂ O	10 g
Citrate de triammonium	4 g
MnSO ₄ , H ₂ O	0,1 g
Tween 80	2 mL

➤ **Culture des souches de lactobacilles**

Les milieux MRS modifiés ou non sontensemencés par une biomasse issue d'une culture de 10 mL en milieu MRS. Pour constituer l'inoculum, les précultures (10 mL) sont centrifugées stérilement à 10000 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris 3 fois dans 15 mL d'eau physiologique (NaCl 9 g/L) stérile pour lavage. Enfin le culot est repris dans 1 mL d'eau physiologique et cette suspension bactérienne est utilisée pour inoculer 21 mL de milieu MRS modifié contenant la substance à tester. La DO initiale prise à 600 nm doit être proche de 0,4. Cette valeur correspondant à une population bactérienne de départ d'environ $2,27 \times 10^8 \pm 3,96 \times 10^7$ UFC/mL. Les fermentations sont réalisées dans des tubes de 23 mL remplis à 21 mL et hermétiquement fermés.

Les cultures sont réalisées en conditions d'aérobiose modérée sans agitation sauf lors des prélèvements. Des contrôles de pureté sont réalisés en début et en fin de culture (coloration de Gram).

Le dénombrement bactérien est réalisé après dilution dans de l'eau physiologique stérile de prélèvements de culture et étalement sur milieu MRS gélosé.

➤ **Evaluation du taux de croissance et du temps de génération**

Le nombre de cellules augmente selon une exponentielle de base 2, que l'on convertit le plus souvent en base népérienne pour en tirer le taux de croissance μ et le temps de génération ou de doublement G.

$$\text{Equation (7) : } \ln N = \ln N_0 + \mu \cdot t$$

Le tracé de $\ln N$ en fonction du temps, d'après l'Equation (7), donne une droite de pente μ .

Avec :

N : nombre de cellules ou biomasse au temps t

N_0 : nombre de cellules ou biomasse à $t = 0$

μ : taux de croissance népérien

Le temps de génération G est calculé selon l'Equation (8) :

$$\text{Equation (8) : } G = \ln 2 / \mu$$

1.2.5.2 Quantification de l'activité antioxydante

1.2.5.2.1 Mesure de l'activité antioxydante par réactivité avec l'anion superoxyde

La mesure de l'activité anti-radicalaire du radical anion superoxyde de fractions polysaccharidiques solubles est réalisée en suivant l'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol. Quelques étapes de la réaction d'autooxydation sont données par la figure 33.

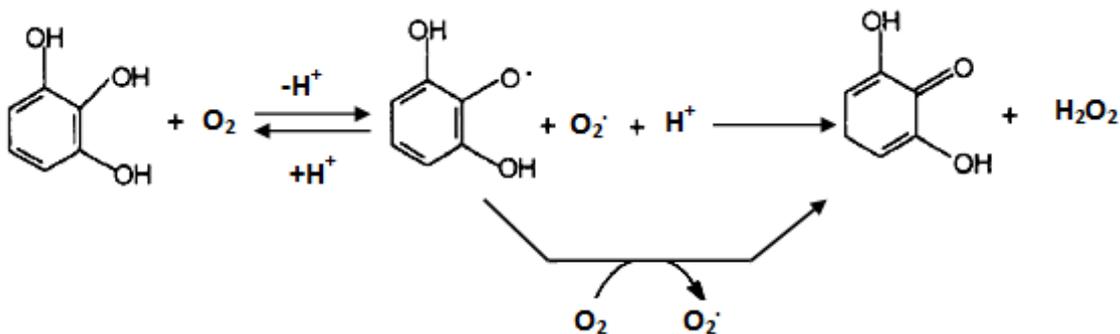


Figure 33 : Quelques étapes de l'auto-oxydation de pyrogallol (KIM *et al.*, 1995).

Mode opératoire

Le protocole est adapté de WANG *et al.* (2007). L'échantillon (FSM, vit C) est préparé à différentes concentrations (de 0 à 0,4 g/L) dans de l'eau distillée. 420 μ L d'échantillon sont mélangés avec 450 μ L de tampon Tris-HCl (pH 8,5; 50 mM). Ce mélange est incubé 20 min à 25°C. 30 μ L d'une solution de pyrogallol (5 mM dans l'eau distillée) sont ensuite ajoutés. Le mélange est alors agité au vortex. Après 5 min d'incubation, 100 μ L de vit C (5% dans l'eau distillée) sont additionnés pour arrêter la réaction. L'absorbance est mesurée à 325 nm.

Le pourcentage de l'activité de piégeage de l'anion superoxyde est calculé selon l'équation (7) suivante :

mélanges sont incubés à température ambiante (25 °C) à l'abri de la lumière. Après 30 min d'incubation, l'absorbance est lue à 517 nm.

Le pourcentage d'activité anti-radical DPPH est calculé selon l'équation (8) :

Equation (10) : Le % d'activité anti-radical DPPH (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$

Avec :

A_0 : Absorbance en absence de l'échantillon

A_1 : Absorbance du mélange en présence de l'échantillon

1.2.5.2.3 Mesure de l'activité antioxydante par réactivité avec le radical hydroxyle

La mesure de l'activité anti-radicalaire est réalisée selon un protocole adapté de LUO et *al.* (2010). Les échantillons (FSM, vit C) sont préparés à différentes concentrations (de 0 à 0,4 g/L) dans l'eau distillée. Deux cent μL de chaque solution sont mélangés avec 200 μL d'une solution de FeSO_4 (5 mM). Après homogénéisation au vortex, 200 μL de H_2O_2 (1%) sont ajoutés puis le mélange est agité au vortex avant d'être incubé à température ambiante pendant 60 min. Un mL d'eau distillée est alors ajouté. Après agitation (vortex), l'absorbance est lue à 510 nm.

Le pourcentage d'activité anti radical hydroxyle est calculé selon l'équation (9) :

Equation (11) : Le % de piégeage du radical hydroxyle = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$

Avec :

A_0 : Absorbance en absence de l'échantillon

A_1 : Absorbance du mélange en présence de l'échantillon

1.2.5.2.4 Pouvoir réducteur

Principe

L'utilisation du ferrocyanure de potassium permet de mesurer la capacité d'un composé antioxydant à donner des électrons. La réduction des ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) est évaluée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance de la solution de couleur bleu-verte résultante à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance indique un pouvoir réducteur plus élevé.

Le détail réactionnel des réactions est donné dans la Figure 35.

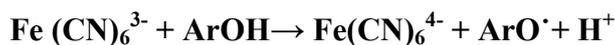


Figure 35 : Réactions mises en jeu dans le test au ferrocyanure de potassium (APAK et *al.*, 2007).

Mode opératoire

La mesure du pouvoir réducteur est réalisée selon le protocole de OYAIZU (1986) adapté par YAN et *al.* (2005). A noter que le dosage diffère sensiblement en fonction des échantillons traités.

L'échantillon (FSM, CPO, AG, AC, AT et vit C) est préparé à plusieurs concentrations (de 0 à 0,4 g/L pour la FSM et de 0 à 80 µg/mL pour les CP) dans de l'eau distillée. 0,1 mL d'échantillon est mélangé avec 250 µL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 250 µL de ferricyanide de potassium (1%, m/v dans l'eau distillée). Ce mélange est incubé dans un bain marie à sec à 50°C pendant 20 min. Le mélange réactionnel est refroidi dans un bain de glace pendant 5 min, puis 250 µL d'acide trichloroacétique (0,61 M) sont ajoutés. Le mélange est agité (vortex pendant 1 min) puis centrifugé à température ambiante pendant 8 min à 1000 g. 250 µL de surnageant sont mélangés avec 250 µL d'eau distillée et 0,050 mL de FeCl₃ (0,1%, m/v) puis agités au vortex. Après 5 min, l'absorbance est lue à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur. La vit C est utilisée comme témoin positif.

1.2.5.2.5 Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène

Principe

Cette méthode consiste à évaluer la capacité d'une substance à piéger le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Mode opératoire

La capacité des différents CP à piéger H₂O₂ est déterminée selon la méthode de RUCH et *al.* (1989). Deux mL de la substance à tester à différentes concentrations (entre 10 et 250 µg/mL) sont ajoutés à 1 mL de la solution de H₂O₂ (43 mM), préparée dans le tampon PBS isotonique (160 mM, pH 7,4). La réaction est incubée à température ambiante pendant 15 min et l'absorbance est mesurée à 230 nm contre le blanc contenant du tampon phosphate sans peroxyde d'hydrogène. Le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les composés testés est calculé selon l'équation (10) :

Equation (12) : Le % de piégeage de H₂O₂ = [(A₀ - A₁) / A₀] × 100

Avec :

A_0 : absorbance du contrôle en absence de l'échantillon.

A_1 : absorbance en présence de l'échantillon.

1.2.5.2.6 Etude de l'activité antioxydante sur modèle cellulaire

1.2.5.2.6.1 Test d'hémolyse

-L'action du peroxyde d'hydrogène sur la fragilité osmotique

La procédure appliquée est la méthode de O'DELL et *al.* (1987) légèrement modifiée. Un volume de 100 μL d'une suspension d'érythrocytes (5%, v/v), est incubé pendant 3 h avec 100 μL de H_2O_2 à différentes concentrations (0 ; 1 ; 5 et 10 mM). Après incubation, 2 mL de PBS isotonique (160 mM, pH 7,4,) avec des concentrations variées en NaCl (0,3% ; 0,4% et 0,9% m/v) sont additionnés à chaque tube échantillons. Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 30 min, puis centrifugés à 3000 g. L'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm. L'hémolyse dans chaque tube est exprimée par rapport à l'hémolyse totale induite par l'eau distillée et calculée selon l'équation (11).

Equation (13) : Le % d'hémolyse = $(A / A_0) \times 100$

Avec:

A_0 : absorbance maximale donnée par les érythrocytes complètement hémolysés dans l'eau distillée.

A : absorbance de l'échantillon incubé en présence de différentes concentrations de H_2O_2 .

-Action hémolytique du peroxyde d'hydrogène

L'action hémolytique du H_2O_2 a été étudiée selon la méthode de TEDESCO et *al.* (2001) avec certaines modifications.

Cent μL d'une suspension d'érythrocytes (5%, v/v) sont incubés avec 100 μL de H_2O_2 à différentes concentrations (entre 0,1 mM et 10 mM). Après agitation douce, les tubes sont incubés dans un bain marie à 37°C pendant 3 heures en étant soumis à une agitation douce toutes les 30 minutes. Après incubation, le contenu de chaque tube est dilué par 8 volumes de PBS isotonique, puis centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes. Les surnageants sont récupérés et la lecture des DO est réalisée à 540 nm.

Le pourcentage d'hémolyse est déterminé selon l'équation (13) donnée précédemment.

-Cinétique de l'hémolyse peroxyque

Le taux d'hémolyse des érythrocytes incubés en présence du système d'oxydation choisi a été déterminé après 30, 60, 90, 120, 150, 180 et 240 min d'incubation.

Le taux d'hémolyse est déterminé comme selon l'équation (13) comme précédemment.

-Inhibition de l'hémolyse

Principe

Cette méthode consiste à évaluer la capacité d'un composé à inhiber l'hémolyse induite par un stress oxydatif sous l'action d'ERO (ou autre radical). L'intensité de l'hémolyse est estimée par la mesure de l'absorbance de l'hémoglobine libérée après hémolyse à 540 nm. Une substance est d'autant plus anti-hémolytique que la DO enregistrée est faible.

Mode opératoire

Le protocole du test de l'activité inhibitrice de l'hémolyse est réalisé selon la méthode décrite par TEDESCO et *al.* (2001) avec certaines modifications. A 100 µL d'une suspension d'érythrocytes (5%, v/v), sont ajoutés 100 µL de différentes concentrations (50 ; 100 et 150 µg/mL) des substances à tester (CPO, AG, AC, AT et vit C) préparées dans le tampon PBS isotonique (160 mM, pH 7,4) et 100 µL de H₂O₂ (5 mM dans du PBS). Avant l'addition du composé à tester, l'activité de la catalase érythrocytaire est inhibée par incubation des globules rouges avec 100 µL d'azide de sodium (1 mM) pendant 10 min à 37°C (SENTURK et *al.*, 2001). Le mélange réactionnel des différents échantillons a été agité doucement, puis incubé dans un bain marie à 37°C pendant 3 h. Une agitation douce est réalisée toutes les 30 min pour l'ensemble des échantillons. Après incubation, le mélange de chaque tube est dilué par 8 volumes de PBS, puis centrifugé à 3000 g pendant 10 min. Les surnageants sont collectés et la lecture des DO est réalisée à 540 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse s'exprime comme suit :

Equation (14) : Le % de l'inhibition de l'hémolyse = $[(A_0 - A)/A_0] \times 100$

Avec :

A₀ : l'absorbance du contrôle en absence de la substance à tester.

A : l'absorbance de l'échantillon en présence de la substance à tester.

1.2.5.2.6.2 Test de la peroxydation lipidique

Principe

Le MDA est un indice de peroxydation lipidique globale. La méthode est basée sur la détection spectrophotométrique du complexe entre le MDA et l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) (Figure 36). Le complexe MDA-TBA présente un maximum d'absorption à 532 nm. Deux molécules de TBA se fixent sur une molécule de MDA, à 100°C en milieu acide pour donner un complexe de couleur rose.

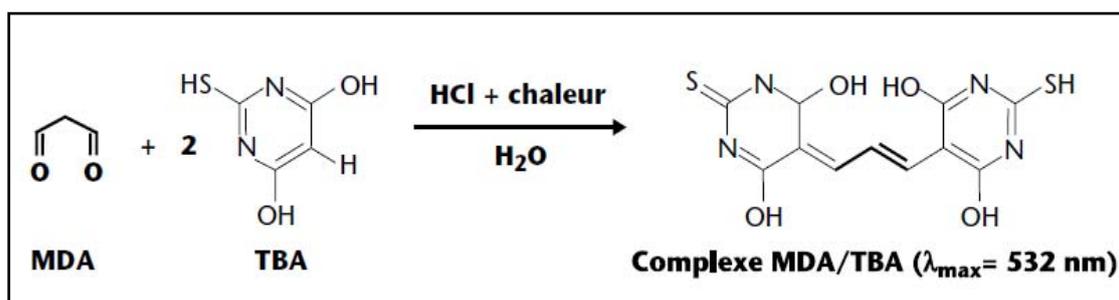


Figure 36 : Réaction de formation du chromophore entre MDA et TBA (LAGUERRE et al., 2007). MDA : malondialdéhyde ; TBA : acide 2-thiobarbiturique

Mode opératoire

-Définition d'un système oxydant H₂O₂/ FeSO₄

Un ml de membranes érythrocytaires (1 mg/ml) est additionné de 300 µL de H₂O₂ à différentes concentrations (entre 0,01 et 900 mM) et de 100 µL de FeSO₄ à une concentration de 1 mM. Après une incubation de 3 h, le dosage du MDA est réalisé. Un ml de chaque échantillon de membranes érythrocytaires soumis au stress oxydatif, est traité par 2 mL d'HCl (1 M) contenant l'acide trichloracétique (0,91 M) et le TBA (0,75%, m/v). Les tubes sont chauffés à 100°C pendant 30 min, refroidis dans un bain de glace puis leur contenu est centrifugé à 3000 g pendant 10 min (BUEGE et AUST, 1978). Les surnageants, contenant les complexes MDA-TBA, sont récupérés et l'absorbance est mesurée à 532 nm. Les concentrations en MDA sont exprimées en µM/mg de protéines membranaires et déterminées en utilisant le coefficient d'extinction de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

-Cinétique de la formation du MDA par le système pro-oxydant choisi

Le système oxydant ayant induit la formation d'une quantité importante de MDA, a été choisi pour tester l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique. La quantité de MDA formé en

fonction du temps a été déterminée après 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 1h30, 2 h, 3 h, 4 h et 5 h d'incubation dans le but de fixer un temps d'incubation idéal.

-Inhibition de la peroxydation lipidique

Les membranes des globules rouges sont soumises à un stress oxydant induit par le système $H_2O_2/FeSO_4$ générateur de radicaux hydroxyles.

Un mL de chaque échantillon de membranes érythrocytaires (1 mg/mL) est soumis au stress oxydatif par addition de 300 μ L de H_2O_2 (900 mM), 100 μ L de $FeSO_4$ (1 mM) et 150 μ L de chaque substance à tester (CPO, AC, AT, AG et vit C) à différentes concentrations (entre 20 et 250 μ g/mL). Après 3 h, un mL de mélange réactionnel est traité par 2 mL d'HCl (1 M) contenant de l'acide trichloracétique (0,91 M) et du TBA (0,75%, m/v). Les mélanges réactionnels sont chauffés à 100°C pendant 30 min, refroidis dans un bain de glace puis leur contenu est centrifugé à 3000 g pendant 10 min (BUEGE et AUST, 1978). Les surnageants, contenant les complexes MDA-TBA, sont récupérés et l'absorbance est mesurée à 532 nm. Les concentrations en MDA sont exprimées en μ M/mg de protéines membranaires et déterminées en utilisant le coefficient d'extinction de $1,56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$.

Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique s'exprime par l'Equation 15:

Equation (15) : Le % de l'inhibition de la peroxydation lipidique = $[(A_0 - A)/A_0] \times 100$

Avec :

A_0 : absorbance du contrôle en absence de la substance à tester.

A: absorbance de l'échantillon en présence de la substance à tester.

1.2.5.2.6.3 Evaluation du stress oxydatif des protéines de la membrane érythrocytaire par SDS-PAGE

Principe

L'électrophorèse est une technique qui permet la séparation de molécules chargées, sous l'effet d'un champ électrique sur la base de leur charge globale et leur MM. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est considérée comme l'une des méthodes de séparation les plus fines pour les protéines. Le gel de polyacrylamide est le produit de polymérisation de monomères d'acrylamide et d'un agent de réticulation le N, N' méthylène-bis-acrylamide. La polymérisation est initiée par la formation de radicaux libres en présence de catalyseurs. Des catalyseurs capables d'initier la formation de radicaux libres (initiateurs) et de stimuler la réaction de propagation des radicaux libres (accélérateurs) sont utilisés. Généralement, le persulfate d'ammonium est utilisé comme initiateur alors que le N, N, N',

N'-tétraméthyl-éthylène diamine (TEMED) est utilisé comme accélérateur (Figure 37). L'électrophorèse de type SDS-PAGE se distingue de l'électrophorèse de type PAGE par utilisation de conditions dénaturantes. Le SDS ou Sodium Dodecyl Sulfate est un détergent anionique qui déroule les protéines en chaînes polypeptidiques et les charge négativement de façon proportionnelle à leur taille. Son action dénaturante est combinée à celle d'un réducteur de ponts disulfures, le β mércaptoéthanol qui sépare les sous-unités des protéines oligo- et polymériques.

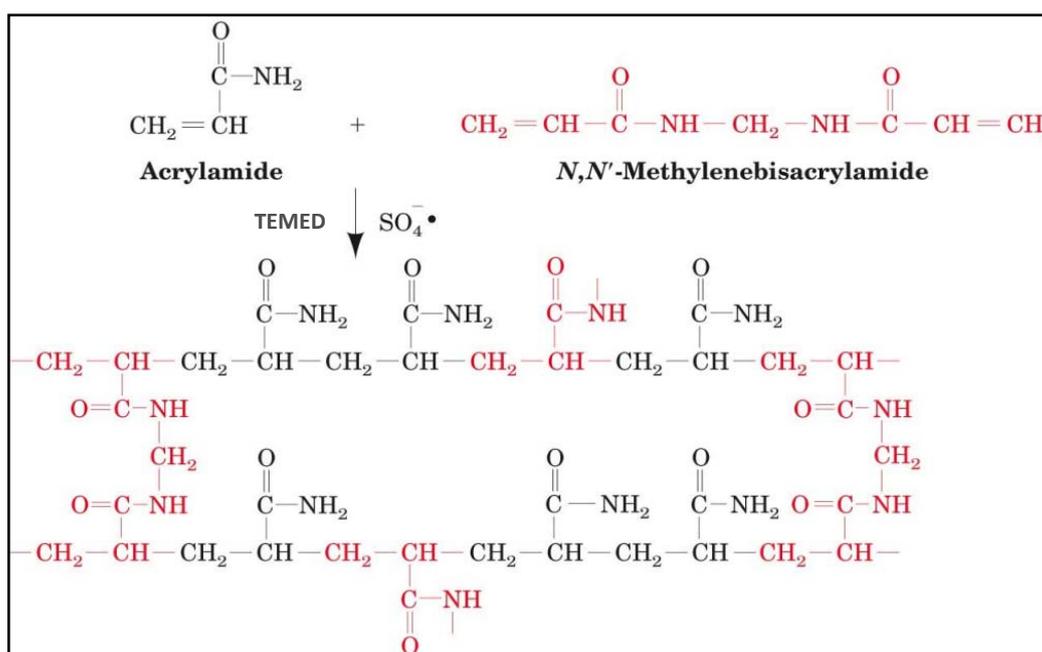


Figure 37 : Mécanisme de polymérisation entre l'acrylamide et le bisacrylamide.

Mode opératoire

L'électrophorèse, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), est réalisée selon un protocole adapté de LAEMMLI et FAVRE (1973). Le gel d'électrophorèse utilisé est constitué d'un gel de concentration de 4,8 % et d'un gel de séparation de 12 % en acrylamide/bisacrylamide. Les séparations électrophorétiques ont été réalisées sur des mini-cuves HOEFFER SE 280. Le gel est coulé entre une plaque de verre et une plaque d'alumine.

➤ Solutions utilisées

- Une solution notée solution A est préparée en mettant en solution de l'acrylamide (36%, m/v) et du bisacrylamide (1%, m/v).

- Le tampon de gel de séparation (solution S) correspond à une solution de Tris (18,15%, m/v) dont le pH est ajusté à 8,8 avec une solution d'HCl (4 M).
- Le tampon du gel de concentration (solution C) correspond à une solution de Tris (6%, m/v) dont le pH est ajusté à 6,8 avec une solution d'HCl (4 M).
- Le tampon d'électrode est constitué de Tris (0,6%, m/v), glycine (2,88%, m/v) et de SDS (0,1%, m/v). Son pH est ajusté à 6,8 avec une solution d'HCl (4 M).

➤ **Préparation de l'échantillon**

L'échantillon est préparé à une concentration de 3,5 mg/mL dans un tampon d'échantillon contenant 500 µL de solution (C), 250 µL d'eau distillée, 250 µL de SDS (10%, m/v) et 50 µL de 2-mercaptoéthanol. Ce mélange est chauffé à 100°C pendant 4 à 5 min puis refroidi dans un bain d'eau froide. 200 µL d'une solution de glycérol 50% (v/v) et une pointe de spatule de bleu de bromophénol sont ensuite ajoutés à l'échantillon préparé. Le bleu de bromophénol est additionné au tampon d'échantillon et utilisé comme traceur de migration. Il permet de suivre l'avancement de la migration électrophorétique.

➤ **Préparation des gels**

- Le gel de séparation (T = 12 % et C = 2,7 %) est préparé comme suit :
2,70 mL de la solution (A) sont mélangés avec 2,51 mL de la solution (S) et à 2,73 mL d'eau distillée. Après dégazage de ce mélange pendant 2 min, 100 µL de la solution de SDS (10%, m/v), 13 µL de TEMED et 75 µL de persulfate d'ammonium (10%, m/v) y sont additionnés.

- Le gel de concentration (T= 4,8 % et C = 2,7 %) est préparé comme suit :
650 µL de la solution (A) sont mélangés avec 1,25 mL de la solution (C) et 2,9 mL d'eau distillée. Après dégazage, 50 µL de la solution de SDS (10%, m/v), 30 µL du TEMED et 100 µL du persulfate d'ammonium (10%, m/v) sont additionnés au mélange.

Le gel de concentration est coulé immédiatement après sa préparation sur le gel de séparation polymérisé et le peigne est placé pour la formation des puits. Après solidification, le peigne est enlevé et 15 à 20 µL de chaque échantillon sont déposés dans le fond de chaque puit de 40 µL de volume total.

Après migration (250 V) pendant une durée moyenne allant de 60 à 120 min, le gel est démoulé et il est placé dans une solution de fixation formée d'acide trichloroacétique (12%, m/v) pendant 45 min. Le gel est ensuite transféré dans une solution de coloration préparée par dissolution de Bleu de Coomassie (0,25%, m/v) et d'acide trichloroacétique (2%, m/v) dans un mélange de solvants formé de méthanol et d'eau (1:1, v/v). Après coloration du gel

pendant 1 h, une décoloration du gel est réalisée dans une solution de décoloration formée du mélange acide acétique : eau : méthanol (0,25 : 2,08 : 1).

Des protéines de référence de MM connues sont déposées dans un des puits. Le kit de protéines standards, préparé au laboratoire LABAB, comprend : la BSA (66000 Da), l'ovalbumine (45000 Da), la β -lactoglobuline (18000 Da) et l' α -lactalbumine (14000 Da). Une courbe $\text{Log MM} = f(\text{distance parcourue})$ est utilisée pour la détermination des MM des entités protéiques.

➤ **Effet des substances antioxydantes sur les dommages oxydatifs des protéines**

- L'oxydation des protéines membranaires

Principe

Un système d'oxydation efficace, visualisable sur le gel électrophorétique, des protéines membranaires érythrocytaires a été recherché. Un système utilisant le couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$ a été étudié. Les échantillons soumis aux conditions de stress oxydatif sont par la suite séparés par SDS-PAGE.

- Oxydation par le système $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$

Afin de choisir un système d'oxydation efficace, plusieurs concentrations en H_2O_2 et de FeSO_4 ont été testées. Un volume de 500 μl de membranes érythrocytaires, contenant 3,5 mg/ml de protéines, est mélangé avec 250 μl de FeSO_4 , 250 μl d' H_2O_2 et 250 μl de PBS isotonique. Les échantillons sont incubés pendant 6 h. Les différentes concentrations utilisées pour les deux agents oxydants sont précisées dans le tableau XX.

Tableau XX : Le système d'oxydation $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$ des protéines membranaires érythrocytaires.

Système oxydant	H_2O_2	FeSO_4
1	250 μM	25 μM
2	500 μM	30 μM
3	1 mM	50 μM
4	5 mM	250 μM
5	5 mM	1 mM
6	10 mM	10 mM
7	50 mM	30 mM
8	50 mM	50 mM

-Cinétique de l'oxydation des protéines membranaires

L'effet oxydatif du système oxydant choisi sur les protéines membranaires au cours du temps a été étudié. A 500 µl de protéines (3,5 mg/ml) sont additionnés 250 µl de FeSO₄ et 250 µl H₂O₂. La réaction est arrêtée par addition de 250 µl EDTA (30 mM) après 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 30 min, 1 h, 1 h30, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h et 6 h de la réaction. Une séparation par électrophorèse en SDS-PAGE est réalisée pour l'ensemble des échantillons.

-Etude de l'inhibition de l'oxydation des protéines membranaires érythrocytaires

L'oxydation des protéines membranaires est induite par le système H₂O₂/FeSO₄. Un volume de 500 µL de protéines (3,5 mg/mL) est mélangé avec 250 µL de FeSO₄ (30 mM), 250 µL H₂O₂ (50 mM) et 250 µL de la substance à tester (CPO et vit C) à différentes concentrations (1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 ; 12 ; 14 ; 16 ; 18 et 20 mg/mL). Après une incubation de 3 h, les protéines des différents échantillons sont séparées par SDS-PAGE.

1.2.6 Analyse statistique

Les résultats des dosages ont été exposés sous forme d'histogrammes ou de courbes représentant les moyennes ± l'écart type de deux ou trois mesures. Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) a été utilisée pour analyser des modifications significatives. En outre, un test post hoc (Newman-Keuls) est utilisé et a permis d'analyser des données deux à deux ($p \leq 0,05$) et de déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes dans une analyse de variance. Le test de Student ($p \leq 0,05$) est également appliqué pour la détermination de la différence entre deux séries de mesures. Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le logiciel Stat Box 6 et le logiciel statistica 6.

II Résultats et discussion

2.1 Extraction des polysaccharides et des composés phénoliques

2.1.1 Extraction des polysaccharides des sous-produits oléicoles

2.1.1.1 Composition générale des extraits polysaccharidiques

Les polysaccharides des margines et des grignons d'olive sont extraits à l'éthanol et lavés par différents solvants (chloroforme, acétone, diéther) dans le but d'éliminer les lipides et les composés phénoliques (CP). Le précipité obtenu est nommé résidu insoluble dans les alcools (RIA). Une extraction à l'eau du RIA conduit à l'obtention de deux fractions qualifiées de fraction soluble (FSM) et de fraction insoluble (FIM) dans le cas des margines. Dans le cas des grignons des fractions FSG et FIG sont obtenues correspondant respectivement aux fractions soluble et insoluble. Les résultats de la composition générale des extraits sont présentés dans le tableau XXI.

Le rendement en RIA de margine était de 20,51g/100g de matière sèche (MS). Les fractions FSM et FIM ont été obtenues avec des rendements respectifs de 13,33% et 3,69%. Enfin, les fractions FSG et FIG ont été extraites avec des rendements de 3,5% et de 82,5% respectivement. Dans l'étude menée par GALANAKIS *et al.* (2010a), le rendement de RIA obtenu à partir des margines représente 64,8 g/100 g de MS, tandis que le rendement de FSM est de 64 g/100 g de RIA total ce qui correspond à 41,47% de MS des margines. Il est rapporté que les différences dans les margines utilisées, la composition du fruit (qui dépend du cultivar, des conditions agronomiques et environnementales (latitude, climat)), le stade de maturation des olives et les procédures d'extraction affectent les rendements d'extraction du RIA. VIERHUIS *et al.* (2000) ont rapporté que le rendement du RIA à partir des olives diminue au cours de la maturation de 8,9 à 4,7% du poids frais de la pulpe d'olive dénoyautée. Ainsi, la différence dans le rendement du RIA obtenu dans notre étude et les résultats rapportés par GALANAKIS *et al.* (2010a), pourrait s'expliquer par ces différences de paramètres liés à l'état de l'olive et/ou aux procédés d'extraction utilisés.

L'analyse biochimique de toutes les fractions polysaccharidiques a montré que les sucres (oses neutres (ON) et oses acides (OA)) sont les principaux constituants, même si les protéines et les CP ont été détectés. La FSM apparaît comme l'extrait présentant la teneur la plus élevée en glucides. Le taux de protéines mesuré dans le RIA obtenu à partir des margines de cette étude ($3,20 \pm 0,48\%$) apparaît comme faible comparé à ceux décrits par VIERHUIS *et al.* (2000) et HUISMAN *et al.* (1996) à partir de RIA d'olive et de pulpe d'olive (18 à 24,8% respectivement). Cette différence pourrait trouver son origine dans la dénaturation des protéines au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive en utilisant un procédé à trois

Tableau XXI : Composition biochimique des extraits polysaccharidiques des margines et des grignons d'olive.

Fractions	Rendement ^a	Composition générale ^b						
		<i>ON</i>	<i>OA</i>	<i>Sucres totaux</i>	<i>Sucres réducteurs</i>	<i>Protéines</i>	<i>Azote total</i>	<i>CP</i>
RIA _{margines}	20,51	15,48 ± 1,20	6 ± 0,05	25 ± 7,07	3,78 ± 0,71	3,20 ± 0,48	1,63 ± 0,16	3,23 ± 0,54
FSM	13,33	61,73 ± 5,81	17,87 ± 0,82	60 ± 14,14	5,57 ± 0,17	11,04 ± 0,41	0,37 ± 0,09	2,85 ± 0,78
FIM	3,69	42,23 ± 2,49	5,33 ± 0,20	50,13 ± 13,95	4,09 ± 0,27	0,29 ± 0,41	7,7 ± 0,49	1,90 ± 0,42
FSG	3,5	90 ± 4,33	13,30 ± 0,10	72,67 ± 2,17	3,83 ± 0,09	11,80 ± 0,26	1,27 ± 0,19	nd
FIG	82,5	70,20 ± 6,76	16,85 ± 9,96	54,08 ± 5,27	3,0 ± 0,29	1,20 ± 0,48	0,88 ± 0,09	nd

a : g/100 g de la matière sèche des margines ou des grignons

b: g/100 g de chaque fraction

RIA : résidu insoluble dans les alcools ; FSM : fraction soluble extraite des margines ; FIM : fraction insoluble extraite des margines ; FSG : fraction soluble extraite des grignons ; FIG : fraction insoluble extraite des grignons ; ON : oses neutres ; OA : oses acides ; CP : composés phénoliques ; nd : non déterminé.

phases mais également être due aux différences entre les variétés d'olives utilisées (TANILGANA *et al.*, 2007). Les contenus en CP du RIA, de la FSM et de la FIM (entre 1,9 et 3,2% (m/m)) sont semblables à ceux obtenus par GALANAKIS *et al.* (2010a). C'est leur solubilité dans l'eau qui conduit à leur co-extraction avec les polysaccharides. CARDOSO *et al.* (2003a) ont également détecté des protéines (4,3%) et des CP (5,2%) dans l'extrait pectique obtenu à partir du RIA issu des grignons d'olive. Certains auteurs recommandent une étape de déprotéinisation au cours de l'extraction des polysaccharides (FENG *et al.*, 2010 ; HUANG *et al.*, 2011). Cependant, ce prétraitement peut conduire à la perte de plus de 60% de la teneur des extraits en polysaccharides (CHANG *et al.*, 2011). Par ailleurs, GALANAKIS *et al.* (2010a, 2010b) ont rapporté que le RIA des margines contient des quantités élevées de composés inorganiques (de 32,7 à 38,5 g/100 g de MS) majoritairement représentés par du potassium et d'autres composés tels que la lignine Klason et les lipides. La FSM a également été signalée par les mêmes auteurs comme riche en composés inorganiques soit 39,7-46,2 g/100 g (potassium, sodium, calcium) alors que la FIM contient une quantité importante de lignine Klason (55,2 à 84 g/100 g) (GALANAKIS *et al.* (2010a, 2010b).

Les FSG et FIG présentent également des taux de sucres totaux importants et des protéines en quantité significative, notamment dans la fraction soluble.

2.1.1.2 Composition en monosaccharides des extraits riches en polysaccharides

Deux types de traitement acides ont été appliqués pour l'hydrolyse des extraits polysaccharidiques avant analyse par chromatographie haute performance échangeuse d'anions (HPAEC). Les résultats de la composition en oses montrent que l'acide sulfurique est le traitement d'hydrolyse le plus efficace par rapport à l'acide trifluoroacétique (TFA) (certains oses sont absents ou détectés à des taux plus faibles à l'exemple du xylose (Xyl) dans la fraction FSM). Ainsi, c'est l'hydrolyse à l' H_2SO_4 qui a été appliquée pour toutes les analyses de monosaccharides par HPAEC.

D'après le tableau XXII, tous les échantillons montrent une composition hétérogène en monosaccharides. Le glucose (Glc) est le monosaccharide majeur. D'autres ON et OA ont été identifiés, à savoir le rhamnose (Rha), le galactose (Gal), l'arabinose (Ara), le mannose (Man), le Xyl et l'acide galacturonique (AGal). L'acide glucuronique (AGlc) et le fucose (Fuc) apparaissent comme des monosaccharides mineurs. La figure 38 donne le chromatogramme obtenu pour la fraction FSM.

Excepté l'AGlc et le Fuc, la majorité des monosaccharides identifiés dans les margines ont été également mis en évidence par d'autres études (VIERHUIS *et al.*, 2003 ;

Tableau XXII : Composition en monosaccharides (% molaire) des extraits polysaccharidiques des margines et des grignons après analyse par HPAEC.

	RIA_{margines}	FSM	FIM	FSG	FIG
H₂SO₄					
<i>Fuc</i>	0,46 ± 0,09	0,59 ± 0,06	0,37 ± 0,06	5,72 ± 0,12	0,23 ± 0,05
<i>Rha</i>	14,29 ± 0,63	13,86 ± 0,54	16,42 ± 0,46	10,57 ± 0,48	3,63 ± 0,09
<i>Ara</i>	14,08 ± 0,53	10,74 ± 0,28	17,59 ± 0,01	3,47 ± 0,34	5,45 ± 0,43
<i>Gal</i>	12,59 ± 0,18	13,19 ± 0,45	5,87 ± 0,28	14,16 ± 0,94	2,65 ± 0,07
<i>Glc</i>	42,17 ± 0,65	45,28 ± 0,13	47,75 ± 0,51	40,57 ± 1,75	20,03 ± 0,73
<i>Man</i>	5,52 ± 0,29	5,43 ± 0,43	4,44 ± 0,36	21,90 ± 0,65	-
<i>Xyl</i>	4,98 ± 0,38	4,89 ± 0,43	5,37 ± 0,69	-	66,34 ± 3,05
<i>AGal</i>	4,91 ± 0,25	4,98 ± 0,60	1,43 ± 0,19	1,25 ± 0,08	1,49 ± 0,08
<i>AGlc</i>	0,99 ± 0,14	1,05 ± 0,22	0,77 ± 0,05	2,36 ± 0,10	0,19 ± 0,02
TFA					
<i>Fuc</i>	2,29 ± 0,19	1,26 ± 0,20	0,27 ± 0,03	7,00 ± 0,78	1,01 ± 0,05
<i>Rha</i>	12,88 ± 0,65	12,11 ± 0,78	14,76 ± 1,05	9,24 ± 1,03	4,60 ± 0,84
<i>Ara</i>	9,70 ± 0,74	6,86 ± 0,50	14,32 ± 0,56	3,12 ± 0,07	4,30 ± 0,75
<i>Gal</i>	10,28 ± 1,02	9,90 ± 0,42	5,60 ± 0,35	13,54 ± 0,16	2,90 ± 0,46
<i>Glc</i>	53,76 ± 2,15	56,06 ± 2,45	54,57 ± 3,15	45,29 ± 1,08	26,20 ± 0,74
<i>Man</i>	6,19 ± 0,30	7,56 ± 0,64	5,03 ± 0,47	18,94 ± 0,17	-
<i>Xyl</i>	2,21 ± 0,12	-	2,61 ± 0,12	-	60,42 ± 2,30
<i>AGal</i>	1,89 ± 0,22	5,51 ± 0,61	0,80 ± 0,03	1,01 ± 0,05	0,01 ± 0,002
<i>AGlc</i>	0,79 ± 0,08	0,75 ± 0,04	2,04 ± 0,35	1,86 ± 0,04	0,57 ± 0,01

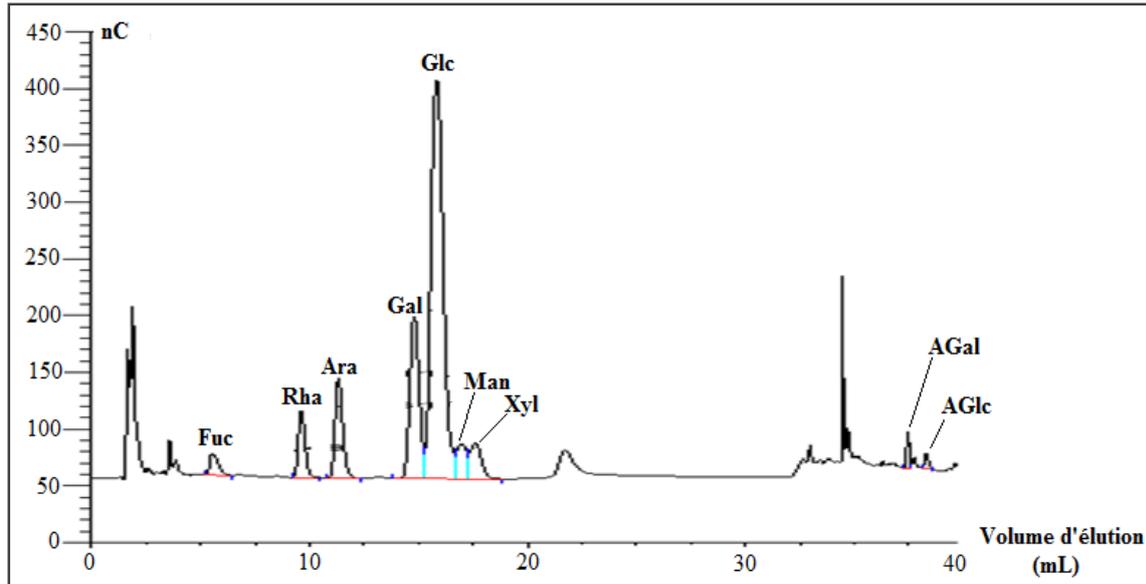


Figure 38 : Chromatogramme de la fraction FSM hydrolysée à L'H₂SO₄ et analysée par HPAEC.

GALANAKIS et *al.*, 2010a). Cependant, ces auteurs ont constaté que le RIA des margines était principalement composé d'AGal, d'Ara, de Glc ou de Gal. La prédominance du Glc dans les RIA et les autres extraits obtenus dans cette étude pourrait s'expliquer par la présence de glucanes et/ou de xyloglucanes, analogues à ceux détectés dans d'autres travaux sur la pulpe d'olive (VIERHUIS et *al.*, 2000 ; 2001) et les grignons d'olive (CARDOSO et *al.*, 2003a) ; et/ou par la procédure d'extraction, la spécificité de cultivar, la saison de la récolte et le stade de maturation de l'olive utilisée comme matière première (HUISMAN et *al.*, 1996; VIERHUIS et *al.*, 2000; CARDOSO et *al.*, 2010). A titre d'exemple, l'impact du stade de maturation des olives sur la composition en monosaccharides des polysaccharides de leur paroi cellulaire a été bien documenté. Durant la maturation le contenu en Ara et en Xyl diminue alors que le contenu en Glc augmente en raison de l'accumulation de cellulose (HUISMAN et *al.*, 1996; VIERHUIS et *al.*, 2000). Cependant, ce résultat n'a pas été observé dans tous les cas. En effet, CARDOSO et *al.* (2010) ont signalé que les olives noires de la variété *Taggiasca* étaient riches en sucres pectiques (AGal et Ara), et pauvre en Glc et en Xyl tandis que la variété *Conservolea* avait une teneur plus élevée en Glc et en Xyl.

Les résultats concernant la composition des fractions FSM et FIM ne sont pas en concordance avec les résultats de GALANAKIS et *al.* (2010a) qui ont constaté que la fraction soluble n'est composée que d'AGal et d'Ara. Cette différence dans la composition en monosaccharides des FSM et FIM pourrait être liée, en plus des facteurs précédemment cités, à la différence de la température d'extraction utilisée (50°C au lieu de 10°C). Cette

composition monosaccharidique du RIA des margines, des FSM et FIM pourrait suggérer la présence de cellodextrines partiellement solubles, de pectines et d' hémicelluloses.

Le contenu élevé en Glc des fractions FSG et FIG obtenues à partir du RIA des grignons s'explique par la présence de cellulose et d'hémicellulose dans ces extraits comme il a été conclu par CARDOSO et *al.* (2003a). Cependant le Xyl, un ose détecté en plus grande quantité par d'autres travaux, n'est que peu quantifié dans notre étude. Ce résultat peut s'expliquer par des traitements de délignification ou d'explosion de vapeur (steam explosion) qui permettent la libération de quantités importantes de monosaccharides à partir de ce type de substrat (COIMBRA et *al.*, 1995 ; FERNANDEZ-BOLANOS et *al.*, 1998 ; 2002).

2.1.2 Extraction des composés phénoliques

La concentration des CP extraits de la pulpe d'olive (CPO) est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu à partir d'une courbe étalon utilisant l'acide gallique (AG) comme standard. Cependant, même si cette méthode est spécifique, certains composés tels que la vitamine C (vit C), les caroténoïdes, les sucres réducteurs et les acides aminés aromatiques, peuvent en réduisant le complexe phosphotungstique-phosmolybdénique interférer et conduire à une surestimation de la teneur en CP (OBIED et *al.*, 2005).

La concentration en CPO totaux a été quantifiée dans l'échantillon de pulpe d'olive à $1633 \pm 0,16$ mg équivalent d'AG/100 g de pulpe. Cette quantité de CPO totaux se situe dans la même gamme de celles obtenues par HAJIMAHMOODI et *al.* (2008) avec les cultivars *Conservalina* (888 mg/100 g) et *Mishen* (2997 mg/100 g). Il est à noter que le contenu en CPO totaux varie en fonction des conditions d'extraction, des paramètres agronomiques (cultivar, climat, techniques agronomiques, etc.) et le stade de maturation du fruit (VINHA et *al.*, 2005 ; GOMEZ-RICO et *al.*, 2008).

2.2 Etude de la fraction soluble extraite des margines (FSM)

L'objectif principal de ce travail était de valoriser les sous-produits oléicoles et notamment les margines. Dans ce contexte, notre intérêt s'est porté sur la FSM issue du RIA des margines, cette fraction étant hydrosoluble et décrite comme contenant des composés pectiques porteurs d'activités biologiques potentielles.

2.2.1 Confirmation de la composition monosaccharidique de la FSM

La composition en monosaccharides de la FSM des margines a été déterminée par la méthode de l'étalon interne en HPAEC après hydrolyse acide. Elle est constituée de 9 monosaccharides (Glc, Gal, Ara, Rha, Xyl, Man, AGal, AGlc et Fuc). Cette composition en

monosaccharides de la FSM sera validée et confirmée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

La présence importante de glucose observée sur le chromatogramme n'a pas pu être corrélée avec la présence de composés amylics dans la FSM puisqu'un traitement à l'aide d'amylase n'a pas permis de modifier ce résultat.

2.2.2 Analyse de la FSM par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse CPG-SM permet d'identifier les monosaccharides constitutifs d'un échantillon ainsi que leurs proportions en fonction de leur coefficient de réponse. L'objectif était de confirmer la composition en monosaccharides de la FSM et d'obtenir plus d'informations sur la nature des oses constitutifs (type de cycles) et le type de liaisons osidiques liant les unités constitutives. La fraction FSM a été étudiée en analysant les dérivés glycosides-O-triméthylsilylés et les acétates d'alditols, deux méthodes complémentaires.

En solution, les sucres existent en équilibre dynamique entre les formes cycliques et ouverte (phénomène de mutarotation). Cette dernière forme existe à l'état de trace et est généralement négligée du fait de sa faible intensité relative (PAEZ et *al.*, 1987). Lors de la cyclisation, deux anomères α et β se forment pour les formes pyranose et furanose. Lors de la dérivation par triméthylsilylation, deux à quatre isomères peuvent être observés pour chaque monosaccharide du fait de l'équilibre mutarotationnel. A titre d'exemple la triméthylsilylation directe (sans hydrolyse acide) de l' α -D-glucopyranose donnera un pic principal correspondant à la forme α -D et un pic secondaire moins intense correspondant à la forme β -D.

La Figure 39 montre le chromatogramme obtenu après l'hydrolyse, la dérivation par triméthylsilylation et l'analyse CPG-SM de la fraction FSM. Les différents pics obtenus pour chaque monosaccharide correspondent aux formes anomérique α et β des conformations pyranose et furanose.

Les spectres CPG-SM du 1,2,3,4,6-pentakis-O-triméthylsilyl-D-glucopyranose et du 1,2,3,5-tétrakis-O-triméthylsilyl-L-arabinofuranose sont donnés par la figure 40. Lors de l'analyse des glucides par spectrométrie de masse en mode impact électronique, l'ion moléculaire est souvent absent du spectre. Par ailleurs, des ions de masse m/z caractéristiques des glycosides-O-triméthylsilylés sont obtenus à l'issue de la fragmentation. A noter que les voies de fragmentations de ces dérivés sont toujours les mêmes et donnent lieu à des signaux caractéristiques comme les pics 2, 5-8, 10-12. Le détail des voies de fragmentation est donné

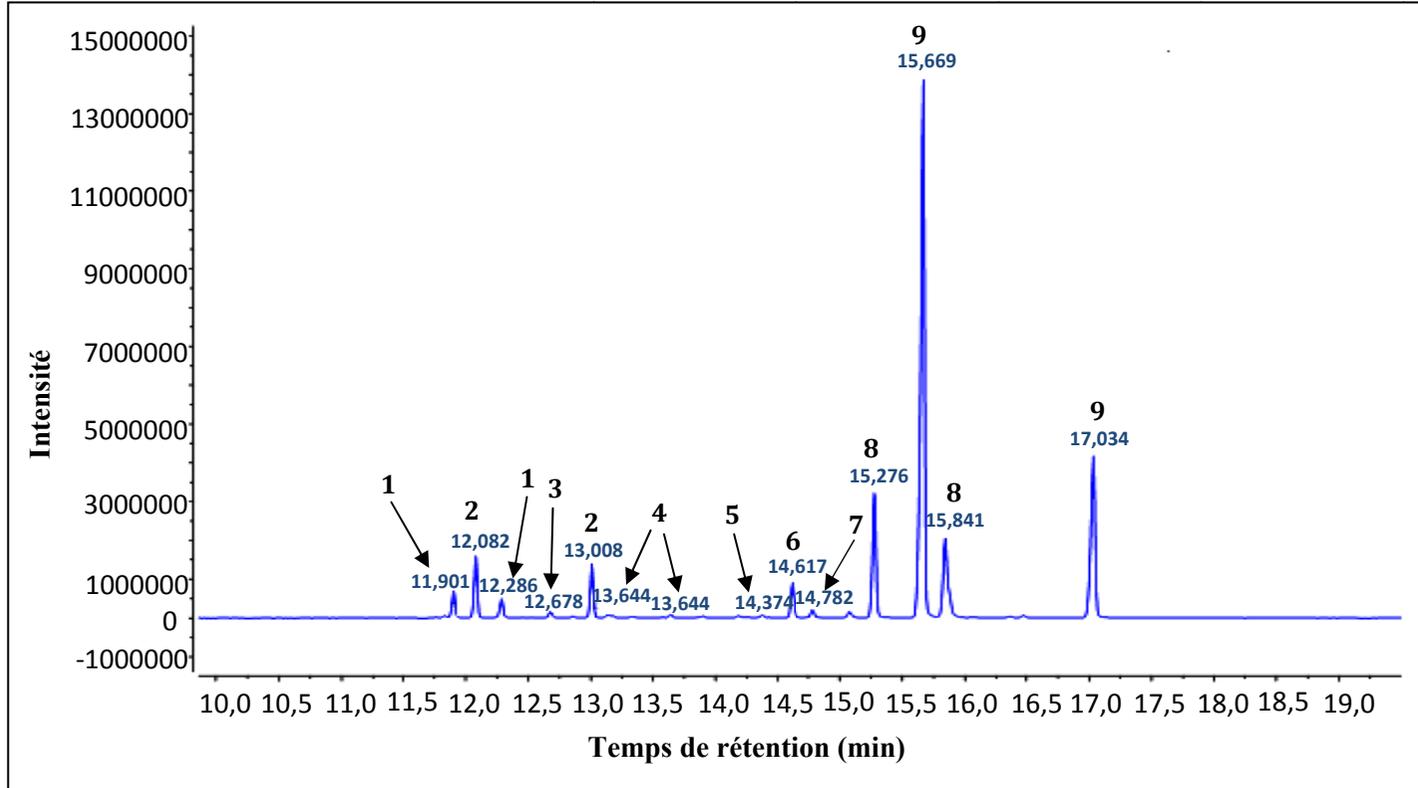


Figure 39 : Profil CPG-SM-EI des trimethylsilyl-O-glycosides issus du FSM. 1 : Ara ; 2 : Rha ; 3 : Fuc ; 4 : Xyl ; 5 : AGlc ; 6 : Man ; 7 : AGal ; 8 : Gal ; 9 : Glc.

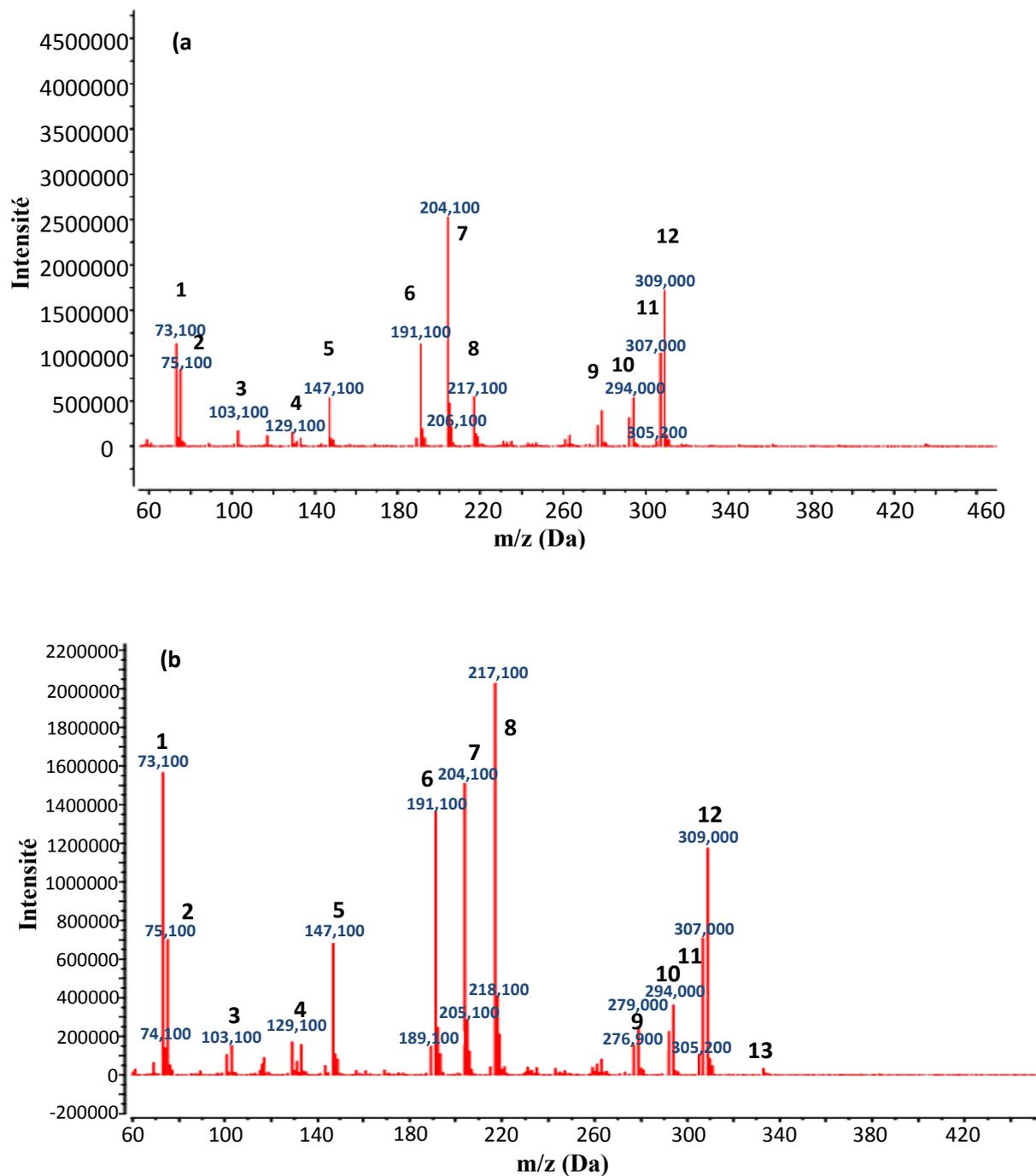


Figure 40 : Spectres de masse (EI) du 1,2,3,4,6-pentakis-O-triméthylsilyl-D-glucopyranose (a) et du 1,2,3,5-tétrakis-O-triméthylsilyl-L-arabinofuranose (b).

par l'annexe 2. L'ion 217 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si-O-CH=CH-CH=O}^+-\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$ est typique des isomères cycliques des aldoses et le rapport d'intensité entre les ions 204 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si-O-CH-CH=O-Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ et 217 permet d'identifier la forme cyclique du glycoside-O-triméthylsilylé analysé. Les furanoses donnent un pic intense à un rapport m/z de 217 mais ont une faible tendance à former un signal pour un rapport m/z de 204 (GARCIA-RASO *et al.*, 1989). En effet, il est couramment admis que cette fragmentation, qui nécessite une circulation d'électrons sur tout le cycle est favorisée par un cycle à six atomes (KENNEDY et ROBERTSON, 1978). Ainsi, les cycles pyranes des oses peuvent être facilement identifiés par leur ratio abondance (204/217) largement supérieur à 1. A l'inverse, un ratio inférieur à 1 ou proche de 1 est caractéristique d'un cycle furanique (HARRIS *et al.*, 1984). C'est l'origine même de la fragmentation par impact électronique de ces cycles qui est à l'origine de la prépondérance d'un ion 204 ou 217 (m/z). Ainsi le Glc à un ratio abondance (204/217) de 4,42 indiquant la forme pyranique du Glc. Alors que l'Ara présente un ratio de 0,70 en faveur d'une forme furanique.

Le chromatogramme obtenu pour la FSM après hydrolyse acide et dérivatisation avec la méthode des acétates d'alditols est donné par la figure 41.

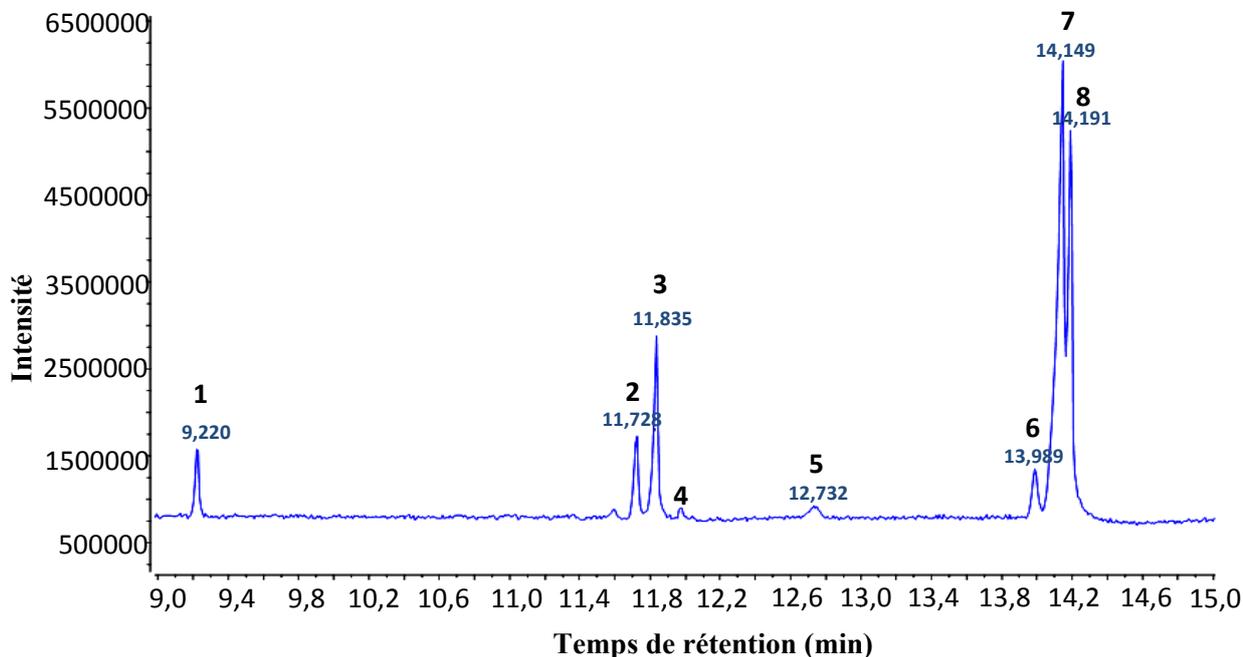


Figure 41: Profil CPG-SM-EI des acétates d'alditols issus de la FSM. 1 : Erythritol tétraacétate; 2 : L-fucitol pentaacétate, 3 : L-rhamnitol pentaacétate; 4 : L-arabitol pentaacétate, 5 : AGal partiellement acétylé; 6 : D-mannitol hexaacétate; 7 : D-glucitol hexaacétate, 8 : D-galactitol hexaacétate.

Avec cette méthode, chaque monosaccharide ne donne qu'un seul pic car la réaction de réduction a éliminé l'anométrie, levant ainsi toute ambiguïté sur l'identification du monosaccharide correspondant. En outre, les acétates d'alditols sont extrêmement stables, contrairement aux dérivés triméthylsilyles très sensibles à l'eau même à l'état de traces. Tous les acétates d'alditols suivent également des voies de fragmentation en impact électronique et donnent comme pics caractéristiques les ions 85,100 ; 103,100 ; 115,100 ; 145,100 ; 187,100 et 217,100.

L'annexe 3 donne les spectres de masse des acétates d'alditols et l'annexe 4 détaille les voies de fragmentation. A noter que les séries (D et L) n'ont pas été déterminées par formation de butyl-glycosides mais sont basées sur des structures analogues déjà observées dans la littérature.

D'après les chromatogrammes de la FSM obtenus par les deux méthodes de dérivatisation, la composition monosaccharidique déterminée par HPAEC a été confirmée (Tableau XXIII).

Tableau XXIII : Composition en monosaccharides de la FSM (% molaire) déterminée par CPG-SM.

Méthode	<i>Fuc</i>	<i>Rha</i>	<i>Ara</i>	<i>Gal</i>	<i>Glc</i>	<i>Man</i>	<i>Xyl</i>	<i>AGal</i>	<i>AGlc</i>
TMS	trace	13,75	8,03	8,15	57,74	4,07	1,10	5,03	2,12
Acétate d'alditols	-	15,56	7,31	7,29	61,59	2,59	0,48	3,35	1,83

Le Glc étant toujours le principal monosaccharide. Les teneurs en oses sont sensiblement plus faibles lorsqu'elles sont détectées par HPAEC par rapport à la CPG-SM. Ce phénomène peut s'expliquer par la conversion de monosaccharides en d'autres produits de dégradation lors du traitement à l'H₂SO₄ ainsi que par la meilleure efficacité du TFA et de l'HCl à libérer les unités monosaccharidiques à partir de la FSM.

La présence en quantité importante de CP n'a pas permis la mise en œuvre d'une procédure de génération des acétates d'alditols partiellement méthylés pour l'étude des liaisons osidiques (notamment lors des étapes de méthylation et d'acétylation).

2.2.3 Analyse de la FSM par chromatographie d'exclusion stérique

2.2.3.1 Chromatographie d'exclusion stérique sur support Superdex 200

La FSM a été fractionnée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) afin d'avoir des informations sur le modèle de distribution des polymères présents (Figure 42).

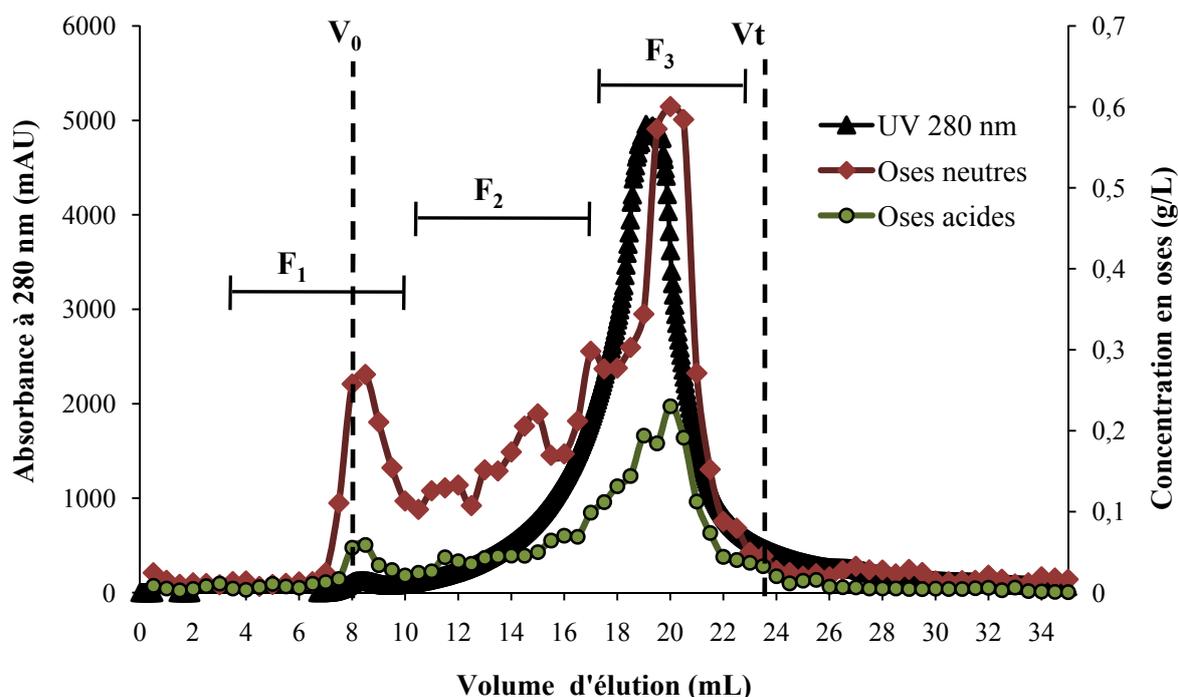


Figure 42 : Chromatogramme de la FSM après élution sur colonne Superdex 200.

L'élution en SEC conduit à la séparation de trois fractions nommées F1, F2 et F3 qui sont hétérogènes dans leur taille moléculaire. La figure 42 donne également les profils correspondant aux contenus en sucres neutres et en sucre acides. L'absorbance à 280 nm des fractions éluées a été suivie également pour avoir des indications relatives à leur contenu en CP et en protéines. La teneur totale en sucres de la F1, F2 et F3 est de $7,20 \pm 0,034$, $12,20 \pm 0,05$ et $28,33 \pm 0,25$ g/100 g de FSM respectivement. A partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec les dextrans, la masse molaire (MM) de la fraction F1, fraction totalement exclue, est estimée à plus de 500 kDa. La seconde fraction F2 a une masse moléculaire allant de 11,48 à 58,88 kDa. La troisième fraction F3, a pu être estimée à environ $4,17 \pm 1$ kDa. Cependant, dans ce cas on ne mesure pas la masse absolue mais une masse relative par rapport à des étalons. La calibration est nécessaire et donne le rapport exact entre la MM et le volume hydrodynamique du polymère utilisé comme étalon. Cependant, le rapport entre le volume hydrodynamique et la masse moléculaire n'est pas le même pour tous les polymères.

Il s'agit d'une mesure approximative qui ne donne pas la masse exacte d'où l'utilisation de la SEC-MALLS.

2.2.3.2 SEC-MALLS

La figure 43 donne le chromatogramme de la FSM analysé par SEC-MALLS.

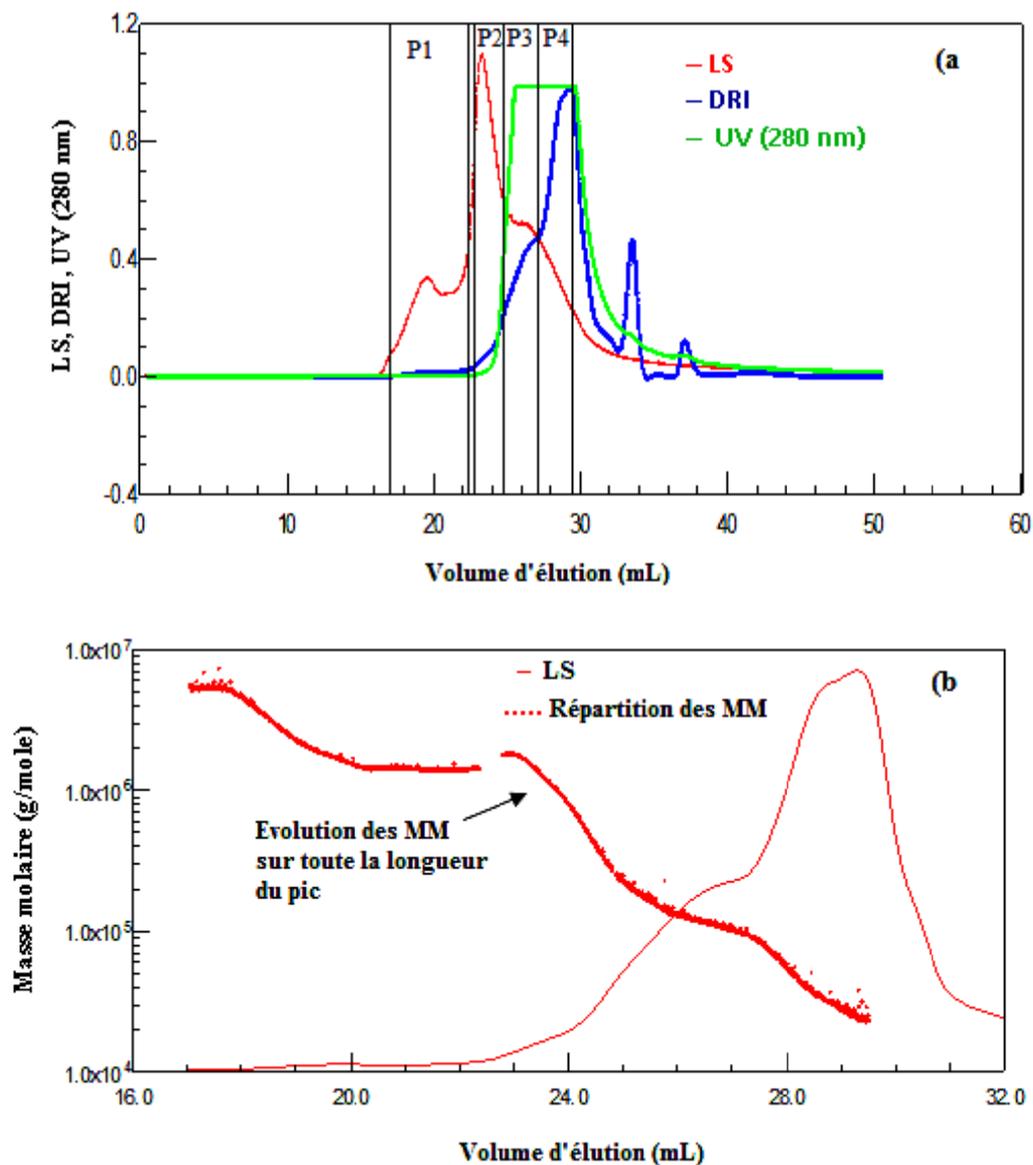


Figure 43 : Chromatogramme de la FSM éluée en SEC MALLS sur colonnes shodex SB-806, 804, 803. (a) Détections réfractométrique (DRI), par diffusion de la lumière (LS) et détection UV à 280 nm et (b) Signal RI et répartition des masses molaires (MM) en fonction du volume d'élution.

Dans la figure 43a, le chromatogramme est découpé en 4 parties avec deux premiers pics (P1 et P2) ne présentant aucune absorbance en UV contrairement aux deux derniers (P3 et P4). Le tableau XXIV donne les MM moyennes en nombre (Mn) et en poids (Mw), ainsi que l'indice de polydispersité (Ip) de chacune des fractions.

Tableau XXIV : Résultats SEC/MALLS du FSM.

Fractions	Mn (g/mole)	Mw (g/mole)	Ip
P1	1,71.10 ⁶	1,98.10 ⁶	1,16 ± 0,10
P2	5,66.10 ⁵	8,05.10 ⁵	1,42 ± 0,17
P3	1,28.10 ⁶	1,36.10 ⁵	1,06 ± 0,10
P4	3,67.10 ⁴	4,39.10 ⁴	1,19 ± 0,11

L'Ip est appelé également indice de moléularité et renseigne sur la largeur de la distribution des MM des différentes macromolécules au sein du polymère. Si Ip = 1, l'échantillon est donc parfaitement isomoléculaire ou monodisperse (même forme et même taille). Dans ce cas l'Ip est supérieur à 1 pour les 4 fractions. La distribution des masses molaires de P3 est très homogène et on pourrait dire que P3 est monodisperse. Les autres fractions sont polydisperses mais leur distribution reste relativement homogène.

2.2.3.3 Purification des fractions F1, F2 et F3 collectées par superdex 200

Les fractions F1, F2 and F3 collectées après SEC sur colonne Superdex 200 ont été traitées par ultrafiltration tangentielle et SEC sur colonne Biogel P2 avec pour objectif l'élimination de composés polluants de faible MM. La fraction F1, de MM la plus élevée a été concentrée et filtrée sur cellule Amicon (3000 Da) pour donner la sous-fraction RF1 (correspondant au retentât) et FF1 (correspondant au filtrat) dont les contenus en monosaccharides ont été analysés après hydrolyse acide. Les fractions F2 et F3 ont été éluées sur Biogel P2 (Figure 44) et collectées en différentes fractions suivant les réponses obtenues (réfractométrie, UV et conductivité). La fraction F2 est collectée en 5 sous-fractions nommées 1F2, 2F2, 3F2, 4F2 et 5F2, alors que le profil d'éluion de la fraction F3 donne trois sous-fractions appelées 1F3, 2F3 et 3F3. La composition monosaccharidique de ces fractions est donnée par le tableau XXV. Les résultats du tableau XXV montrent l'augmentation du degré de pureté des trois fractions F1, F2 et F3, avec une composition monosaccharidique élevée dans les sous-fractions RF1, 1F2 et 1F3.

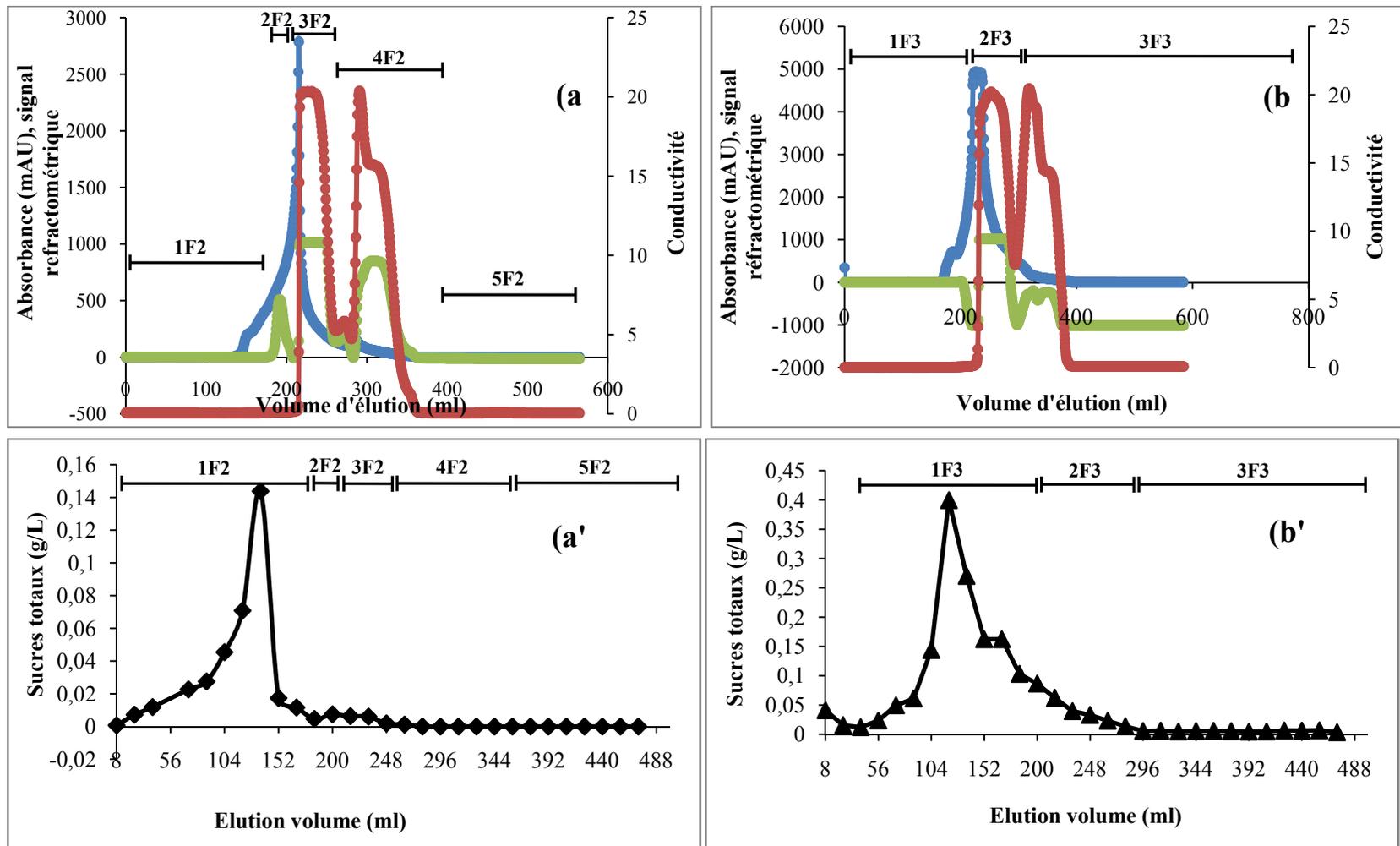


Figure 44 : Chromatogrammes de fractionnement des fractions F2 (a, a') et F3 (b, b') sur Biogel P2. (-●-) : Absorbance à 280 nm ; (-●-) : signal réfractométrique ; (-●-) : conductivité.

Tableau XXV : Caractérisation biochimique et composition en monosaccharides des fractions F1, F2 et F3 et de leurs sous fractions.

Fractions	Sucres totaux	CP totaux ^b	Protéines ^b	Composition en monosaccharides ^b									
				<i>Fuc</i>	<i>Rha</i>	<i>Ara</i>	<i>Gal</i>	<i>Glu</i>	<i>Man</i>	<i>Xyl</i>	<i>AGal</i>	<i>AGlc</i>	
F1	7,20 ± 0,03 ^a	nd	nd										
RF1	14,28 ± 0,38 ^b	2,20 ± 1,13	2,29 ± 1,70	0,02	0,27	0,40	0,86	1,03	0,13	0,09	0,03	0,02	
FF1	1,49 ± 0,08 ^b	1,30 ± 0,28	2,84 ± 0,93	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	
F2	12,20 ± 0,05 ^a	nd	nd										
1F2	2,61 ± 0,11 ^b	1,60 ± 0,57	3,0 ± 0,54	-	0,03	0,03	0,06	0,08	0,03	-	0,01	0,005	
2F2	1,33 ± 0,04 ^b	5,0 ± 1,41	1,09 ± 0,15	-	-	-	-	0,02	-	-	0,01	0,01	
3F2	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	
F3	28,33 ± 0,25 ^a	nd	nd										
1F3	1,36 ± 0,02 ^b	1,90 ± 0,99	1,75 ± 0,62	-	0,04	0,02	0,02	0,17	-	-	0,01	-	
2F3	0,56 ± 0,09 ^b	4,0 ± 1,41	1,53 ± 0,31	-	-	-	-	0,04	-	-	-	0,01	

a : g/100 g de FSM ; b : g/100 g de chaque fraction; nd: non déterminé ; CP : composés phénoliques

A partir de la figure 44, on constate que pour les fractions F2 et F3, seules les sous-fractions 1F2 et 1F3 contiennent des sucres (Figures 44a' et 44b'). Les différents signaux enregistrés dans les figures 44a et 44b sont plus concentrés dans les fractions éliminées (2F2, 3F2, 4F2, 2F3 et 3F3) qui contiennent notamment des taux importants de sels comme indiquées par les réponses conductimétriques et réfractométriques non corrélées à une détection de sucres. Les forts signaux d'absorption en UV à 280 nm s'expliquent par la présence des CP et autres composés absorbant en UV tels que les acides aminés aromatiques.

La fraction F1 apparaît comme la fraction la plus riche en polysaccharides comme montré dans le tableau XXV. La sous-fraction RF1 montre un contenu plus élevé en différents monosaccharides comparativement aux autres sous-fractions. La teneur en sucres totaux des fractions F1, F2 et F3 n'est pas en concordance avec les résultats concernant la composition en monosaccharides des fractions dessalées. Les teneurs les plus élevées en sucres totaux ont été retrouvées dans les fractions F2 et F3 comparativement à la fraction F1. La composition en monosaccharides des différentes fractions (Tableau XXV) indique que c'est la fraction F1 qui contient la plus grande quantité. Or le dosage d'oses totaux (OT) ne confirme pas ce résultat, ce dosage montre que c'est la F3 puis la F2 et enfin F1 qui contient plus d'OT. Ceci pourrait être expliqué par l'interférence des CP dans la quantification des sucres, et le tableau XXV indique bien un taux plus élevé en CP dans les deux fractions F2 et F3.

Par ailleurs, l'essai de dialyse réalisé n'a pas permis d'éliminer les deux fractions F2 et F3 pour ne garder que la fraction F1 la plus riche en sucres et dont le contenu en CP est le plus faible.

2.2.4 Fractionnement de la FSM par chromatographie échangeuse d'anions

Dans le but d'évaluer l'hétérogénéité de la fraction FSM en termes de charges, cette dernière a été fractionnée par chromatographie d'échange d'anions avec les gradients G1 (paliers successifs de NaCl (0 M ; 0,125M ; 0,25 M ; 0,50 M et 1 M) dans le tampon phosphate) et G2 (paliers successifs de NaCl (0 M ; 0,25 M et 1 M) dans le tampon phosphate).

La figure 45 montre le profil d'élution obtenu avec le gradient G1. Le chromatogramme révèle quatre fractions nommées A, B, C et D. Le contenu en monosaccharides de ces fractions a été analysé par HPAEC après hydrolyse à l' H_2SO_4 (Tableau XXVI). Les résultats indiquent une composition monosaccharidique qualitative similaire mais quantitativement différente. Les fractions A, B, C et D montrent un taux de CP d'autant plus important que la force ionique utilisée pour l'élution est élevée. Ce phénomène a

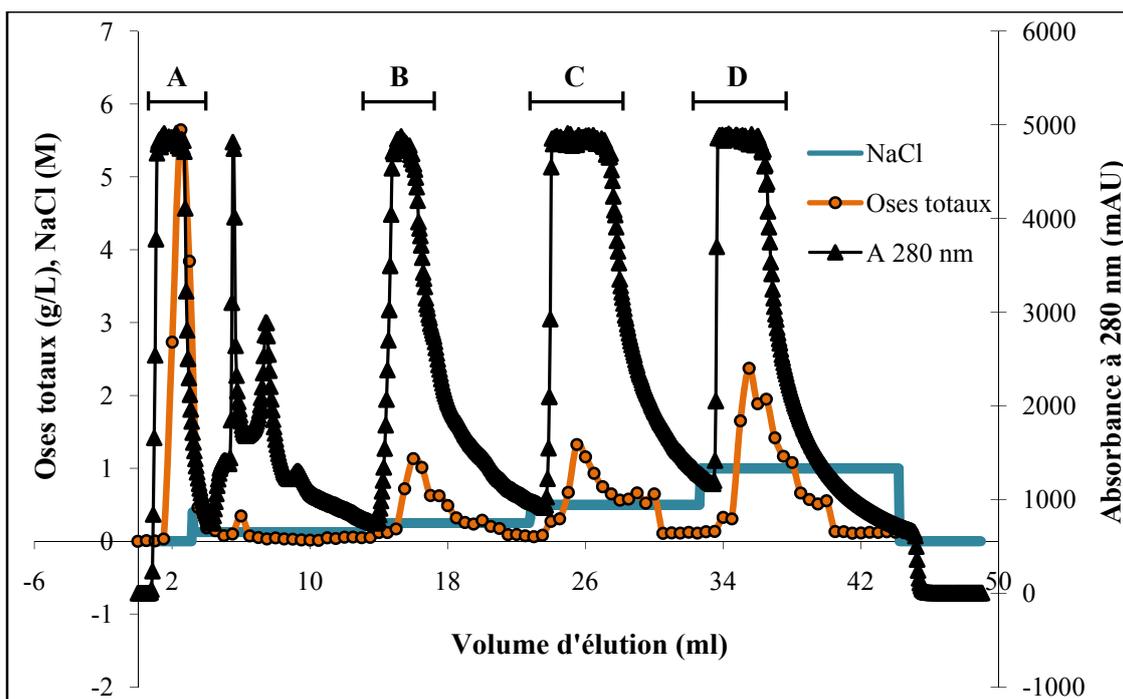


Figure 45 : Profil d'élution de la FSM en chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Resource Q (gradient G1 : paliers successifs de NaCl (0 M ; 0,125M ; 0,25 M ; 0,50 M et 1 M) dans le tampon phosphate).

été attribué à la présence d'acides phénoliques ce qui a été confirmé par la mesure de l' A_{280} . La teneur élevée en ON dans ces fractions suggère la présence d'acides phénoliques glycosylés (DERMECHE *et al.*, 2013). Il est bien établi que les olives constituent une source de CP dont seulement 2% passe dans la phase huileuse lors du processus d'extraction le reste étant extrait dans les margines (environ 53%) et les grignons (environ 45%) (RODIS *et al.*, 2002).

Comme rapporté précédemment dans la partie bibliographique, la présence de polysaccharides liés aux acides hydroxycinnamiques (acides p-coumarique, sinapique et férulique) dans les parois cellulaires de différentes espèces de plantes a déjà été décrite (RALET *et al.*, 1994 ; BUANAFINA, 2009). Les polysaccharides peuvent également être estérifiés par deux unités d'acide férulique comme cela a été révélé pour les arabinanes et les galactanes pectiques réticulés par covalence via des ponts diférulates dans les parois cellulaires de betterave à sucre (RALET *et al.*, 2005). Les CP détectés dans cette étude sont probablement associées à des polymères pectiques. De telles associations ont en effet été précédemment mentionnées dans la littérature (BRAVO *et al.*, 1994).

Tableau XXVI : Rendement, caractérisation biochimique et composition monosaccharidique des fractions purifiées par chromatographie échangeuse d'anions de la FSM.

Fractions	Rendement ^a	Oses totaux ^b	CP ^b	Protéines ^b	Composition en monosaccharides (% molaire)								
					<i>Fuc</i>	<i>Rha</i>	<i>Ara</i>	<i>Gal</i>	<i>Glc</i>	<i>Man</i>	<i>Xyl</i>	<i>AGal</i>	<i>AGlc</i>
A	3,36	53,61 ± 1,50	4,50 ± 1,10	-	1,78	4,88	29,35	17,18	24,04	9,47	5,99	3,97	3,34
B	4,08	22,50 ± 1,49	7,30 ± 1,14	3,38 ± 1,24	1,66	6,75	23,64	16,67	29,11	5,88	5,03	7,98	3,27
C	5,14	62,16 ± 0,35	23,45 ± 0,64	20,69 ± 2,08	1,11	7,27	20,77	15,35	36,57	7,67	4,38	1,43	5,45
D	4,13	74,71 ± 8,88	18,15 ± 0,49	19,38 ± 2,39	1,09	9,73	20,58	8,81	48,17	4,43	5,07	0,77	1,35

^a g/100 g de FSM

^b g/100 g de chaque fraction

Etonnement, les fractions éluées à une force ionique faible (A et B) ont les teneurs en AGal les plus élevées comparativement aux fractions C et D. Ce phénomène s'explique par la méthylation des AGal des polysaccharides pectiques qui ne peut être détectée par HPAEC en raison de l'éluion des échantillons en milieu alcalin qui induit des réactions de saponification des groupes méthylesters des acides uroniques (QUÉMÉNER *et al.*, 2003).

Plusieurs études sur la paroi cellulaire de la pulpe d'olive ont montré la présence de polysaccharides pectiques (HUISMAN *et al.*, 1996 ; COIMBRA, 1998 ; VIERHUIS *et al.*, 2000; CARDOSO *et al.*, 2010). La quantité relativement faible d'AGal détectée dans les fractions A-D peut être associée à la diminution de son contenu tout au long du processus de maturation des olives, tel que rapporté par JIMENEZ *et al.* (2001). En outre, il a été démontré que les teneurs en oses caractéristiques des pectines (AGal, Rha et Ara) augmentent surtout pendant la première étape de maturation des olives tandis que le taux des oses rentrant dans la composition des hémicelluloses (Xyl, Man, Gal, et Glc) s'élèvent vers la fin de la maturation (HUISMAN *et al.*, 1996 ; JIMENEZ *et al.*, 2001). La présence d'un taux élevé en Glc dans les fractions A et B indique probablement une co-extraction de glucanes. La présence de glucanes hydrosolubles a été déjà signalée dans la pulpe d'olive (ARAUJO *et al.*, 1994 ; COIMBRA *et al.*, 1994). En outre, la détection du Xyl et d'AGlc dans ces fractions suggère la présence de xyloglucane, composé hémicellulosique principal des dicotylédones comme l'olive (SELVENDRAN *et O'NEIL*, 1987 ; HAYASHI, 1989).

Des protéines ont également été détectées (A_{280}) dans les quatre fractions avec des taux significatifs pour les fractions C et D. Ce résultat a été confirmé par dosage colorimétrique des fractions collectées (Tableau XXVI et Figure 45). CARDOSO *et al.* (2003a) ont suggéré que les protéines et/ou les CP pourraient être associés aux polymères pectiques des grignons d'olives. Les résultats obtenus ici corroborent cette hypothèse puisque le profil en sucres et l'absorbance à 280 nm se chevauchent lors de l'éluion de la FSM des margines.

Les résultats de la composition monosaccharidique des quatre fractions indiquent que les fractions A et B sont les fractions qui contiennent la plus grande quantité de pectines. Ainsi, on s'intéressera à analyser les rapports entre certains monosaccharides pour avoir plus d'informations sur la structure pectique.

Les données du tableau XXVI montrent que le rapport Rha/AGal des fractions A et B est respectivement de 1,22 et 0,84. Ces résultats peuvent être attribués à une faible proportion de chaînes d'homogalacturonane (HG) dans ces polysaccharides (rapport d'environ 1:1). Selon la classification des pectines par SCHOLS et VORAGEN, (1996), les composés de type

rhamnogalacturonane I (RG I) se distinguent des fragments de type HG par un rapport Rha/AGal, qui varie de 0,05 à 1 (ABOUGHE-ANGONE *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que les fractions A et B contiennent donc des domaines RG-I. La fraction A contiendrait des régions RG avec probablement des zones enrichies en Rha dans la chaîne principale. Dans le même sens, JIMENEZ *et al.* (2001), a indiqué que dans les olives mûres, le rapport de Rha/AGal augmente, ce qui indique un enrichissement en fragments RG, perte d'HG, et libération des chaînes latérales. Ceci est en accord avec l'augmentation relative du taux de Rha et la diminution de l'AGal dans le matériel de la paroi cellulaire pendant la maturation.

D'autre part, le rapport Gal/Ara dans la fraction B (0,70) est légèrement supérieur à celui observé pour la fraction A (0,58). Ce rapport donne une indication sur la forte proportion de chaînes latérales d'arabinanes par rapport à celles des galactanes et suggère que les fractions A et B contiennent un RG-I avec des chaînes latérales beaucoup plus riches en arabinanes qu'en galactanes. La présence de chaînes d'arabinogalactanes pourrait également être envisagée. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par plusieurs auteurs qui ont signalé la présence de chaînes de galactanes et d'arabinanes dans les produits oléicoles et la présence de pectine riche en Ara dans l'olive et dans les grignons d'olives (HUISMAN *et al.*, 1996 ; VIERHUIS *et al.*, 2000; CARDOSO *et al.*, 2002 ; VIERHUIS *et al.*, 2003). En outre, des polysaccharides pectiques riches en Ara ont également été rapportés dans d'autres sources telles que les parois des cellules des grains de l'amande (*Prunus dulcis*) et les racines du *Vernonia kotschyana* (DOURADO *et al.*, 2004 ; NERGARD *et al.*, 2005).

Le fractionnement de chacune des fractions par chromatographie d'exclusion stérique (Figure 46) montre des profils de distribution très semblables. Ce résultat est en faveur de l'appartenance des fractions A, B, C et D à la même famille de polysaccharides dont la différence se situe probablement au niveau de leur degrés de méthylation, d'estérification avec des CP et de leur contenu en protéines.

Un second gradient (G2) a été élaboré à partir des analyses issues de G1 en vue de séparer plus efficacement la fraction polysaccharidique éluée à faible force ionique du reste des composés de la FSM, à savoir les protéines et surtout les CP. Le chromatogramme obtenu est donné par la figure 47. Une fraction neutre est éluée à 0M de NaCl, suivie d'une fraction acide à 0,25 M. La fraction riche en CP qui absorbe fortement en UV est clairement éliminée à forte force ionique.

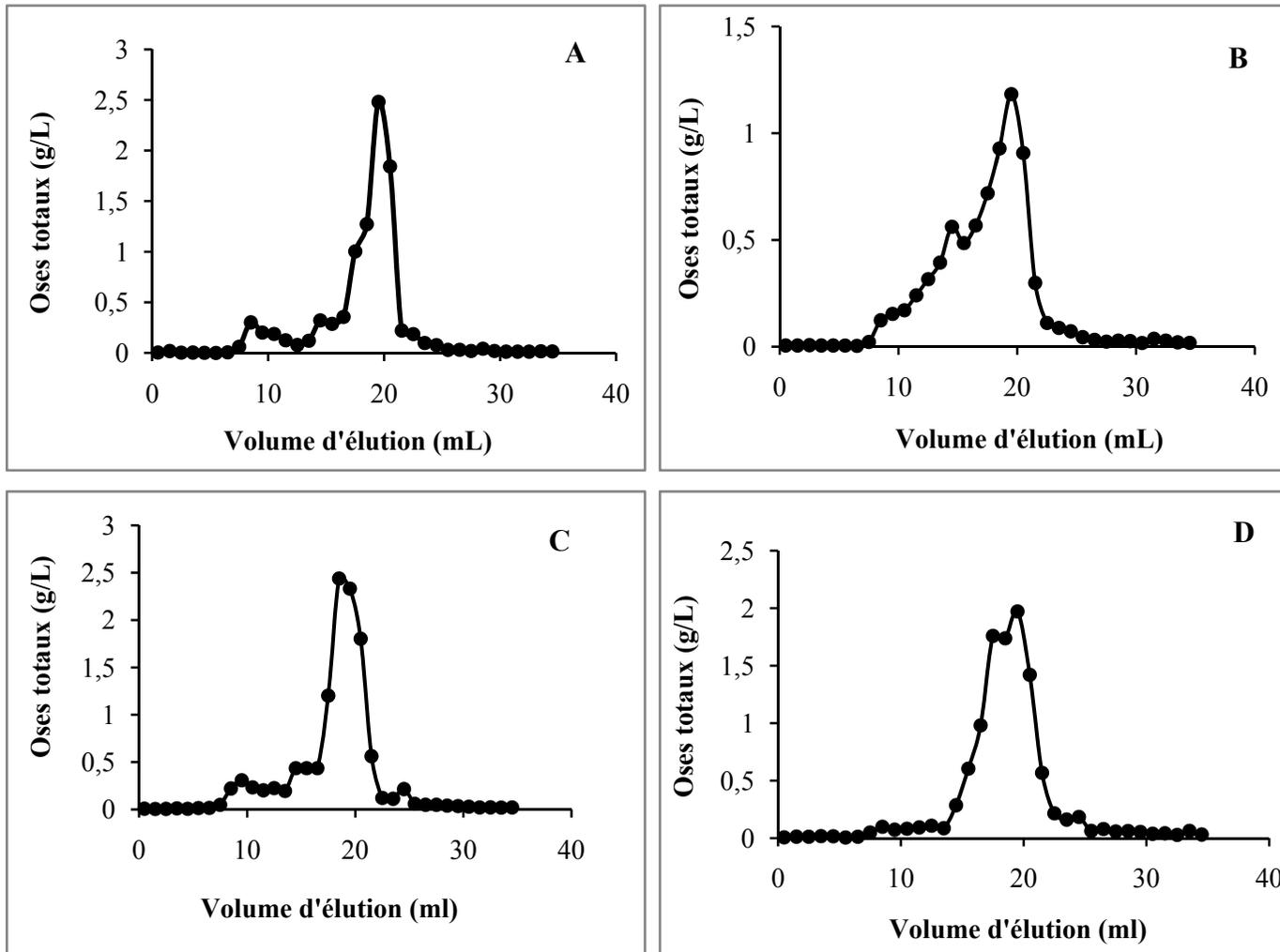


Figure 46 : Chromatographie d'exclusion stérique (colonne Superdex 200) des fractions collectées (A, B, C et D) après chromatographie échangeuse d'anions.

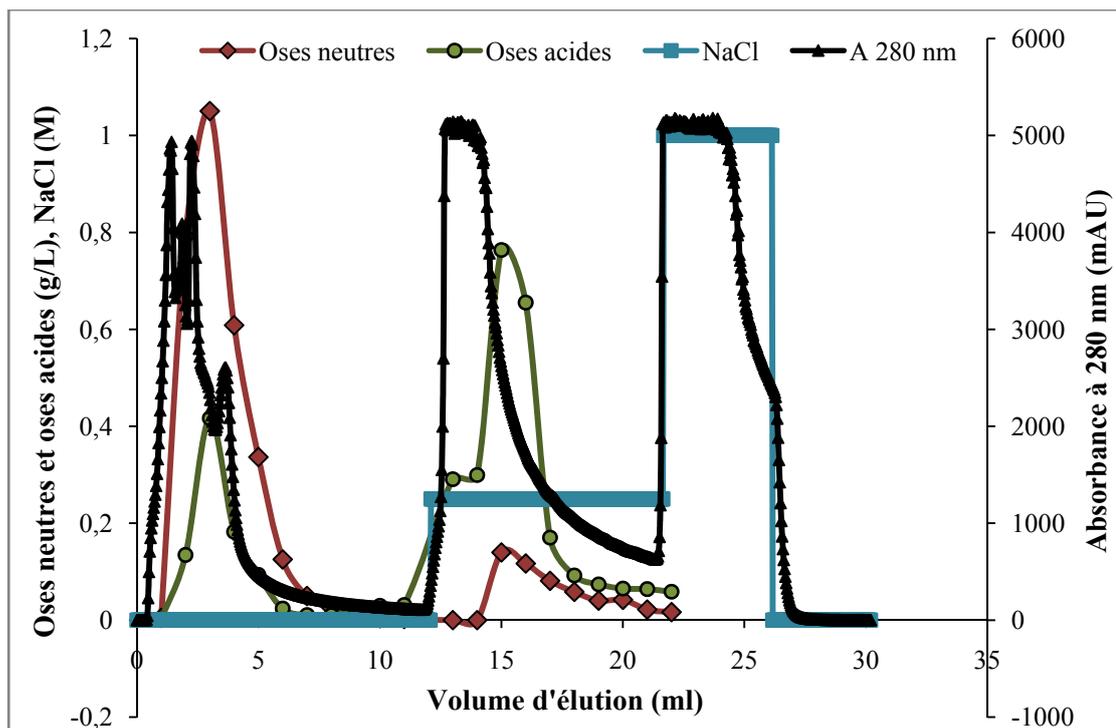


Figure 47 : Elution de la FSM en chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Resource Q (gradient G2 : paliers successifs de NaCl (0 M ; 0,25 M et 1 M) dans le tampon phosphate).

2.2.5 Spectroscopie Infrarouge de la FSM

L'analyse par spectroscopie Infrarouge (FTIR) a été réalisée afin de caractériser les groupes fonctionnels de la FSM (Figure 48). La présence d'une bande large à 3264 cm^{-1} est attribuée aux vibrations d'élongation de liaisons hydroxyles des polysaccharides et pourrait être également attribuée à la présence de l'eau résiduelle. La bande d'absorption à 2928 cm^{-1} résulte des vibrations d'élongation des liaisons C-H (ZENG *et al.*, 2012 ; SIVAM *et al.*, 2013). Une bande est également observée autour de 1590 cm^{-1} a été attribuée aux vibrations d'élongation du groupe carboxyle, et confirme ainsi la présence de fonctions COO^- (HUANG *et al.*, 2010). Cette même bande à 1590 a été également attribuée par PIYATHIDA *et al.*, (2014) à la présence de protéines. Les bandes dans la région $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ correspondent aux vibrations d'élongation des groupes latéraux C-OH et aux vibrations des liaisons glycosidiques C-O-C (XU *et al.*, 2012). La bande à 1393 cm^{-1} pourrait signaler la vibration de déformation des groupes phénoliques OH (ADAPA *et al.*, 2009) confirmant de ce fait la présence de CP au sein de cette fraction. La bande à 1306 cm^{-1} a été attribuée à la fonction amine tertiaire (PARIKH *et* CHOROVER, 2005). L'absorbance à 1069 cm^{-1} indique la présence de liaisons C-C-O dans la structure de FSM ce qui confirme à nouveau la présence de composés glucidiques (HARRY-O'KURU, 2007). La bande à 1019 cm^{-1} selon ZENG *et*

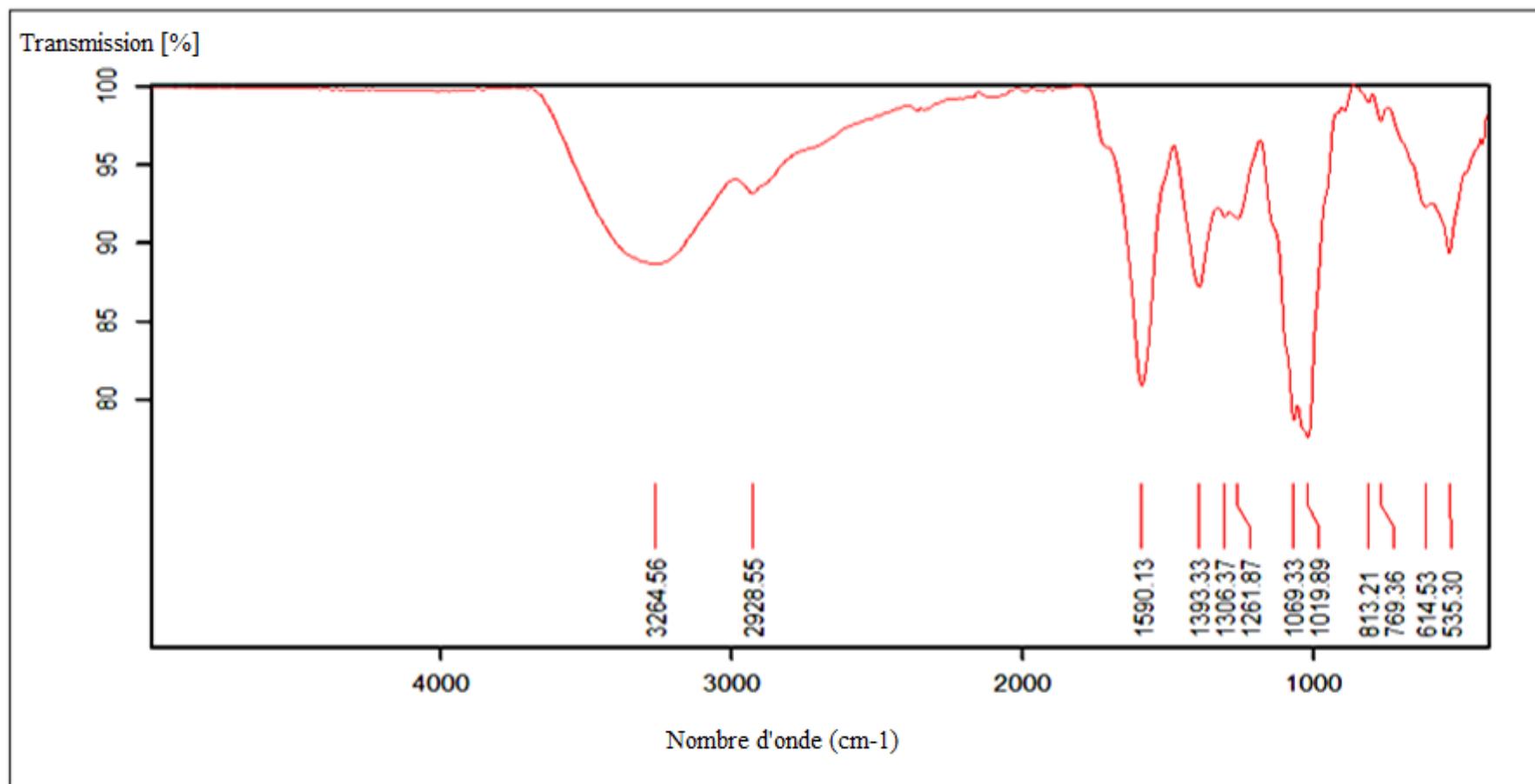


Figure 48 : Spectre FTIR de la FSM.

al. (2011) résulte des vibrations d'élongation de la liaison C-O. La bande à 813 cm^{-1} indique la présence de Man selon JIANG et *al.* (2008) et est attribuée également aux vibrations de déformation de liaisons –CH selon MOHANASRINIVASAN et *al.* (2014). La bande à 769 cm^{-1} a été associée aux vibrations des groupements CH_2 de la cellulose comme décrit par ISROI et *al.* (2012). Elle pourrait également être attribuée aux vibrations d'élongations du cycle D-glucopyranosyl (ZENG et *al.*, 2011).

2.2.6 Extraction et identification des composés phénoliques liés à la FSM

En vue d'extraire et d'identifier les CP liés aux polysaccharides constituant la FSM, un protocole de déphénolisation a été appliqué. Ce dernier a permis l'obtention d'informations sur les CP libres (non liés) ou liés par des liaisons esters ou éthers aux glucides de la fraction FSM. Des résidus polysaccharidiques R1, R2 et R3 ont été obtenus après respectivement extraction directe des CP, extractions après traitement alcalin doux (1 M NaOH/18 h/30°C) et après traitement alcalin fort (6 M NaOH/24 h/37°C). Après chaque étape de traitement, les CP libérés ont été extraits, dosés puis séparés par chromatographie sur couche mince (CCM).

La figure 49a, donne le rapport CP/OT/100 g de MS calculé pour chaque résidu polysaccharidique. Les résultats montrent une tendance à la baisse de ce rapport indiquant de ce fait d'une part la diminution du taux en CP et d'autre part l'augmentation de la teneur en OT des résidus polysaccharidiques.

La figure 49b donne la quantité de CP (g/100 g) extraits après chaque étape de traitement. Les résultats montrent la présence dans l'extrait FSM d'une faible quantité de CP libres ([CP1] = 0,019 g/100 g de MS). Il est donc possible de conclure à l'efficacité de l'élimination des CP libres pendant le protocole d'extraction de la FSM à partir du RIA des margines. Concernant les CP liés, le traitement alcalin doux a permis l'extraction de 0,82 g de CP/100 g de MS ([CP2]). D'après la littérature, il s'agit ici de CP liés par des liaisons esters aux polysaccharides de la FSM. Un taux de 0,22 g de CP/100 g de MS ([CP3]), liés très probablement en majorité par des liaisons éthers, a été obtenu.

Dans le but d'identifier le type de CP contenus dans les extraits CP1, CP2 et CP3, par référence à des standards phénoliques, une séparation sur CCM a été effectuée. Les R_f des différents standards sont donnés par le tableau XXVII. La figure 50 présente le profil en CCM des extraits phénoliques sous UV à 254 nm (Figure 50a) et à 366 nm (Figure 50b). Après révélation par exposition sous UV à 254 nm, l'extrait phénolique CP1, correspondant au CP non liés, ne donne lieu à aucun spot ce qui peut être expliqué par la non détection de la faible concentration de CP contenus dans CP1. Le profil de l'extrait CP2 révèle la présence d'acide

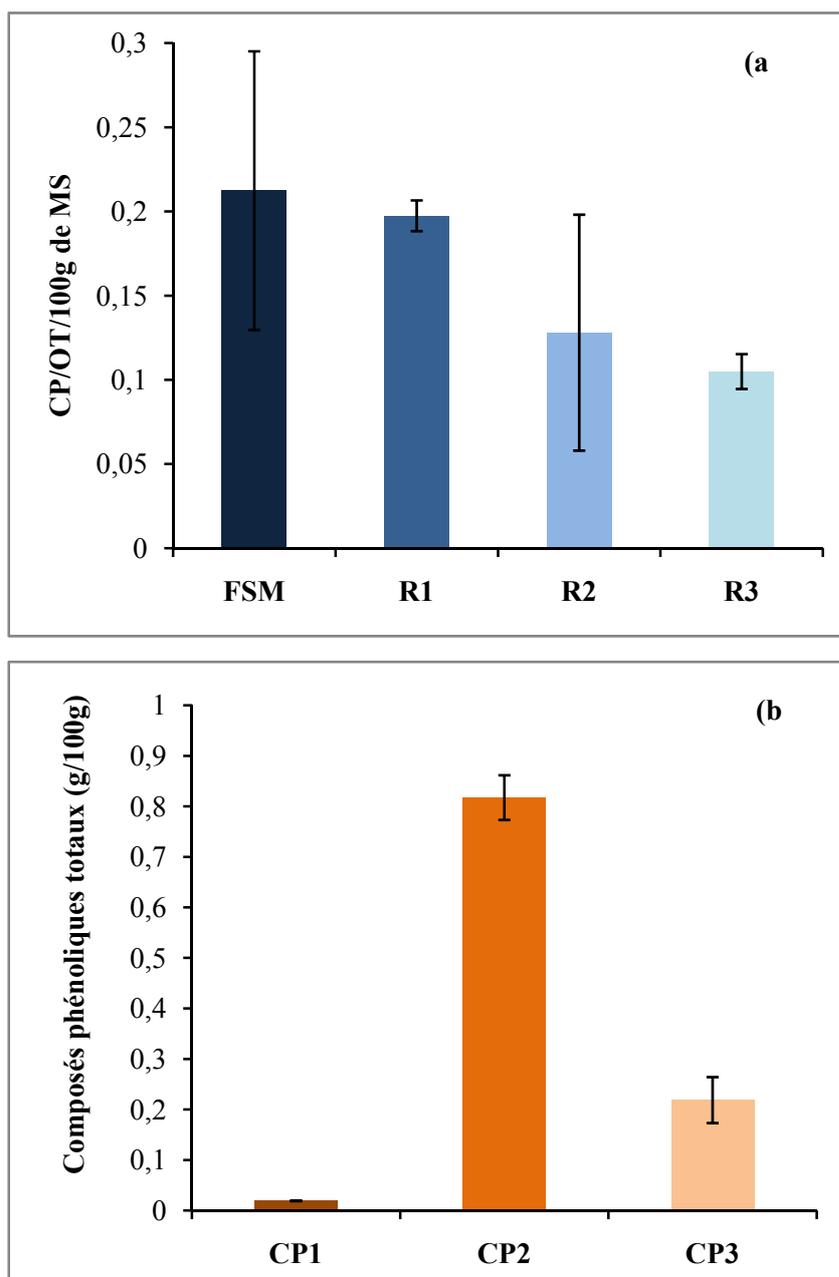


Figure 49 : Suivi de la déphénolisation de la FSM. (a) rapport CP/OT/matière sèche dans les extraits polysaccharidiques, (b) et par dosage des composés phénoliques totaux dans les extraits après déphénolisation

caféique (AC) ($R_f = 0,65$) et d'AG ($R_f = 0,45$) et d'oleuropeine ($R_f = 0,32$) indiquant donc que ces CP existeraient sous forme de monomères liés par des liaisons esters aux polysaccharides de la FSM. La présence de l'AC dans l'extrait CP1 est confirmée par la deuxième révélation à 366 nm. D'autres spots sont apparus au niveau du point de dépôt témoignant de leur MM élevée. Ils pourraient correspondre à des oligomères de CP comme décrits par BURR et FRY, (2009) qui ont identifié des oligomères d'acide férulique et/ou même des oligomères d'AC liés à des arabinoxylanes dans les cultures en suspension de

Tableau XXVII : Rapports frontaux (Rf) des standards phénoliques calculés après séparation sur CCM avec le mélange de solvants : chloroforme/méthanol/acide formique (85:15:1).

Standards phénoliques	Rf	Symbole
Oleuropéine	0,32	S4
Acide gallique	0,45	S1
Acide caféique	0,65	S3
Acide p-coumarique	0,75	S5
Acide férulique	0,80	S6
Acide cinnamique	0,85	S2

cellules de maïs. Les autres spots ayant migrés moins que tous les standards ($R_f = 0,2-0,30$) pourraient correspondre à des oligomères de faible degré de polymérisation. La figure 50 montre que l'extrait phénolique CP3 est constitué d'AG et probablement de dimères et d'oligomères d'acide hydroxycinnamiques ($R_f = 0,15-0,25$) qui seraient liés aux polysaccharides de FSM par des liaisons éthers. A noter que l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide cinnamique n'ont pas été détectés sous forme de monomères estérifiant les polysaccharides de la FSM.

Les résultats obtenus dans cette étude apparaissent en concordance avec ceux issus de la littérature. En effet, les acides hydroxycinnamiques tels que l'acide férulique et l'acide p-coumarique sont esterifiés aux arabinoxylanes des graminées (YANG et *al.*, 2014), aux pectines des épinards (FRY, 1982, 1983) et de betterave sucrière (BACIC et *al.*, 1988) et aux xyloglucanes du bambou (ISHII et HIROI, 1990). L'AC, détecté dans notre étude, a également été mis en évidence comme monomère estérifiant les pectines dans des cultures de cellules de menthe en suspension (YANG et *al.*, 2014). De plus, la présence de dimères d'AC liés à la paroi cellulaire des dicotylédones ont été rapportés chez la menthe par YANG et UCHIYAMA, (2000).

Contrairement à ce qui a été supposé pendant longtemps, plusieurs auteurs ont rapporté que les trimères d'acides féruliques et les oligoférulates sont plus impliqués que les dimères dans l'estérification des polysaccharides (FRY et *al.*, 2000 ; BURR et Fry, 2009).

La concentration en NaOH, la durée du traitement et la température sont autant de facteurs qui déterminent l'efficacité du traitement d'hydrolyse des liaisons esters et/ou éthers.

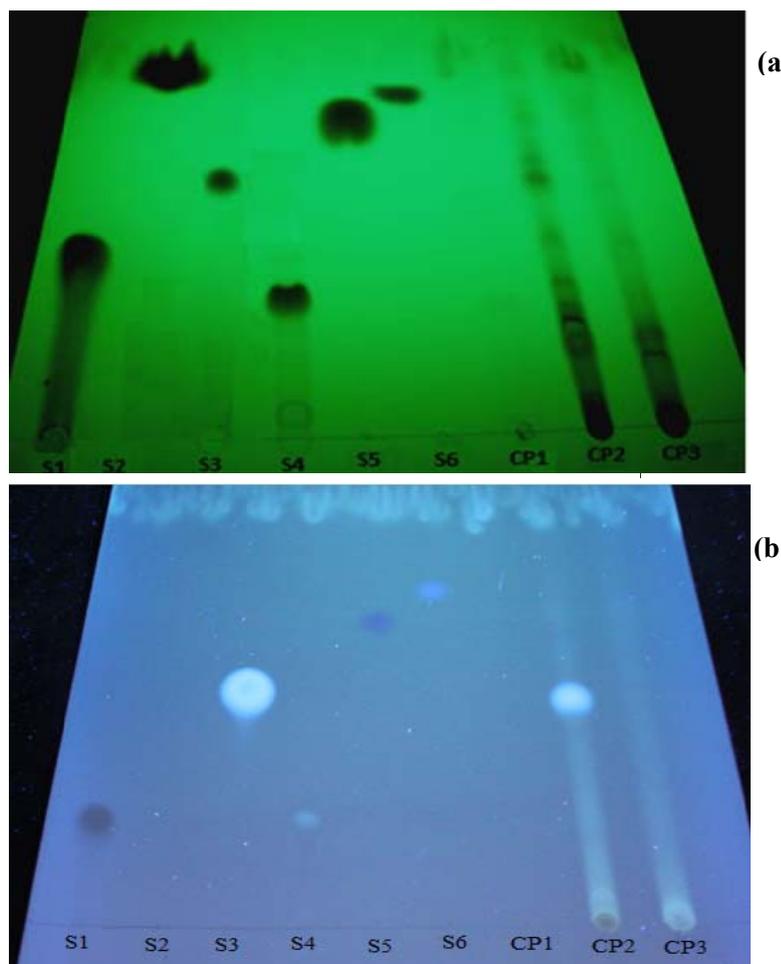


Figure 50 : Analyse par CCM des composés phénoliques contenus dans les différents extraits issus du protocole de déphénolisation de la FSM (a) UV à 254 nm et (b) UV à 366 nm. S1 : acide gallique ; S2 : acide cinnamique ; S3 : acide caféique ; S4 : oleuropéine ; S5 : acide p-coumarique ; S6 : acide férulique.

Le traitement alcalin doux appliqué dans notre protocole (1M NaOH, 30°C, 18 h) était efficace pour libérer la majorité des CP estérifiant les polysaccharides. En effet, PARKER et *al.* (2005) ont indiqué qu'un traitement de 0,1 M de NaOH pendant 24 h ne libère pas la totalité des diférulates (dimère d'acide férulique) et qu'un traitement avec 1 M NaOH a permis de libérer les diférulates (8-8-DiFA) ayant une plus grande stabilité aux faibles traitements alcalins. Les mêmes auteurs ont rapporté également que les acides phénoliques libérés par NaOH 4 M sont probablement liés par des liaisons éthers aux polymères de la matrice polysaccharidique et/ou à la lignine (DUPONT et SELVENDRAN, 1987). Le traitement avec NaOH 6 M à 37°C pendant 24 h, qui est appliqué dans cette étude comme proposé par BURR et FRY (2009), est capable d'hydrolyser les liaisons éthers. L'extrait CP3 contient donc des CP liés par des liaisons éthers aux polysaccharides de la FSM ou des CP estérifiés (non libérés par le traitement alcalin doux).

Les travaux de KERR et FRY, (2004) et de BURR et FRY, (2009) ont mis en évidence que les liaisons éthers qui s'établissent entre les polysaccharides et les CP des cultures en suspension de cellules de maïs (ex : ferulate) correspondent à des éthers de benzyle qui ont des structures de quinone méthide. De telles liaisons éthers impliquant les CP ont également été rapportées dans les parois lignifiées (SCALBERT *et al.*, 1985; WALLACE *et al.*, 1995; BURR et FRY, 2009).

L'existence de réticulations polysaccharide-polysaccharide par l'intermédiaire de ponts diféruleate a été proposée par plusieurs auteurs (KERR et FRY, 2004 ; PARKER *et al.*, 2005). En effet, des pectines ferulées ont pu être gélifiées *in vitro* par un mélange peroxydase+H₂O₂ ou une laccase (OOSTERVELD *et al.*, 2001 ; MARTINEZ-LOPEZ *et al.*, 2011). Ces expérimentations démontrent sans ambiguïté que les réticulations inter-polymères peuvent être générées par un mécanisme enzymatique oxydatif (PARKER *et al.*, 2005). Les liaisons entre polysaccharides via des dimères d'acide férulique peuvent également être confirmées par la taille du polysaccharide auquel les CP sont rattachés (KERR et FRY, 2004). Les résidus polysaccharidiques R1, R2 et R3 ainsi que la FSM ont été fractionnés par SEC (Figure 51) dans le but de vérifier la présence d'interactions interpolysaccharidiques. Les résultats montrent des profils d'élution très semblables entre R2 et FSM ce qui laisse penser que les CP liés par des liaisons esters ne sont pas impliqués dans des réticulations entre polymères polysaccharidiques. Par contre, on constate une différence dans le profil d'élution de R2 et R3. Le pic qui apparaît autour de 16-18 mL dans le profil de R2 n'apparaît pas sur le profil de R3. Ce résultat conduit à conclure que les CP extraits par un traitement alcalin fort pourraient participer à des réticulations entre polysaccharides par l'intermédiaire de di-, tri- et/ou oligomères d'acides hydroxycinnamiques.

2.3 Activités biologiques des extraits polysaccharidiques

2.3.1 Etude de l'activité prébiotique

2.3.1.1 Hydrolyse des prébiotiques candidats par un suc gastrique artificiel

L'un des critères définissant un pré-biotique est son indigestibilité par le suc gastrique, caractéristique qui lui permet d'atteindre le gros intestin où il exerce ses effets bénéfiques. Ainsi, les fractions RIA, FSM et des prébiotiques commerciaux ont été soumis à une hydrolyse par un suc gastrique artificiel afin de comparer leur résistance à la dégradation dans cet environnement (Tableau XXVIII). Le pourcentage de digestibilité est calculé en se basant

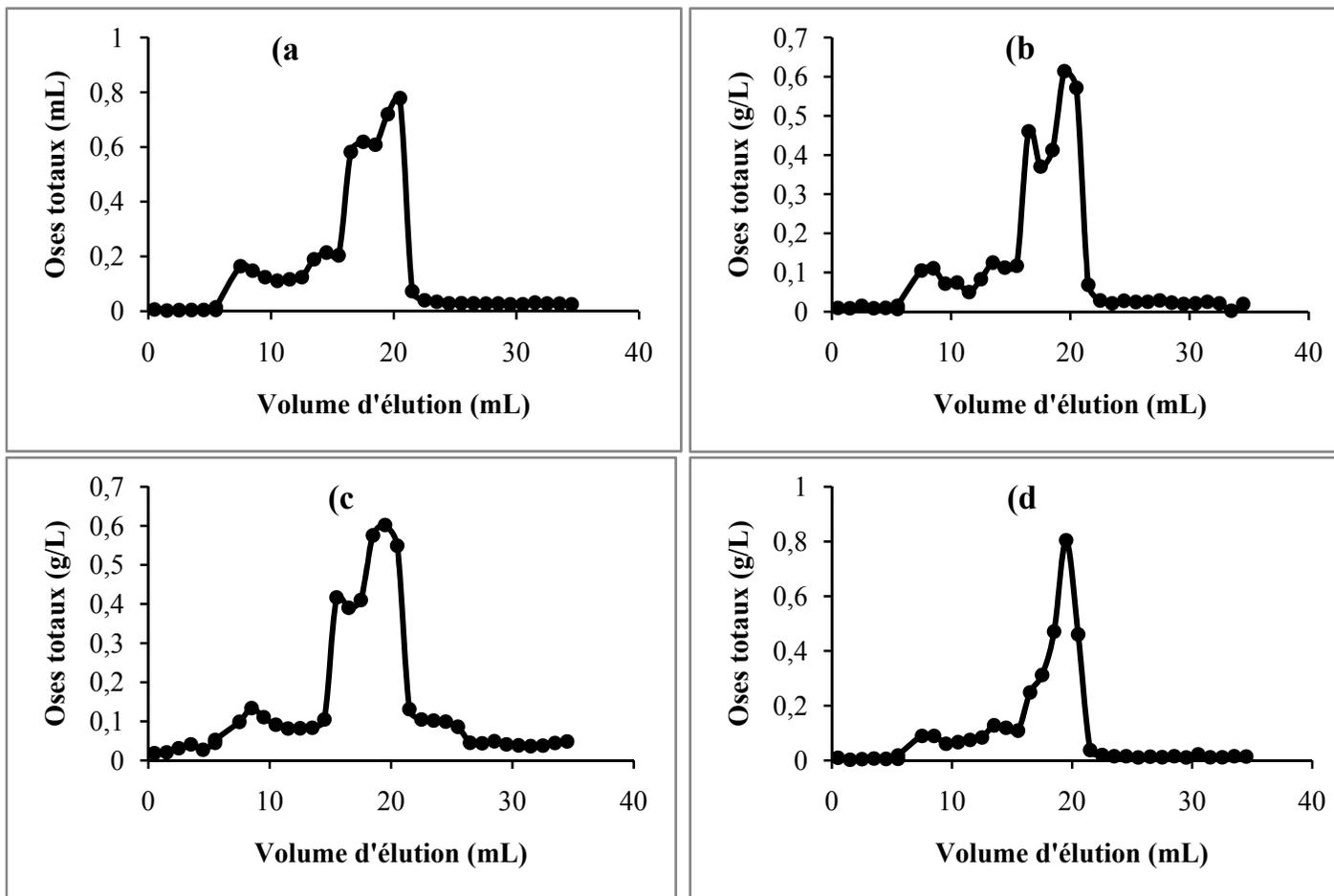


Figure 51 : Profils d'élution de la FSM et des résidus polysaccharidiques obtenus après déphénolisation sur colonne Superdex 200. FSM (a) ; (b) R1 ; (c) R2 ; (d) R3.

Tableau XXVIII : Digestibilité (%) du RIA, FSM et des prébiotiques de référence par un suc gastrique artificiel.

Echantillons testés	Temps (h)	pH				
		1	2	3	4	5
FOS	0,5	2,77 ± 1,00	1,50 ± 0,62	1,54 ± 0,76	0,58 ± 0,10	0,67 ± 0,25
	1	3,64 ± 1,52	2,64 ± 0,08	1,76 ± 0,60	1,16 ± 0,22	0,77 ± 0,30
	2	5,40 ± 0,38	2,87 ± 1,05	2,47 ± 1,23	2,00 ± 1,33	2,28 ± 0,27
	4	9,97 ± 0,85	4,90 ± 0,83	4,33 ± 1,40	4,02 ± 0,83	2,63 ± 0,23
	6	9,98 ± 0,75	6,50 ± 1,16	5,57 ± 0,35	4,88 ± 0,86	3,98 ± 1,65
Inuline	0,5	7,20 ± 1,34	0,82 ± 0,14	0,46 ± 0,16	0,18 ± 0,10	0,08 ± 0,05
	1	11,62 ± 2,11	1,12 ± 0,35	0,92 ± 0,35	0,61 ± 0,09	0,51 ± 0,20
	2	13,08 ± 2,93	1,31 ± 0,28	0,75 ± 0,04	0,79 ± 0,06	1,00 ± 0,06
	4	20,40 ± 2,25	3,46 ± 1,03	0,85 ± 0,12	0,79 ± 0,06	1,12 ± 0,06
	6	27,40 ± 7,92	3,98 ± 0,33	1,46 ± 0,42	1,36 ± 0,28	1,27 ± 0,28
RIA	0,5	11,05 ± 4,54	11,81 ± 0,42	7,77 ± 0,29	7,50 ± 1,00	8,00 ± 1,85
	1	16,00 ± 5,39	15,32 ± 6,41	12,68 ± 3,12	9,47 ± 0,69	8,69 ± 0,87
	2	22,17 ± 0,72	19,89 ± 3,03	16,56 ± 4,73	16,53 ± 4,70	8,91 ± 0,23
	4	25,23 ± 5,05	23,67 ± 0,30	21,34 ± 5,09	17,46 ± 4,04	15,25 ± 3,80
	6	38,93 ± 2,29	34,04 ± 0,79	29,23 ± 7,58	27,26 ± 8,36	16,06 ± 2,65
FSM	0,5	4,19 ± 0,32	5,21 ± 2,24	3,63 ± 1,00	2,00 ± 0,09	2,36 ± 1,20
	1	16,95 ± 2,10	13,84 ± 2,43	13,02 ± 1,80	7,23 ± 0,40	3,11 ± 0,40
	2	21,90 ± 5,82	14,54 ± 3,00	14,14 ± 1,28	8,15 ± 0,94	8,22 ± 0,32
	4	23,03 ± 0,34	17,80 ± 0,48	16,04 ± 5,59	8,27 ± 1,25	8,48 ± 3,60
	6	32,17 ± 1,39	21,90 ± 5,82	16,74 ± 1,22	11,95 ± 3,38	10,10 ± 4,58

sur le contenu en sucre réducteurs libérés et le contenu en OT de l'échantillon (matériel et méthodes). Une différence significative de digestibilité est retrouvée en fonction du pH et du temps ($p \leq 0,001$).

Logiquement, les résultats montrent que le taux d'hydrolyse augmente avec la diminution du pH du suc gastrique artificiel qui favorise le phénomène d'hydrolyse. L'augmentation du temps d'incubation est également favorable à ce phénomène. Le pourcentage maximal de digestibilité des fructooligosaccharides (FOS), de l'inuline, du RIA et de la FSM, après 6 h d'incubation à pH 1, était de 9,98, 27,40, 38,93 et 32,17% respectivement. Il a été rapporté que les aliments sont généralement libérés de l'estomac humain, où le pH est d'environ 2-3, après 2 h (WANG, 2009 ; WICHIENTHOT *et al.*, 2010). Il est donc possible de conclure que 80-85% des polysaccharides des margines peuvent atteindre l'intestin. Ainsi, le RIA et la FSM répondent au premier critère, de non digestibilité, définissant un prébiotique.

2.3.1.2 Etude de la fermentation des extraits polysaccharidiques des margines par les probiotiques

2.3.1.2.1 Sélection de souches capables de cataboliser les extraits polysaccharidiques des margines

Les résultats de la culture des 7 souches de lactobacilles sur des milieux MRS contenant comme seules sources de carbone le RIA ou la FSM à une concentration de 10 g/L sont donnés par la figure 52. Excepté *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) et *L. casei*, les souches ne présentent pas une bonne croissance en présence des polysaccharides des margines. Certaines souches montrent une difficulté à pousser même à $t = 0$, indiquant une viabilité très faible dès le départ à l'exemple de *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. brevis* et *paracasei*. Ceci pourrait s'expliquer par l'effet bactéricide des CP résiduels présents dans les extraits testés (OBIED *et al.*, 2007 ; YANGUI *et al.*, 2009). En outre, les résultats témoignent de la faible capacité fermentaire de ces souches. A l'inverse, les souches *L. rhamnosus* et *L. casei* ont montré une bonne croissance en présence de RIA et de FSM en fonction du temps, indiquant de ce fait leur aptitude à utiliser ces extraits polysaccharidiques des margines comme source de carbone. Ainsi, les deux souches *L. rhamnosus* et *L. casei* seront utilisées comme souches modèles pour une étude plus complète de leur cinétique de croissance en présence de RIA et FSM.

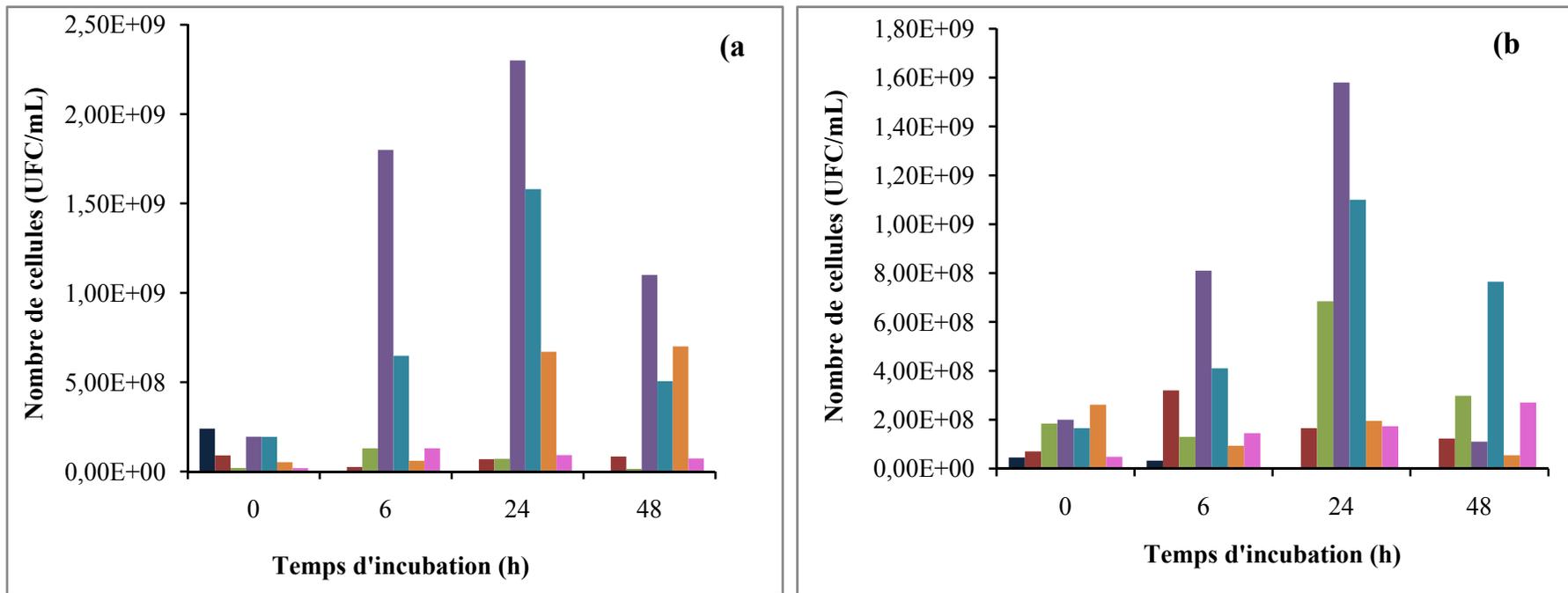


Figure 52 : Croissance des souches de lactobacilles (UFC/mL) en présence de RIA (a) et FSM (b) à une concentration de 10 g/L. *L. bulgaricus* (■), *L. gasseri* (■), *L. paracasei* (■), *L. rhamnosus* (■), *L. casei* (■), *L. brevis* (■), *L. acidophilus* (■).

2.3.1.2.2 Cinétiques de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus casei* en culture sur des extraits polysaccharidiques issus des margines

Dans le but d'évaluer l'utilisation des margines, du RIA et de la FSM comme sources de carbone par *L. rhamnosus* et *L. casei*, les cinétiques de croissance et de consommation de substrat carboné ont été réalisées et comparées à des cultures témoins sur milieux MRS supplémentés ou non avec du Glc ou des prébiotiques commerciaux (Figure 53). Des différences significatives ont été obtenues avec les différents substrats testés à différentes concentrations ($p \leq 0,001$). Dans tous les milieux de culture les souches probiotiques ont atteint la phase stationnaire au bout de 24 h d'incubation, à l'exception de *L. casei*, qui entre dans cette phase après 48 h d'incubation lorsque les substrats sont le Glc ou le RIA. La biomasse cellulaire varie de façon très significative avec le temps d'incubation ($p \leq 0,0001$). La croissance des deux souches est significativement plus élevée ($p \leq 0,0001$) en présence d'une source de carbone que dans le témoin négatif après 24 h d'incubation.

Les deux souches de lactobacilles testées montrent une croissance importante dans les milieux de culture MRS supplémentés avec les fractions RIA et FSM à des concentrations de 5 et 10 g/L par rapport aux croissances observées avec les milieux MRS supplémentés avec du Glc, des FOS ou de l'inuline. A noter que la population finale est proportionnelle à la teneur en substrat carboné. D'autre part, dans les milieux sans source de carbone ou supplémentés avec les margines il n'y a pas de production de biomasse. L'absence de croissance en présence de margines s'explique par son activité antibactérienne due à son contenu élevé en CP (OBIED et al., 2007). La diminution de la biomasse est constatée soit après 24 h (milieu MRS sans substrat), 48 h d'incubation pour la plupart des milieux en présence des deux souches sauf les milieux contenant le Glc et le RIA à 10 g/L en présence de *L. casei* et dans le milieu contenant FOS (5 g/L) comme source de carbone en présence de *L. rhamnosus* où la diminution de la biomasse est constatée après 72 h. Cette diminution de la biomasse semble être due à une limitation par le substrat carboné. La diminution de la biomasse peut être attribuée également à la toxicité des CP liés à ces polysaccharides, lorsque le temps d'incubation est long. Toutefois, la concentration en biomasse dans le milieu supplémenté avec le RIA (10 g/L) continue d'augmenter même au bout de 48 h d'incubation en présence de *L. casei*. La complexité de la structure du RIA expliquerait le fait que plus de temps soit nécessaire à cette bactérie pour cataboliser le polymère (VARDAKOU et al., 2008). Il a été rapporté que plusieurs enzymes bactériennes sont impliquées dans la dégradation des polysaccharides dans le colon telles que l'amylase, la pectinase, la xylanase, la β -D-galactosidase, l' α -L-arabinofuranosidase et la β -D-glucosidase (PAK et al., 2013). Ainsi, les

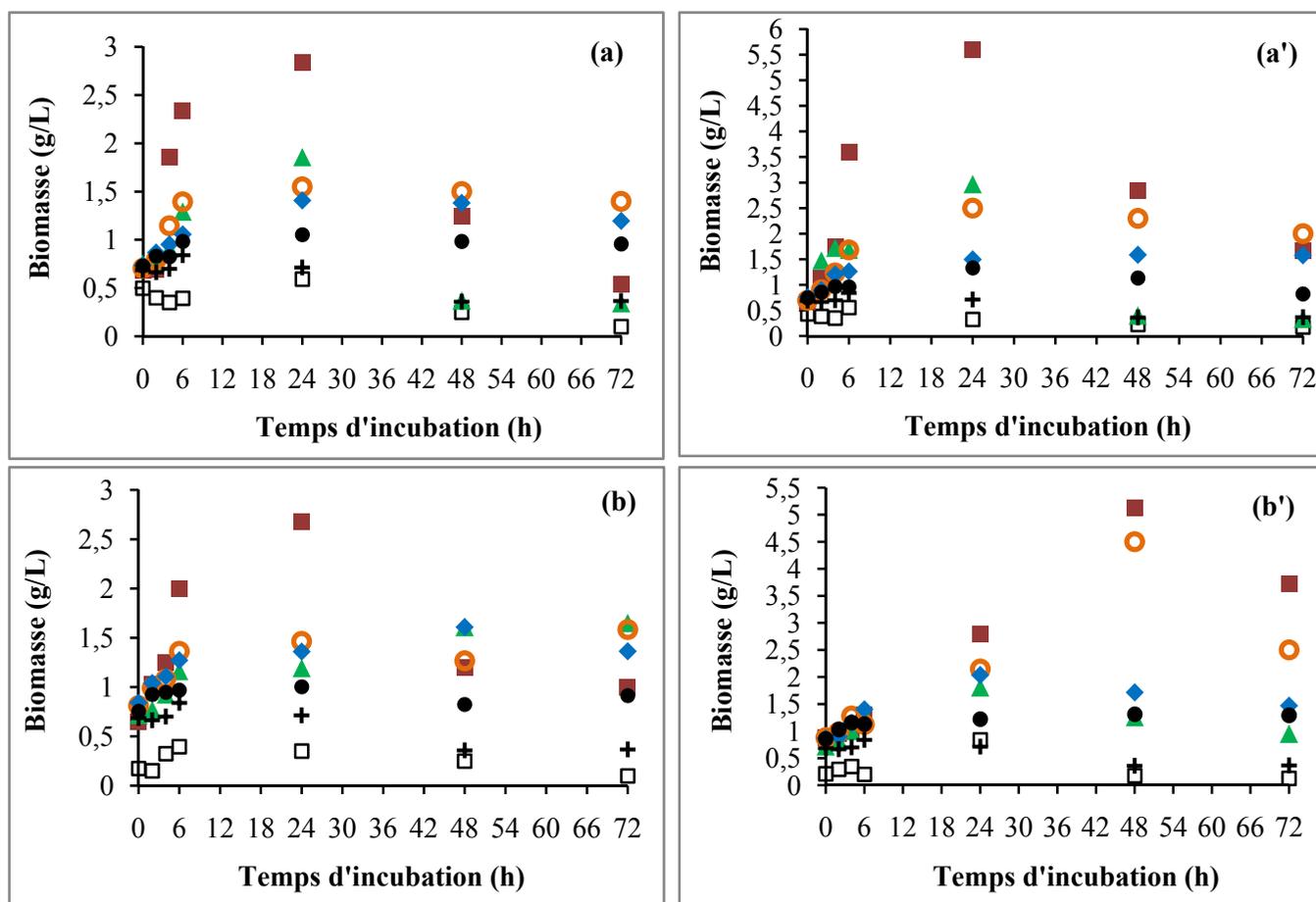


Figure 53 : Cinétiques de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* (a et a') et de *Lactobacillus casei* (b et b') dans le milieu MRS supplémenté ou non par une source de carbone à des concentrations de 5 g/L (a et b) et 10 g/L (a' et b'). Margines (-□-), RIA (-■-), FSM (-▲-), Glc (-○-), FOS (-◆-), Inuline (-●-), Milieu MRS sans substrat (+).

différents comportements face aux différents substrats polysaccharidiques varient en fonction des souches et de leur équipement enzymatique. Des enzymes capables de libérer les unités phénoliques liées aux polysaccharides pourraient également être impliquées tels que l'acide férulique estérase. Ce phénomène pourrait augmenter l'accessibilité des sucres aux enzymes glycolytiques (SZWAJGIER et JAKUBCZYK, 2011).

Les taux de croissance (μ) et les temps de génération (G) des différentes souches sont donnés par le tableau XXIX. Parmi toutes les fractions, la croissance maximale a été obtenue en présence de RIA pour *L. rhamnosus* (5 et 10 g/L) et en présence de 5 g/L de RIA pour *L. casei*. Le taux de croissance obtenu en présence de FSM est supérieur à celui obtenu en présence du contrôle positif et des prébiotiques de référence.

Les résultats obtenus ont démontré la capacité du RIA et de la FSM à être métabolisés par les lactobacilles, témoignant de leur potentiel prébiotique. Les souches utilisées dans cette étude métabolisent plus rapidement les polysaccharides que les oligosaccharides tels que les FOS. Des comportements similaires ont été signalés précédemment en utilisant FOS et inuline comme sources de carbone pour certaines espèces de bifidobactéries (VERNAZZA et *al.*, 2006). Cependant, un certain nombre d'autres études sur les polysaccharides ont rapporté que des oligosaccharides de faible masse moléculaire ou des oligosaccharides hydrolysés permettent une meilleure persistance dans le côlon ce qui augmente leur fermentabilité par les communautés microbiennes intestinales (RAMNANI et *al.*, 2012).

D'autre part, les taux de croissance plus élevés obtenus en présence de RIA et de FSM pourraient être expliqués par l'effet protecteur des CP résiduels, agissant comme antioxydants, notamment dans les premières 24 h de culture ce qui justifie l'effet de ces extraits sur la croissance des souches utilisées. Par ailleurs, plusieurs études récentes ont signalé le rôle prébiotique de plusieurs CP (flavan-3-ols, resveratrol, proanthocyanidines, ellagitannins, etc.) *in vitro* et *in vivo* (CARDONA et *al.*, 2013 ; DUEÑAS et *al.*, 2015).

Ainsi on peut suggérer, qu'en plus de leur activité antioxydante, les CP liés au RIA et FSM ont exercé un rôle prébiotique complémentaire à celui exercé par la fraction polysaccharidique. De façon similaire, d'autres études ont rapporté l'action conjuguée des fibres diététiques et des CP dans la stimulation de la croissance de souches probiotiques et l'inhibition de souches pathogènes. Ainsi, MANDALARI et *al.* (2010) ont suggéré un effet prébiotique potentiel de la peau des amandes naturelle ou blanchie. Ces auteurs ont lié cet effet prébiotique non seulement aux fibres diététiques composant la peau des amandes, mais également à des CP tels que l'acide férulique, les flavan-3-ols et les flavonols qui y sont présents.

Tableau XXIX : Paramètres de croissance des souches de lactobacilles en présence des différents substrats.

	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>				<i>Lactobacillus casei</i>			
	μ (h^{-1})		G (h)		μ (h^{-1})		G (h)	
	5 g/L	10 g/L	5 g/L	10 g/L	5 g/L	10 g/L	5 g/L	10 g/L
Glc	0,163 ± 0,021	0,124 ± 0,003	4,27 ± 0,56	5,57 ± 0,13	0,082 ± 0,002	0,041 ± 0,01	8,47 ± 0,22	17,00 ± 2,34
FOS	0,059 ± 0,008	0,129 ± 0,028	11,82 ± 1,70	5,50 ± 1,18	0,065 ± 0,01	0,084 ± 0,001	10,82 ± 2,12	8,22 ± 0,14
Inuline	0,034 ± 0,003	0,030 ± 0,006	20,36 ± 1,69	23,95 ± 5,17	0,039 ± 0,002	0,047 ± 0,002	17,95 ± 0,99	14,85 ± 0,68
RIA	0,305 ± 0,005	0,272 ± 0,054	2,27 ± 0,04	2,59 ± 0,52	0,226 ± 0,068	0,047 ± 0,002	3,20 ± 0,96	14,85 ± 0,68
FSM	0,131 ± 0,021	0,135 ± 0,016	5,35 ± 0,84	5,17 ± 0,62	0,125 ± 0,008	0,102 ± 0,028	5,53 ± 0,38	7,06 ± 1,92
Margines	-	-	-	-	-	-	-	-
MRS^a	0,032 ± 0,010		22,28 ± 1,02		0,030 ± 0,001		23,00 ± 2,50	

a :MRS sans substrat. G: temps de génération. μ : taux de croissance croissance

De faibles taux de croissance ont été obtenus en présence d'inuline et de FOS contrairement à ce qui a été signalé par plusieurs articles concernant l'effet prébiotique de ces molécules (LOPEZ-MOLINA et al., 2005; VAN De WIELE et al., 2007). Cette faible croissance pourrait s'expliquer par le fait que la capacité d'un microorganisme à utiliser un prébiotique est spécifique de la souche et du type du substrat (SHAH, 2001; GODERSKA et al., 2008; PAN et al. 2009). Ainsi, il a été rapporté que le Glc est le substrat le plus facilement métabolisable car il intègre directement la voie d'Embden–Meyerhof–Parnas, la voie dans laquelle par homofermentation, les bactéries produisent uniquement le lactate comme produit final. Ce même glucose peut également être catabolisé par la voie de la phosphocétolase qui par hétérofermentation produisent en plus de l'acide lactique, l'éthanol et le CO₂ comme produits finaux (AXELSSON, 1993; GODERSKA et al., 2008). En outre, l'effet de l'inuline sur la croissance des probiotiques dépend de son degré de polymérisation. En effet, l'inuline hautement soluble augmente fortement la croissance de ces bactéries (WINARTI et al., 2013).

➤ **Evolution du pH et consommation du substrat en cours de culture**

Les tableaux XXX et XXXI présentent les valeurs de pH obtenues après différents temps d'incubation en présence des différents substrats pour respectivement *L. rhamnosus* et *L. casei*. Les valeurs de pH des milieux de culture diminuent au cours de la croissance bactérienne. Les diminutions de pH entre 0 et 72 h d'incubation observées dans les milieux supplémentés par le Glc, le RIA et la FSM étaient de 1,99 à 1,80, de 0,50 à 0,35 et de 0,70 à 0,40 respectivement. Ces diminutions de pH plus ou moins marquées confirment que les lactobacilles sont capables de fermenter ces substrats en composés tels que les acides lactique, acétique, propionique et butyrique. Ces acides à courtes chaînes (AGCC) sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé de l'homme. A titre d'exemples on peut citer leurs effets positifs sur l'absorption de minéraux, contre le cancer, sur la régulation du métabolisme lipidique et l'inhibition de la croissance de souches pathogènes (LOPEZ-MOLINA et al., 2005; SLAVIN, 2013).

La consommation des substrats a été suivie dans toutes les cultures (Figure 54). Les taux de consommation les plus élevés ont été obtenus en présence de Glc. Les pourcentages de glucides totaux consommés dans la culture supplémentée avec la FSM à 10 g/L, après 72 h d'incubation sont respectivement de 43 et 57% pour *L. casei* et *L. rhamnosus* ce qui nous conduit à conclure qu'ils ont été catabolisés par les souches de lactobacilles.

Tableau XXX : Valeurs de pH mesurées dans les milieux de cultures lors de la croissance de *L. rhamnosus* en milieu MRS additionné de différentes sources de carbone.

Echantillon testé	Concentration testée (g/L)	Temps d'incubation (h)						
		0 h	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h	72 h
MRS^a	0	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,04	6,25 ± 0,00	6,25 ± 0,00	6,20 ± 0,00	6,15 ± 0,02	6,15 ± 0,02
Glc	5	6,30 ± 0,00	6,20 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07
	10	6,30 ± 0,00	6,15 ± 0,07	5,65 ± 0,03	5,15 ± 0,07	4,65 ± 0,07	4,35 ± 0,00	4,31 ± 0,00
FOS	5	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,22 ± 0,03	6,20 ± 0,00	6,15 ± 0,07	6,15 ± 0,07	6,10 ± 0,00
	10	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,22 ± 0,03	6,15 ± 0,07	6,10 ± 0,00	6,10 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Inuline	5	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07
	10	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,03	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07
RIA	5	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,10 ± 0,00	5,95 ± 0,00	5,90 ± 0,00	5,90 ± 0,00	5,90 ± 0,00
	10	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,10 ± 0,00	5,95 ± 0,07	5,82 ± 0,03	5,80 ± 0,00	5,80 ± 0,00
FSM	5	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,05 ± 0,07	5,99 ± 0,01	5,97 ± 0,03	5,92 ± 0,03	5,90 ± 0,00
	10	6,30 ± 0,00	6,15 ± 0,07	5,90 ± 0,14	5,75 ± 0,07	5,65 ± 0,07	5,60 ± 0,00	5,60 ± 0,00
Margines	5	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,27 ± 0,03	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07	6,22 ± 0,03
	10	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,27 ± 0,03	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07	6,20 ± 0,00

Tableau XXXI : Valeurs de pH mesurées dans les milieux de cultures lors de la croissance de *L. casei* en milieu MRS additionné de différentes sources de carbone.

Echantillon testé	Concentration testée (g/L)	Temps d'incubation (h)						
		0 h	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h	72 h
MRS^a	0	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,04	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,00	6,25 ± 0,00	6,15 ± 0,02	6,10 ± 0,02
Glc	5	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,20 ± 0,00	5,95 ± 0,20	5,75 ± 0,07	5,70 ± 0,00	5,70 ± 0,00
	10	6,30 ± 0,00	5,95 ± 0,07	5,50 ± 0,14	5,20 ± 0,00	4,50 ± 0,00	4,50 ± 0,00	4,50 ± 0,00
FOS	5	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07	6,05 ± 0,07	6,05 ± 0,07	6,05 ± 0,07
	10	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,25 ± 0,07	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Inuline	5	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,15 ± 0,07	6,15 ± 0,07	6,15 ± 0,07	6,15 ± 0,07	6,15 ± 0,07
	10	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,15 ± 0,07	6,15 ± 0,07	6,15 ± 0,07	6,15 ± 0,07	6,15 ± 0,07
RIA	5	6,30 ± 0,00	6,25 ± 0,07	6,22 ± 0,03	6,12 ± 0,03	6,05 ± 0,07	6,05 ± 0,07	6,05 ± 0,07
	10	6,30 ± 0,00	6,20 ± 0,00	6,05 ± 0,07	5,95 ± 0,07	5,95 ± 0,07	5,95 ± 0,07	5,95 ± 0,07
FSM	5	6,30 ± 0,00	6,17 ± 0,03	6,12 ± 0,03	6,05 ± 0,21	6,05 ± 0,21	6,05 ± 0,21	6,05 ± 0,21
	10	6,30 ± 0,00	6,20 ± 0,00	5,90 ± 0,14	5,90 ± 0,14	5,90 ± 0,14	5,90 ± 0,14	5,90 ± 0,14
Margines	5	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,20 ± 0,14	6,20 ± 0,14	6,20 ± 0,14
	10	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,00	6,20 ± 0,14	6,20 ± 0,14	6,20 ± 0,14

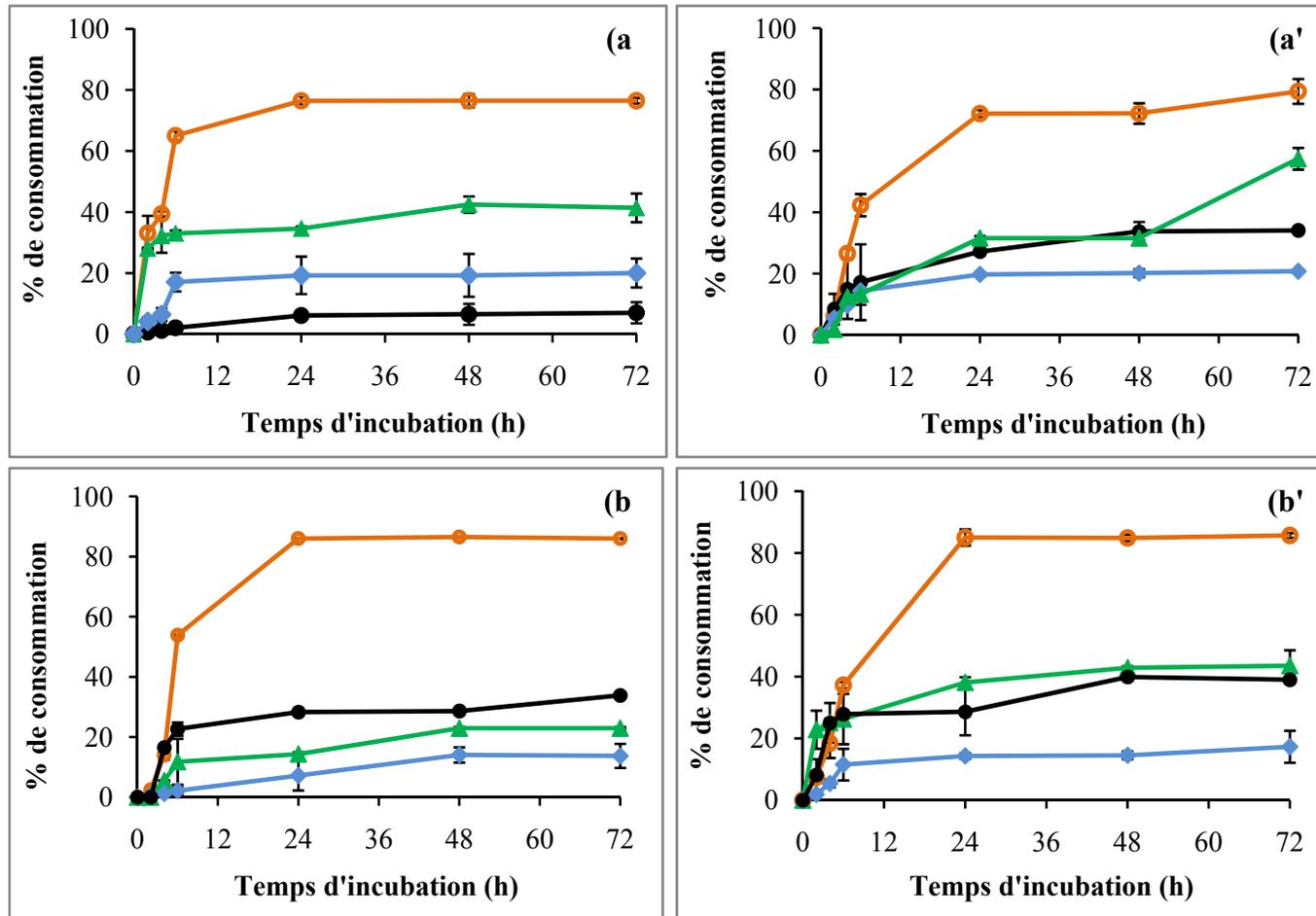


Figure 54 : Consommation par *Lactobacillus rhamnosus* (a et a') et par *Lactobacillus casei* (b et b') des différents substrats à des concentrations de 5 g/L (a et b) et de 10 g/L (a' and b'). FSM (-▲-), Glc (-○-), FOS (-◆-), Inuline (-●-).

Tous les résultats présentés ci-dessus, démontrent les propriétés prébiotiques du RIA et de la FSM. MANDALARI et *al.* (2007) ont indiqué que l'extrait d'oligosaccharides pectiques obtenu par voie enzymatique à partir de la peau de bergamote a eu un effet positif sur la croissance des bifidobactéries et des lactobacilles. D'autre part, GULLÓN et *al.* (2011) ont montré que les oligosaccharides pectiques produits à partir de marc de pomme, coproduit provenant de la fabrication de jus de pomme, présentaient des effets prébiotiques en induisant la croissance de bifidobactéries et la production d'AGCC. En outre, l'effet prébiotique de β -glucanes a également été signalé. SYNYTSYA et *al.* (2009) ont indiqué que des glucanes extraits de champignons *Pleurotus ostreatus* et *Pleurotus eryngii* avaient une activité prébiotique importante sur des Lactobacilles et des bifidobactéries. Ainsi, l'effet prébiotique des extraits polysaccharidiques des margines peut être attribué à la fraction pectique ainsi qu'à la présence de polymères riches en Glc.

2.3.2 Activité antioxydante de la FSM

Jusqu'à présent aucune étude n'a été réalisée sur le pouvoir antioxydant des polysaccharides des margines. Ainsi, nous nous sommes intéressés à étudier l'activité antioxydante de la FSM. Comme indiqué dans la figure 55, la FSM a des activités de piégeage contre le radical DPPH, le radical hydroxyle et l'anion superoxyde ainsi qu'une activité réductrice par comparaison avec la vit C utilisée comme référence.

L' IC_{50} est définie comme étant la concentration de l'échantillon qui donne un pourcentage d'inhibition du phénomène oxydatif de 50%. Pour le pouvoir réducteur, le $PR_{0,5AU}$ est défini comme la quantité d'une substance en $\mu\text{g/mL}$ de volume réactionnel qui donne une unité d'absorbance de 0,5 à 700 nm (ARDESTANI et YAZDANPARAST, 2007). De faibles valeurs d' IC_{50} et de $PR_{0,5AU}$ sont la signature d'activités antioxydantes efficaces. Les valeurs de IC_{50} et de $PR_{0,5AU}$ de la vit C et de la FSM sont données par le tableau XXXII. Les polysaccharides peuvent exercer leurs capacités antioxydantes en piégeant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou en prévenant leur génération (YANG et *al.*, 2010). La FSM a montré de meilleures activités de piégeage du radical DPPH et du radical hydroxyle.

Le radical hydroxyle est le radical le plus réactif parmi toutes les ERO. Il peut générer l'oxydation de presque toutes les macromolécules biologiques conduisant à des dommages cellulaires (ROLLET-LABELLE et *al.*, 1998; XU et *al.*, 2012; CHEN et *al.*, 2014). Le mécanisme le plus important pour la formation de radicaux hydroxyles *in vivo* est la réaction de Fenton (ARUOMA, 1998). D'après les résultats (Figure 55a), la capacité de piégeage des radicaux hydroxyles par la FSM augmente lentement avec l'augmentation de la concentration

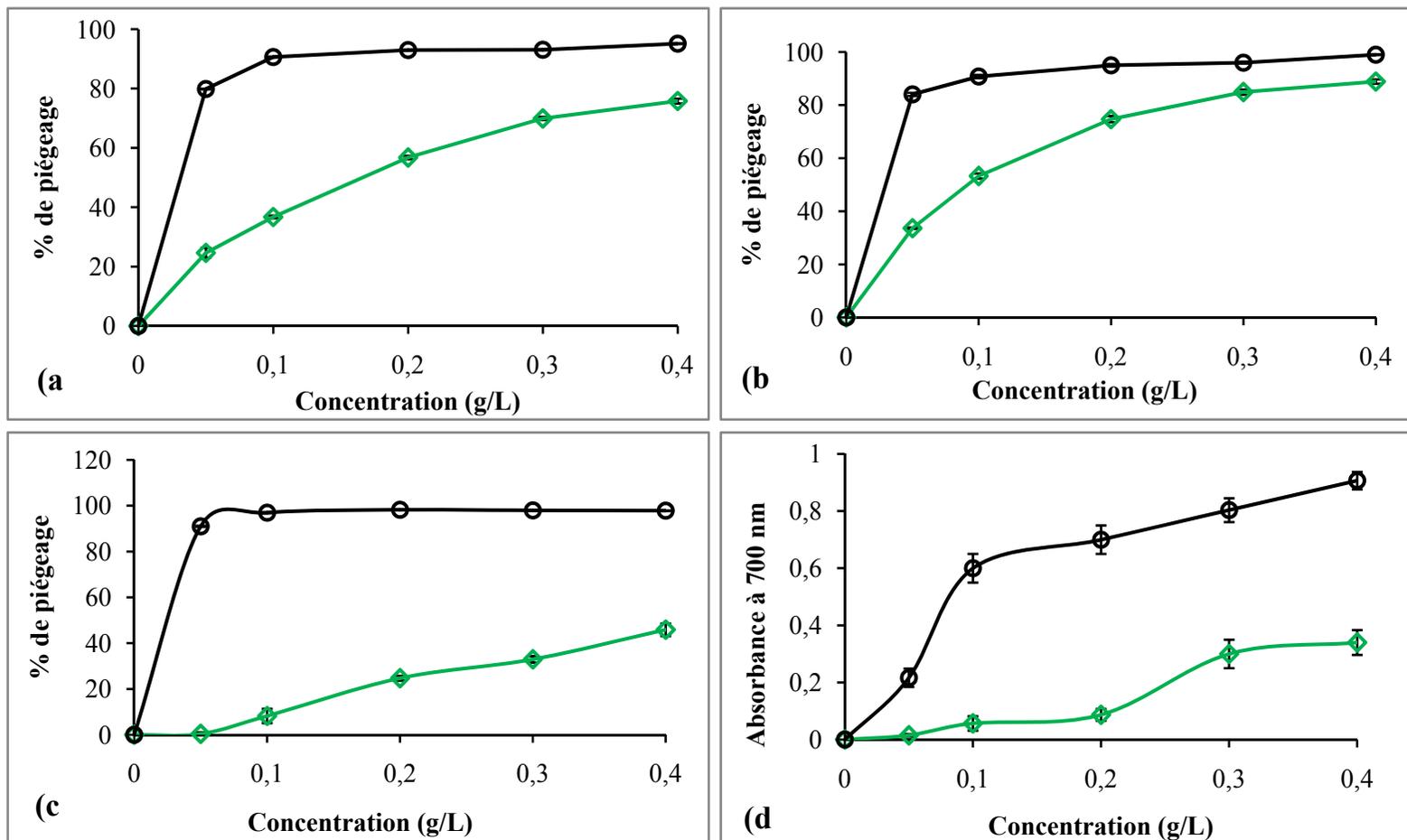


Figure 55 : Activités de piégeage d'espèces radicalaires DPPH (a), radical hydroxyle (b), anion superoxyde (c) et pouvoir réducteur (d) détectées avec la FSM (\diamond) et la vit C (\circ).

Tableau XXXII : Valeurs de IC₅₀ et PR_{0,5AU} de la FSM et de la vit C obtenues avec les différents tests antioxydants.

Tests antioxydant	IC ₅₀ ou PR _{0,5AU} (µg/mL)	
	vit C	FSM
Test DPPH	28,03 ± 1,50	89,43 ± 2,65
Test du radical hydroxyle	28,45 ± 0,75	158,70 ± 4,03
Test de l'anion superoxyde	24,66 ± 0,58	□400
Pouvoir réducteur	85,36 ± 5,49	□400

de l'échantillon dans une gamme de concentrations allant de 0,05 à 0,4 g/L. Les valeurs de IC₅₀ de la vit C et de la FSM sont de 28,47 ± 0,75 µg/mL et 158,70 ± 4,03 µg/mL, respectivement. Ces résultats témoignent de l'activité anti-radical hydroxyle du FSM.

Le DPPH est un radical libre stable largement utilisé pour évaluer l'activité des composés piégeant les radicaux libres (BOUAL et al., 2015). Le piégeage des radicaux DPPH par les antioxydants polysaccharidiques est lié à leur capacité à donner un hydrogène (WONG et al., 2006). Les effets antiradicalaires de la FSM augmentent avec la concentration. L'extrait FSM a montré également une forte activité de piégeage du radical DPPH, avec une valeur de IC₅₀ de 89,43 ± 2,65 µg/mL comparable à celle observée avec la vit C (IC₅₀ = 28,03 ± 1,50 µg/mL).

Ces activités antioxydantes de la FSM s'expliquent par la présence de nombreux groupes hydroxyles libres dans la structure des polysaccharides et très probablement par la présence de CP résiduels. En outre, WU et al. (2014) ont rapporté que la présence d'Ara dans la structure des polysaccharides pourrait réduire la production de radicaux hydroxyles par chélation du Fe²⁺ (un pro-oxydant). Cette hypothèse a été renforcée par CHEVALIER et al. (2001) qui ont rapporté que des protéines glycosylées par du ribose et de l'Ara avaient des propriétés antioxydantes significatives. Ce rôle de l'Ara dans les activités antioxydantes peut être expliqué par le fait qu'il est souvent associé à des CP, tels que l'acide férulique, p-coumarique et caféique dont la présence dans les sous produits oléicoles a été mise en évidence par CCM.

L'extrait FSM a montré des activités de piégeage de l'anion superoxyde et un pouvoir réducteur faible comparativement à la vit C et aux activités précédentes (activités anti-radical hydroxyle, et anti-radical DPPH) (Tableau XXXII, Figure 55c, 55d). Une corrélation, entre les concentrations (R²=984) et l'effet enregistré, a cependant pu être obtenue notamment pour

le test de l'inhibition de l'anion superoxyde. Par exemple à une concentration de 0,2 g/L, un pourcentage de piégeage de l'anion superoxyde de 24,70% est obtenu en présence de FSM alors que la vit C a atteint un pourcentage d'inhibition de 98,19% à la même concentration. De même, pour le pouvoir réducteur, un faible $PR_{0,5AU}$ ($\square 400 \mu\text{g/mL}$) est obtenu pour la FSM comparativement à celui de la vit C ($85,36 \pm 5,49 \mu\text{g/mL}$), ce qui montre une activité réductrice relativement faible.

L'anion radicalaire superoxyde n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés et décomposés en d'autres espèces plus réactives tels que l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles qui peuvent induire des dommages oxydatifs impliquant les lipides, les protéines et l'ADN (XU et *al.*, 2012). Par conséquent, le piégeage de l'anion superoxyde est très important dans les défenses antioxydantes. Il a été rapporté par YANG et *al.* (2010) qu'un degré de méthylation élevé d'un polysaccharide du péricarde du longane mène à la diminution de la capacité de piégeage de l'anion superoxyde. Ceci confirme l'importance des groupes hydroxyles dans l'activité antiradicalaire dans la mesure où le mécanisme général de la méthylation est basé sur la substitution de l'hydrogène des groupes hydroxyles des polysaccharides par un groupe méthyle. Cependant, XING et *al.* (2005) ont remarqué que le chitosane sulfaté présentait un pouvoir de piégeage de l'anion superoxyde important. De même, YUAN, ZHANG et *al.* (2005) ont rapporté que les oligosaccharides de carraghénanes dont le degré de sulfatation et d'acétylation est augmenté avaient une plus grande activité antiradicalaire de l'anion superoxyde que les oligosaccharides de carraghénanes non modifiés.

Le pouvoir réducteur d'une substance est fréquemment utilisé pour évaluer sa capacité à donner des électrons. Il existe une corrélation étroite entre l'activité antioxydante et le pouvoir réducteur des polysaccharides (CHEN et *al.*, 2014; HEFNAWY et EL-SHOUBAGY, 2014). Les propriétés réductrices des polysaccharides sont généralement associées à la présence de réductones, qui exercent leur action antioxydante en inhibant la réaction en chaîne des radicaux libres par réduction (CHUNG et *al.*, 2002; CHEN et *al.*, 2012; HEFNAWY et EL-SHOUBAGY, 2014). Le terme réductone fait référence à un composé comprenant une structure énediol $-(\text{HO})\text{C}=\text{C}(\text{OH})-$ adjacente au groupe carbonyle $\text{C}=\text{O}$ (GOGET et DECONINCK, 2011). Les réductones agissent également en empêchant la formation de peroxydes et en réagissant avec leurs précurseurs (LIU et *al.*, 2011). Nos données montrent que le pouvoir réducteur de la fraction FSM joue probablement un rôle dans la capacité antioxydante obtenue. Ceci suggère que la FSM pourrait contenir des réductones formées sous l'effet du chauffage lors de leur extraction à partir du RIA. Les

groupement hydroxydes des polysaccharides peuvent également agir comme donneurs d'électrons et peuvent ainsi réagir avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables et ainsi mettre fin à la réaction radicalaire en chaîne.

2.3.3 Activités antioxydantes des composés phénoliques

2.3.3.1 Pouvoir réducteur et activités antiradicalaires

Plusieurs tests antioxydants (pouvoir réducteur, test H₂O₂ et test DPPH) ont été appliqués dans l'objectif d'évaluer l'activité antioxydante des CPO de la variété *chamlal*. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux issus de tests réalisés avec des acides phénoliques qui existent naturellement dans la pulpe d'olive et à la vit C utilisée comme antioxydant de référence (Figure 56 et Tableau XXXIII).

Les résultats obtenus pour le pouvoir réducteur (Figure 56a) montrent que tous les composés ont une capacité réductrice qui augmente de façon proportionnelle avec la concentration. Les résultats indiquent également que les CP (acides phénoliques testés individuellement) et les CPO présentent un pouvoir réducteur plus élevé que celui de la vit C. Les PR_{0,5AU} des différentes substances testées sont significativement différents ($p < 0,001$). L'AG étant le CP qui présente le pouvoir réducteur le plus élevé avec un PR_{0,5AU} de $7,65 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$, suivi par l'AC et l'acide tannique (AT). Les CPO ont un PR_{0,5AU} de $50,55 \pm 3,33 \mu\text{g/mL}$ plus élevé que celui de la vit C. D'autres travaux ont été effectués sur le pouvoir réducteur des CPO des olives et confirment les résultats obtenus dans notre étude sur la variété *chamlal*. En effet, la réduction du fer par les CPO de la variété *alcaparras* présentent un PR_{0,5AU} de $360 \mu\text{g/mL}$ (SOUSA et al., 2008). L'activité antioxydante des CPO dépend principalement du profil phénolique qui varie en fonction de la variété d'olive. Des recherches sur environ six cultivars d'oliviers iraniens ont données des pouvoirs réducteurs, exprimées en équivalent g de vitamine E/100 g d'échantillon, situés entre 8,6 et 2,4 (HAJIMAHMOODI et al., 2008). A partir de ces résultats, les CPO peuvent être qualifiés de donneurs d'électrons capables de neutraliser les radicaux libres.

La mesure de l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène est l'une des méthodes utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante et surtout de la capacité des antioxydants à diminuer le taux des pro-oxydants tels que H₂O₂ (PAZDZIOCH-CZOCHRA et WIDENSKA, 2002). Les résultats obtenus (Figure 56b) avec ce test sont significativement différents ($p < 0,001$) et montrent une corrélation entre la concentration et l'activité de piégeage de l'H₂O₂ par les diverses substances testées sauf pour l'AC. En effet, pour ce composé, une importante activité anti-H₂O₂ est apparue à une concentration de $100 \mu\text{g/mL}$ et aucune

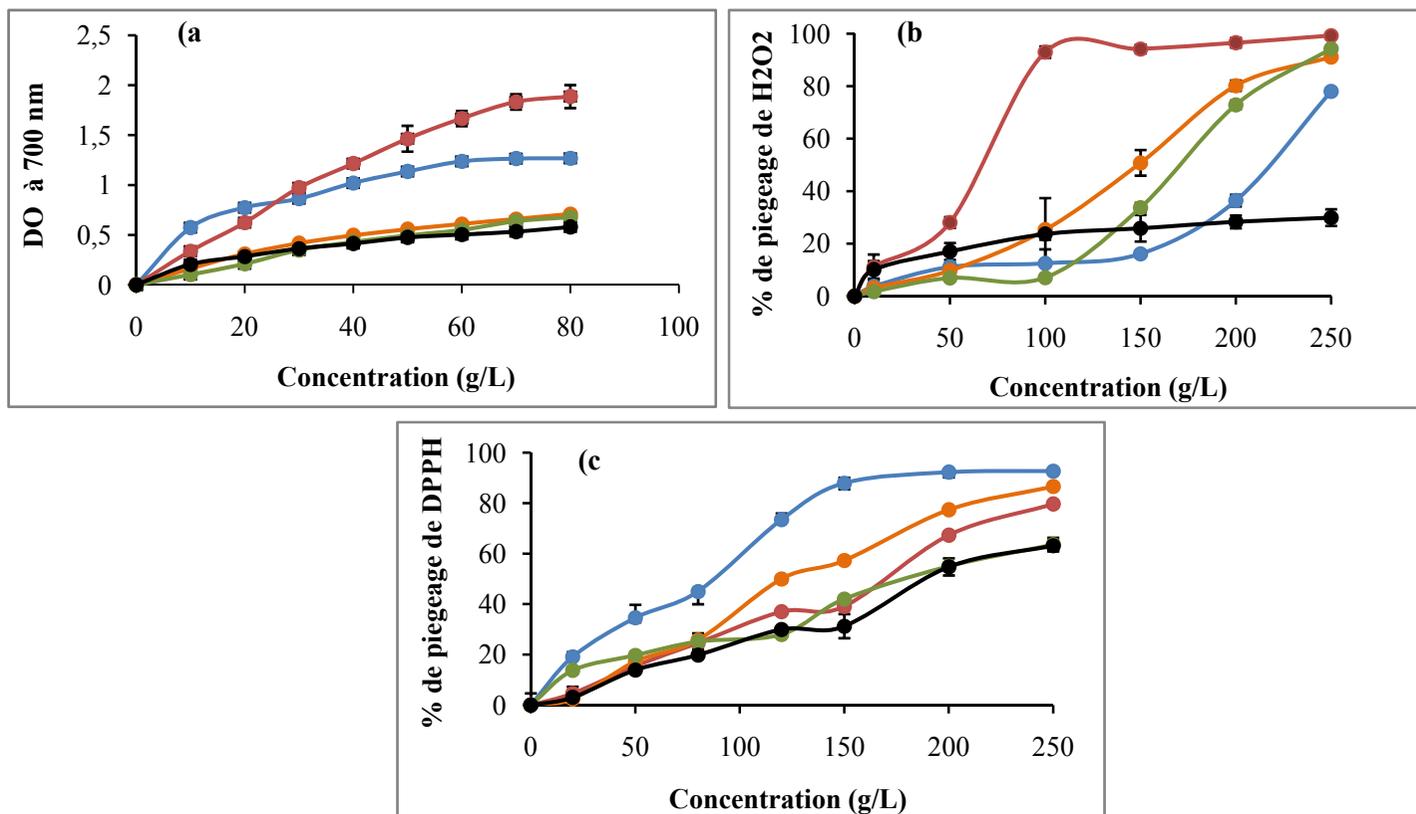


Figure 56 : Activités antioxydantes des composés phénoliques testés. (a) pouvoir réducteur ; (b) Piégeage de H₂O₂ et (c) Piégeage du radical DPPH. (●-●) : AG ; (●-●) : AC ; (●-●) : AT ; (●-●) : CPO ; (●-●) : vit C.

Tableau XXXIII : Activités antioxydantes des substances testées.

Tests antioxydants	IC ₅₀ ou PR _{0,5AU} (µg/mL)				
	AG	AC	AT	CPO	vit C
Pouvoir réducteur	7,65 ± 0,43	15,72 ± 0,40	41,71 ± 2,61	50,55 ± 3,33	57,94 ± 4,44
Test H ₂ O ₂	213,55 ± 4,52	63 ± 0,70	143,74 ± 11,60	169 ± 0,75	□250
Test DPPH	82,14 ± 11,93	165,62 ± 4,41	116,05 ± 4,77	175,5 ± 14,50	183 ± 35,51

évolution réelle n'a été observée pour des concentrations plus élevées. A des concentrations de 150, 200, et 250 µg/mL, les CPO sont plus actifs que la vit C et l'AG. Par ailleurs, le pourcentage de piégeage de l'H₂O₂ par les CPO est équivalent à celui de l'AT pour les concentrations de 200 et 250 µg/mL. D'après les valeurs des IC₅₀ données par le tableau XXXIII, les CPO montrent un pouvoir de piégeage de H₂O₂ nettement supérieur à celui de la vit C. L'AC est le CP le plus actif avec une IC₅₀ de 63 ± 0,70 µg/mL. Plusieurs études ont démontré que l'activité de piégeage de H₂O₂ augmente avec la concentration en CP (WANG et al., 2008). L'activité de neutralisation du peroxyde d'hydrogène par les CP est attribuée à leur capacité à donner des électrons.

Les résultats obtenus dans notre étude avec le test de piégeage du radical stable DPPH sont donnés par la figure 56c et révèlent une proportionnalité entre la concentration de la substance testée et son effet antioxydant. L'AG apparaît comme l'antioxydant le plus efficace dans le piégeage du radical DPPH avec une IC₅₀ de 82,14 ± 11,93 µg/mL. Ce test révèle également que les CPO sont dotés d'une capacité antiradicalaire plus importante que celle de la vit C due à leur capacité à céder des électrons (EBRAHIMZADEH et al., 2008). D'autres travaux ont déjà décrit la capacité des CP de l'olive ou de ses dérivés à piéger plusieurs espèces radicalaires. Ainsi, BOSKOU et al. (2006), ont examiné l'activité de piégeage de 5 extraits d'olives de table, et ont constaté que l'activité de piégeage dépend non seulement du contenu phénolique total des différentes variétés mais aussi du type de CP. Ils ont constaté que l'extrait phénolique de la variété *Thrubes Crete* présente l'activité de piégeage la plus faible (IC₅₀ = 587 µg/mL), en dépit de son contenu élevé en CP totaux. Ce résultat s'explique par le faible pourcentage d'hydroxytyrosol et de tyrosol produit par cette espèce. En effet SAIJA et al. (1998) ont rapporté que l'oleuropeine, et l'hydroxytyrosol avaient une bonne capacité de piégeage dose dépendante.

Les olives sont une source d'antioxydants phénoliques incluant l'oleuropeine, ligstroside et le verbascoside (RYAN et ROBARD, 1998 ; RYAN et al., 1999). Le pouvoir

réducteur et les activités antiradicalaires exercés par les CPO pourraient être expliqués par sa richesse en ces CP. Le degré de maturation des olives est un facteur qui pourrait influencer leur potentiel antioxydant. Durant la maturation des changements se produisent au niveau de la composition du fruit en CP. Ainsi la teneur en oleuropeine diminue alors que celle du tyrosol et de l'hydroxytyrosol augmentent (SALVADOR *et al.*, 2001). Ce phénomène peut avoir un effet direct sur l'activité antioxydante (FERREIRA *et al.*, 2007). SOUSA *et al.* (2008), ont également montré que l'activité antioxydante de l'extrait phénolique des olives de table variété *alcaparras* (pouvoir réducteur et piégeage des RL), dépend de la méthode d'extraction utilisée et donc du rendement en CP. De plus, le type de solvant utilisé pour l'extraction des CP et sa polarité peuvent affecter le transfert d'électrons dans le milieu réactionnel (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2008).

2.3.3.2 Etude sur les érythrocytes humains

2.3.3.2.1 Test d'hémolyse

Les érythrocytes constituent un bon modèle cellulaire pour évaluer les effets des ERO et des antioxydants (BUKOWSKA *et al.*, 2007) de part leur richesse en fer ainsi qu'en acides gras polyinsaturés. Ce type cellulaire fait partie des cellules les plus exposées à l'O₂ et donc au risque d'oxydation.

Le peroxyde d'hydrogène est fréquemment utilisé pour déclencher la formation de radicaux libres (RL) dans les globules rouges (TEDESCO *et al.*, 2001 ; SHIVA SHANKAR REDDY *et al.*, 2007) du fait de sa capacité à franchir facilement les membranes cellulaires (HALLIWELL, 2006).

➤ L'action du peroxyde d'hydrogène sur la fragilité osmotique

L'effet du peroxyde d'hydrogène sur la fragilité osmotique des érythrocytes a été déterminé à différentes concentrations (0 ; 1 ; 5 et 10 mM). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XXXIV. On constate que la fragilité osmotique augmente avec l'augmentation de la concentration en H₂O₂. Un pourcentage d'hémolyse de 49,00 ± 0,21% a été obtenu en absence de H₂O₂ en présence d'une concentration physiologique de NaCl de 0,9% (m/v). Ce pourcentage a été attribué à l'âge des érythrocytes utilisés (ARAKI *et al.*, 1980). Les résultats du tableau XXXIV révèlent que le taux d'hémolyse augmente avec l'augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène. Ainsi, le pourcentage d'hémolyse est passé de 50,90 ± 0,42% à 78,28 ± 17,02% en présence de respectivement 1 et 10 mM de H₂O₂ ; ceci pour une concentration en NaCl de 0,9%. Il ressort de ces résultats que la fragilité osmotique augmente avec l'augmentation du stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène. D'autres travaux

Tableau XXXIV : Pourcentages d'hémolyse obtenus en présence de différentes concentrations d'H₂O₂ et de NaCl.

H ₂ O ₂ (mM)	Concentration en NaCl (%)		
	0,1	0,4	0,9
0	83,89 ± 0,52	72,00 ± 0,75	49,00 ± 0,21
1	89,80 ± 3,62	79,47 ± 10,25	50,90 ± 0,42
5	95,00 ± 0,45	79,61 ± 3,09	51,14 ± 1,45
10	99,80 ± 1,35	88,42 ± 7,11	78,28 ± 17,02

tels que ceux réalisés par SHIVA SHANKAR REDDY *et al.* (2007), ont également démontré que des concentrations croissantes en H₂O₂ augmentent la fragilité osmotique des globules rouges. Ce phénomène a été expliqué par la réduction de la fluidité membranaire et donc des capacités des érythrocytes à résister aux changements osmotiques.

➤ **Inhibition de l'hémolyse**

Les mécanismes conduisant, dans des conditions de stress oxydant, à l'hémolyse ont été largement étudiés. Des modifications de la morphologie cellulaire, de l'hémoglobine et donc de la fonction des globules rouges ont été décrits après expositions aux conditions de stress oxydant. SINGH et RAJINI (2008), ont analysé par micrographie électronique l'aspect d'érythrocytes traités par H₂O₂. La cellule non traitée apparaît sous forme normale de discocyte alors que l'exposition à H₂O₂ conduit à la formation d'échinocytes (Annexe 5). La même constatation est faite par AJILA et PRASADA RAO, (2008). Selon ces auteurs, le stress oxydant mène à la formation d'échinocytes en raison de dommages membranaires qui mènent à des changements de morphologie du globule rouge et de son fonctionnement. Ces altérations morphologiques n'ont pas été observées en incubant les érythrocytes en présence de CP (LINDERKAMP *et al.*, 1997).

Des investigations plus étendues ont démontré le rôle principal du stress oxydant dans la libération du fer de l'hémoglobine sous une forme réactive. Ceci conduit à des dommages de protéines et de lipides membranaires par l'intermédiaire de la réaction de Fenton qui produit le radical hydroxyle conduisant à l'hémolyse des globules rouges (RODRIGUEZ, DI PIERRO *et al.*, 2006 ; CICCOLI *et al.*, 2008). DAS *et al.* (1992) ont rapporté que H₂O₂ convertit l'oxyhémoglobine en méthémoglobine, et que O₂^{•-} et/ou H₂O₂ agissent sur la méthémoglobine pour libérer des ions Fe³⁺ issus de l'hème. Fe³⁺ peut alors être réduit en Fe²⁺

par $O_2^{\cdot -}$, qui peut catalyser la formation de OH^{\cdot} par l'intermédiaire de la réaction de Fenton. Cependant, selon GUITTON et *al.* (1998), le radical OH^{\cdot} peut être formé par réaction de la porphyrine de l'hémoglobine avec l' H_2O_2 directement. D'après CICCOLI et *al.* (2008), si l'ion Fe^{2+} est oxydé en ion Fe^{3+} comme dans la méthémoglobine, la structure perd sa symétrie plane et le fer est éloigné du centre du plan. Par conséquent la liaison du fer à l'azote est moins stable. Une telle diminution dans la stabilité de liaison a pu expliquer la libération du fer lors de la formation de méthémoglobine. TEDESCO et *al.* (2001) ont détecté une augmentation remarquable du contenu en méthémoglobine des érythrocytes stressés par l' H_2O_2 (100 μM) et ont montré le rôle des anthocyanines dans la protection contre cette modification oxydative de l'hémoglobine. Ils ont mesuré également la formation des ERO dans les hématies après traitement avec H_2O_2 en présence d'azide de sodium.

Les résultats obtenus montrent que plus la concentration en H_2O_2 mise en présence des érythrocytes augmente, plus est élevé le pourcentage d'hémolyse (Figure 57). La concentration de 5 mM d' H_2O_2 conduit à un taux d'hémolyse important de $91,87 \pm 6,81\%$, (Figure 57). Le suivi de l'hémolyse en fonction du temps a mis en évidence qu'un temps d'incubation de 3 h permet d'avoir un taux d'hémolyse de 82% (Figure 58). Ce système pro-oxydant a été utilisé pour l'évaluation de l'effet anti-hémolytique des différents CP et de la vit C utilisée comme témoin positif.

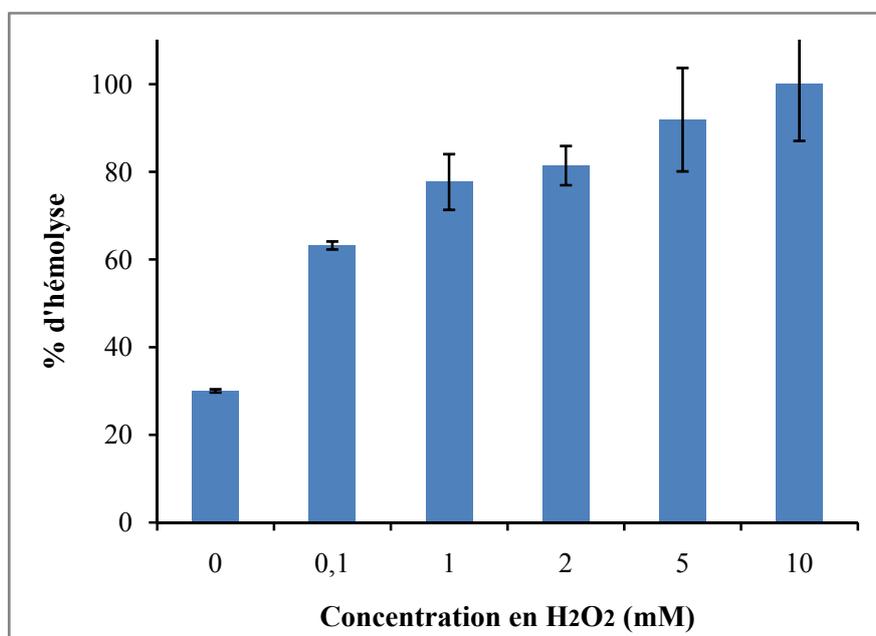


Figure 57 : Effet de différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène sur l'induction de l'hémolyse d'une suspension d'érythrocytes (5%, v/v).

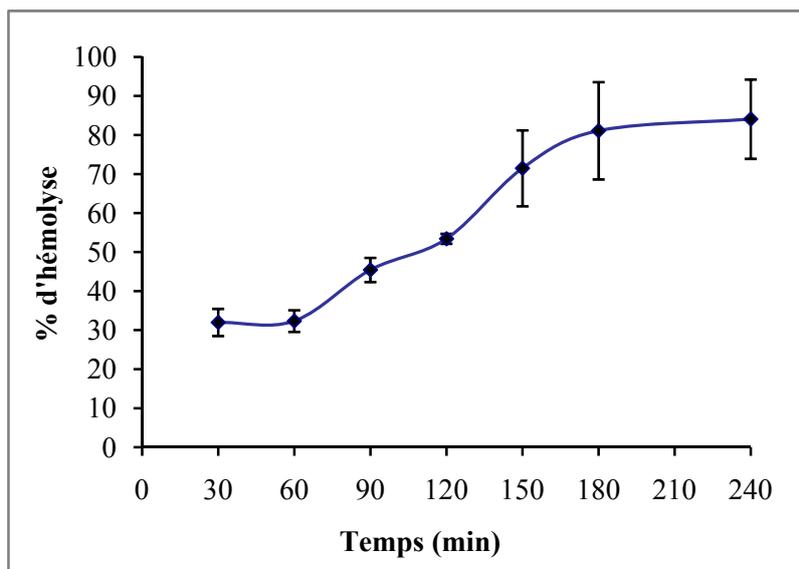


Figure 58 : Pourcentage d'hémolyse d'une suspension d'érythrocytes (5%, v/v) en présence de H₂O₂ (5mM) et en fonction du temps.

Les résultats obtenus sur l'effet anti-hémolytique des composés testés sont présentés par la figure 59.

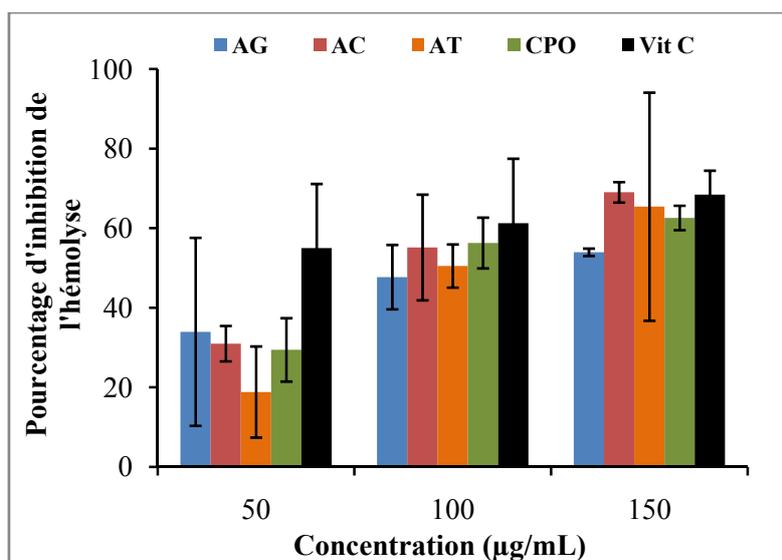


Figure 59 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse d'une suspension d'érythrocytes (5%, v/v) par les différentes substances testées (AG, AC, AT, CPO et vit C).

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse augmente avec la concentration des composés testés. L'extrait CPO a montré une inhibition de l'hémolyse de $29,42 \pm 7,96\%$, de $56,27 \pm 6,37\%$ et de $62,58 \pm 3,07\%$ aux concentrations respectives de 50, 100 et 150 µg/mL. La vit C montre l'activité anti-hémolytique la plus importante avec une IC₅₀ de $40,3 \pm 6,97$ µg/mL, suivie par l'AG (IC₅₀ de 75 ± 25 µg/mL) et l'AC (IC₅₀ de $78,94 \pm 5,26$ µg/mL). Quant au

CPO, ils présentent également une activité anti-hémolytique assez importante avec une IC_{50} de $86,83 \pm 5,26 \mu\text{g/mL}$. Enfin l'AT présente une activité légèrement inférieure aux autres CP avec une IC_{50} de $90,53 \pm 6,75 \mu\text{g/mL}$.

L'effet anti-hémolytique des CP de l'olive a été étudié par plusieurs auteurs. Ainsi, PAIVA-MARTINS et *al.* (2009), ont caractérisé la capacité de certains CP de l'huile d'olive à protéger les globules rouges humains des dommages oxydatifs induits par les radicaux peroxydes. Les résultats ont montré que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol protègent les érythrocytes contre l'hémolyse à de faibles concentrations (20-40 μM). L'effet protecteur de l'hydroxytyrosol contre l'hémolyse a également été déjà mis en évidence par MANNA et *al.*, (1999). Enfin, ALDINI et *al.* (2006), ont examiné le rôle protecteur d'un extrait alcoolique de résidus issus d'olives de la variété *Coratina* et d'un extrait purifié qualifié d'Oleselect, sur l'hémolyse de globules rouges de rat induite par l'hydroperoxyde de cuivre. L'extrait hydroalcoolique a présenté une IC_{50} de $1,7 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ et Oleselect une IC_{50} de $0,38 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$. Nos résultats concordent avec ceux décrits par la littérature quant à l'activité protectrice des CPO contre l'hémolyse induite dans des conditions de stress oxydant. Les CP impliqués seraient très probablement l'oleuropeine ainsi que les autres composés o-diphénoliques tels que le verbascoside et le ligstroside. Les acides phénoliques, à l'exemple de l'AG et de l'AC, contribuent également, à cette activité, comme démontré dans notre étude.

A partir des travaux réalisés il est possible de suggérer que l'effet anti-hémolytique des CP testés dont les CPO, est du à la prévention de la formation de la méthémoglobine, suite au piégeage du peroxyde d'hydrogène. Ce phénomène empêche ou diminue la formation du radical hydroxyle et donc prévient les dommages oxydatifs des constituants membranaires empêchant ainsi l'induction de l'hémolyse. Un autre mécanisme de protection possible serait le piégeage des radicaux hydroxyles formés et une action chélatrice des métaux de ces molécules.

VERSTRAETEN et *al.* (2003) ont rapporté que les flavanols et les procyanidines interagissent avec les groupements polaires des phospholipides membranaires par des liaisons hydrogènes et s'accumulent ainsi à la surface membranaire. Ce mécanisme réduit l'accès des molécules radicalaires à la bicouche lipidique. Un autre mode d'action des CP est la stabilisation de la membrane via une diminution de sa fluidité (ARORA et *al.*, 2000) qui bloque la diffusion de H_2O_2 et par conséquent limite ses dommages. Ces mêmes mécanismes pourraient également être à l'origine de l'effet anti-hémolytique des CPO.

L'activité anti-hémolytique importante de la vit C peut s'expliquer par sa capacité à régénérer les α -tocophérols en réduisant les radicaux α -tocopheryles de la surface membranaire (CAZZOLA *et al.*, 2003).

2.3.3.2.2 Mesure de la résistance à la peroxydation lipidique

Un système pro-oxydant $H_2O_2/FeSO_4$ induisant l'oxydation des lipides membranaires érythrocytaires est recherché. Le système H_2O_2 (900 mM)/ $FeSO_4$ (1 mM) est le plus efficace pour induire la peroxydation des lipides puisque une plus grande concentration en malondialdéhyde (MDA) est produite dans ces conditions (Figure 60)

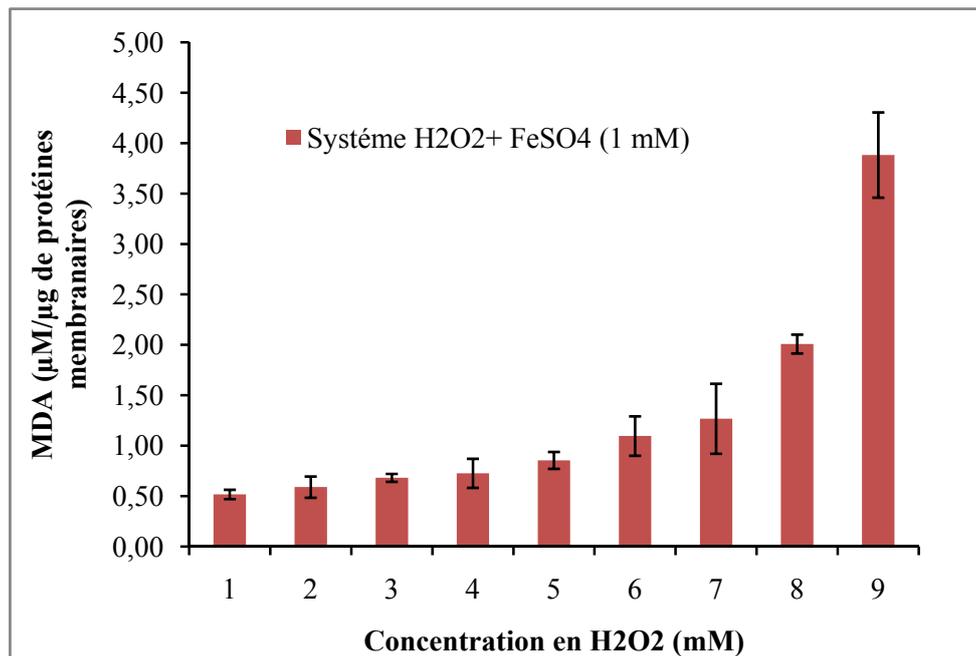


Figure 60 : Formation du MDA sous l'effet du système d'oxydation $H_2O_2/FeSO_4$, sur les membranes érythrocytaires.

La quantité de MDA formée au cours du temps, sous l'action du système oxydant choisi (H_2O_2 (900 mM)/ $FeSO_4$ (1 mM)), a été déterminée (Figure 61). Le temps d'incubation choisi pour l'utilisation de ce système pro-oxydant est de 4 heures. Cette durée correspond au temps au bout duquel une quantité importante de MDA ($4,3 \pm 0,3 \mu M/mg$ de protéines membranaires) est formée.

Les radicaux hydroxyles sont connus pour leur effet oxydatif sur les lipides (principalement les phospholipides) par peroxydation lipidique (ALLIWELL, 1991). La génération des MDA touche aux propriétés mécaniques intrinsèques de la membrane et conduit à la diminution de la fluidité membranaire (RODRIGUEZ, DI PIERRO *et al.*, 2006). Ceci compromet la déformabilité des érythrocytes ce qui rend difficile le transfert de

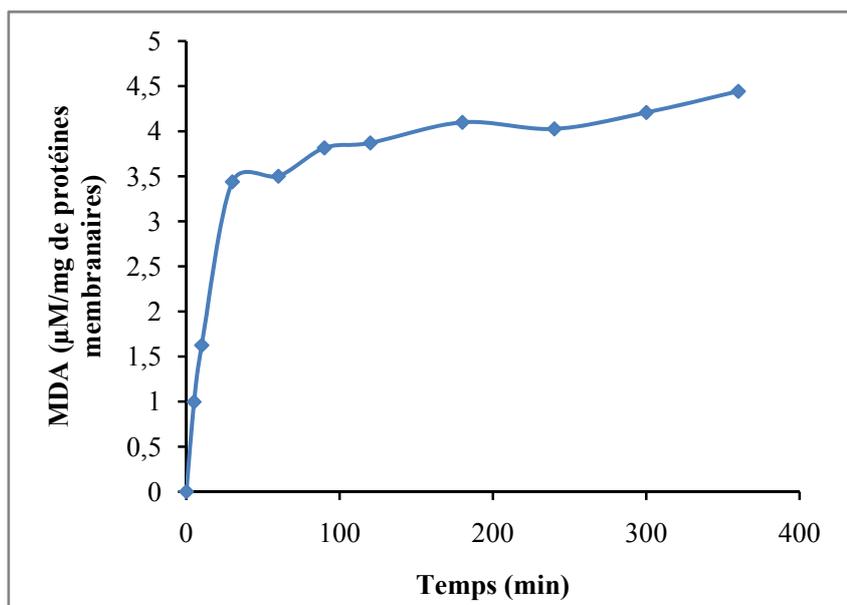


Figure 61 : MDA formé sur les membranes érythrocytaires en fonction du temps sous l'effet du système pro-oxydant H₂O₂ (900mM) /FeSO₄ (1mM).

l'oxygène aux tissus et augmente l'hémolyse (PFAFFEROTT et *al.*, 1982 ; RODRIGUEZ, DI PIERRO et *al.*, 2006). Le MDA peut également causer un attachement de l'hémoglobine aux protéines membranaires squelettiques (SHARMA et PREMACHANDRA, 1991) ce qui augmente par la suite la rigidité de la membrane et donc la perte de la déformabilité. La conséquence de ce phénomène est une altération de la fonction érythrocytaire.

L'effet des différentes substances à tester sur la peroxydation lipidique a été déterminé après incubation des protéines membranaires érythrocytaires (1 mg/mL) dans les conditions de stress oxydant déjà définies ((H₂O₂ (900 mM) /FeSO₄ (1 mM), incubation pendant 4h) (Figure 62). Une relation de proportionnalité entre le pourcentage de l'inhibition de la peroxydation lipidique et la concentration des CP testés a été obtenue.

L'extrait CPO présente l'activité la plus importante avec une IC₅₀ de 49,27 ± 1,91 µg/mL, suivi par l'AC (IC₅₀ = 69,22 ± 4,0 µg/mL) et l'AT (IC₅₀ = 217,64 ± 15,68 µg/mL). L'AG présente l'effet protecteur le plus faible avec une IC₅₀ supérieure à 250 µg/mL. Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec d'autres modèles de peroxydation lipidique tels que les LDL humains (FRANCONI et *al.*, 2006), les liposomes phospholipidiques de soja (PAIVA-MARTINS et *al.*, 2003), et les vésicules unilamellaires (SAIJA et *al.*, 1998) en utilisant les CP de l'olive ou de ses dérivés. Ces travaux ont montré que la réduction de la génération des produits de la peroxydation lipidique est liée au contenu phénolique et que les CP de l'olive sont plus efficaces que d'autres antioxydants comme l'α-tocophérol et le Trolox.

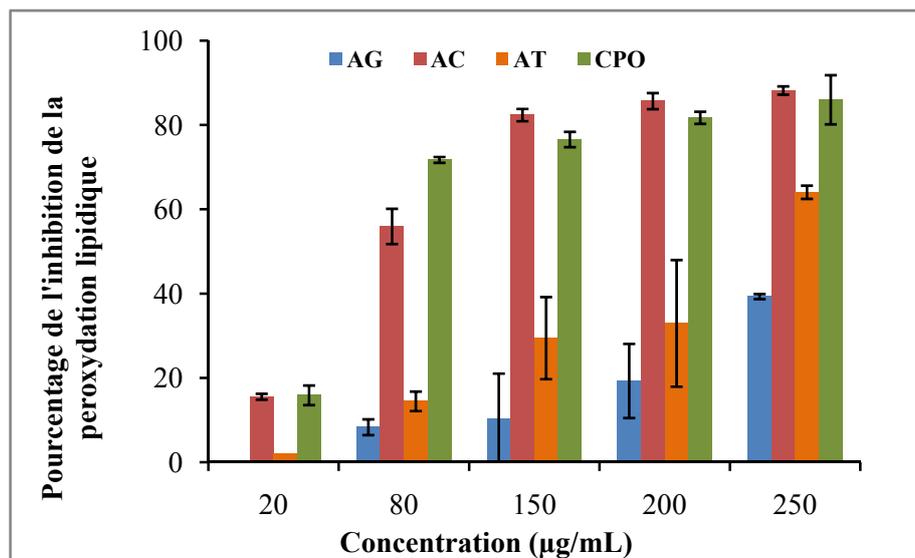


Figure 62 : Inhibition de la peroxydation lipidique (%) des membranes érythrocytaires (1 mg/mL) par les différents composés phénoliques testés (AG, AC, AT et CPO).

L'oleuropéine et ses dérivés représentent l'une des principales classes de CPO responsables de l'activité antioxydante des olives et de l'huile d'olive (FRANCONI *et al.*, 2006 ; SAIJA *et al.*, 1998). L'activité antioxydante des CPO peut être attribuée également aux flavonoïdes tels que la lutéoline et son aglycone (VISIOLI *et al.*, 1995). Les CP et CPO testés pourrait donner un électron ou un atome d'hydrogène au radical lipidique formé au cours de la phase de propagation de l'oxydation des lipides et stabiliser le radical phénoxyne résultant par la délocalisation de l'électron désapparié (ROGINSKY et LISSI, 2005).

Des études par fluorescence réalisées par PAIVA-MARTINS *et al.* (2003) ont montré que certains CP de l'huile d'olive dont l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol ne pénètrent pas dans la bicouche phospholipidique du liposome en raison de leurs propriétés hydrophiles. L'action des CP à la surface de la membrane permettrait un retardement efficace de la peroxydation lipidique lancée par les radicaux libres de la phase aqueuse. En outre, il a été rapporté que les CP exercent leurs capacités antioxydantes dans l'huile d'olive par le piégeage de radicaux peroxydes et alkoxydes, et par chélation des métaux de transition (VISIOLI *et al.*, 1998 ; ROGINSKY et LISSI, 2005).

Tous ces résultats issus de la littérature concordent avec ceux de cette étude et indiquent que les CPO présentent des effets protecteurs contre la peroxydation lipidique. Il peut être suggéré que dans le système pro-oxydant utilisé, les CPO préviennent l'oxydation des lipides membranaires en piégeant l' H_2O_2 et en chélatant le fer empêchant de cette manière

la production du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Les CPO pourraient également agir comme antioxydants primaires en inhibant l'étape d'initiation et de propagation de la peroxydation lipidique (piégeage de radicaux alkyles L^{\cdot} et peroxydes LOO^{\cdot}) et/ou en tant qu'antioxydants secondaires en retardant ou en diminuant le taux d'oxydation via la chélation des ions métalliques de transition (AMES *et al.*, 1993).

D'autre part, les résultats obtenus indiquent que la vit C, contrairement aux CP, montre un pouvoir pro-oxydant et accroît la peroxydation lipidique. La figure 63 montre l'augmentation de la quantité en MDA en présence de concentrations croissantes en vit C.

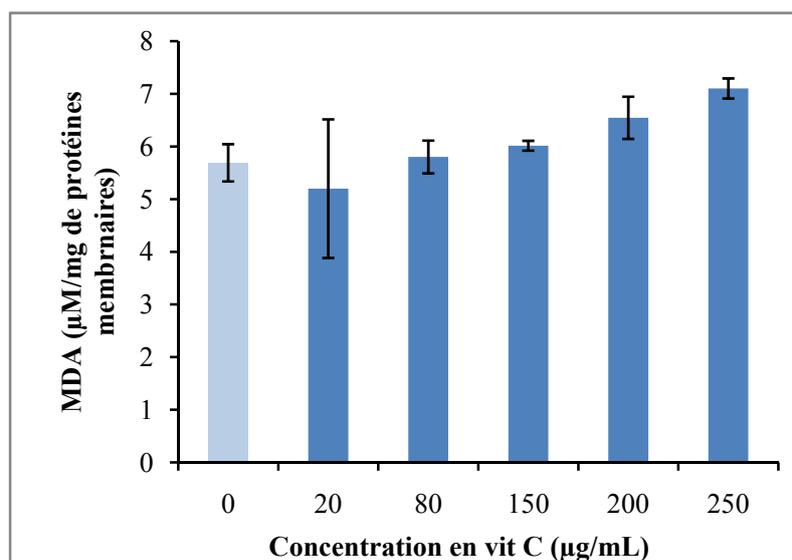


Figure 63 : Effet pro-oxydant de la vit C sur la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1 mg/mL) induite par le système $H_2O_2/FeSO_4$ (900 mM/1 mM).

Le rôle pro-oxydant de la vit C en présence du fer a également été rapporté par DEUTSCH (1998) et YEN *et al.* (2002). Selon YEN *et al.* (2002), cet effet pro-oxydant est dû au pouvoir réducteur de la vit C qui transforme le Fe^{3+} en Fe^{2+} stimulant ainsi la formation de HO^{\cdot} par la réaction de Fenton. Cependant, BISWAS *et al.* (2005), ont rapporté que la vit C prévient la peroxydation lipidique sur des érythrocytes stressés par la phenylhydrazine *in vitro*. La vit C est un piègeur, de radicaux hydrophiles et empêche également la peroxydation des lipides par le piégeage d'ERO de la phase aqueuse (TERAO *et al.*, 1994). Donc à partir de ces résultats on peut conclure que ce sont les conditions expérimentales utilisées, notamment la richesse du milieu réactionnel en fer qui a été à l'origine de l'effet pro-oxydant de la vit C.

2.3.3.2.3 Evaluation de l'oxydation des protéines membranaires érythrocytaires

➤ Analyse électrophorétique des protéines des membranes érythrocytaires

Les protéines membranaires des érythrocytes ont été séparées par SDS-PAGE et comparées à des marqueurs de MM (Figure 64).

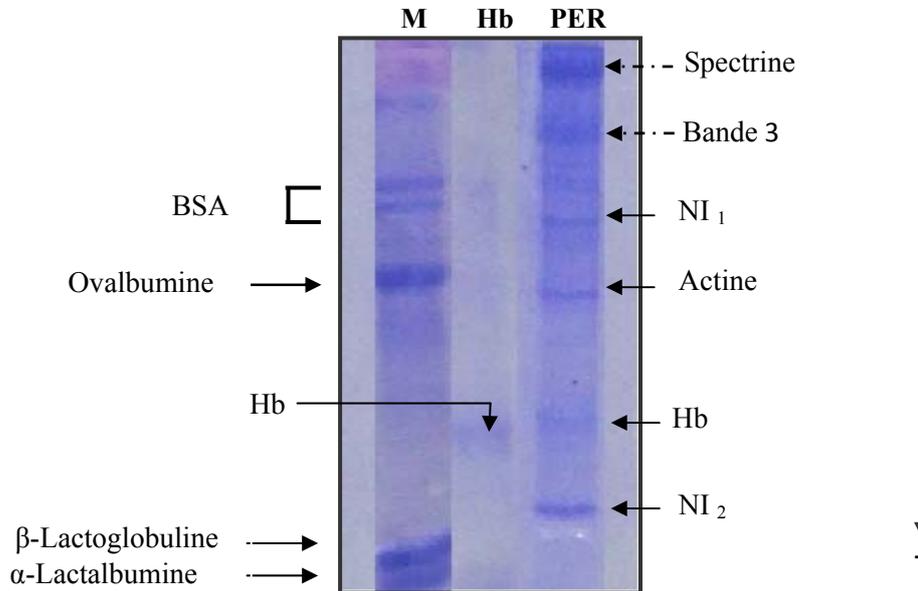


Figure 64 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires. M: protéines marqueurs; Hb: hémoglobine; PER: protéines des membranes érythrocytaires ; NI₁, NI₂ : protéines non identifiées 1 et 2 respectivement.

Le profil obtenu est comparable à celui décrit par la littérature (TANNER et BOXER, 1972 ; GARBARZ *et al.*, 1984). En effet, la séparation des protéines membranaires érythrocytaires montre trois bandes majeures. Dans l'ordre décroissant des MM on identifie la spectrine et la protéine bande 3. La troisième bande n'a pas été identifiée (NI₁). Sa MM a été évaluée à 53640 Da. Par contre la quatrième bande correspond à l'actine avec une MM de 41800 Da (42 kDa). Une bande d'hémoglobine résiduelle a été identifiée. Une dernière bande (NI₂) n'a pas été identifiée. Elle a une MM de 19148,73 Da.

➤ Effet des substances antioxydantes sur les dommages oxydatifs des protéines

Plusieurs auteurs ont souligné la capacité du radical hydroxyle à causer des dommages oxydatifs aux molécules biologiques dont les protéines (JOZWIK *et al.*, 1997, BISWAS *et al.*, 2005). Ainsi, l'effet du système H₂O₂/FeSO₄ générateur de radicaux hydroxyles a été étudié. Les échantillons préparés sont traités par SDS-PAGE afin de séparer les protéines. Les

résultats du stress oxydant par $H_2O_2/FeSO_4$ sur les protéines de la membrane érythrocytaire sont donnés par la figure 65.

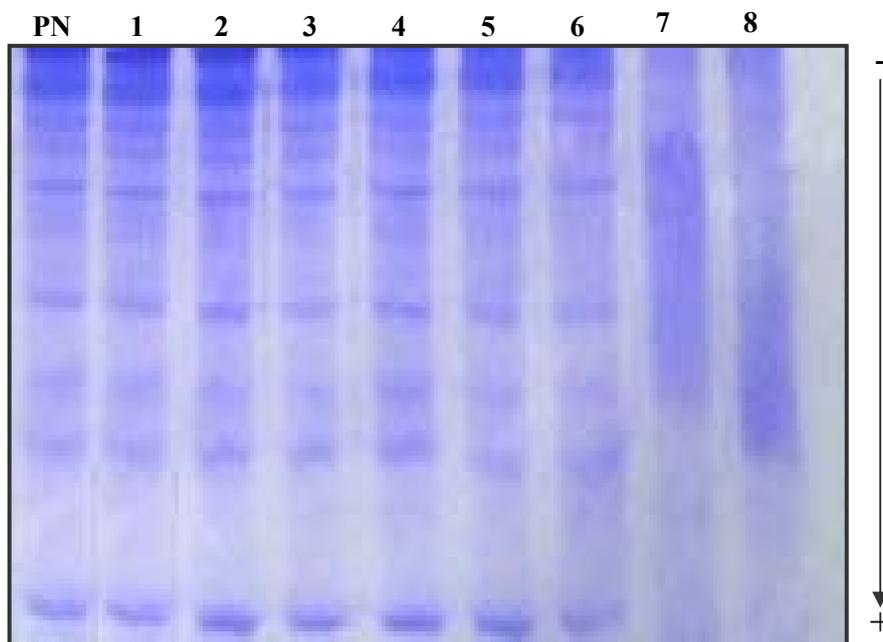


Figure 65 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires après un stress oxydatif induit par le système $H_2O_2/FeSO_4$ à différentes concentrations: 1 : 250 $\mu M/25 \mu M$; 2: 500 $\mu M/30 \mu M$; 3 : 1 mM/50 μM ; 4: 5 mM/250 μM ; 5: 5 mM/1 mM ; 6: 10 mM/10 mM; 7: 50 mM/30 mM; 8: 50 mM/50 mM ; PN: protéines non oxydées.

Le système (7) : H_2O_2 (50 mM)/ $FeSO_4$ (30 mM) a conduit à la disparition de toutes les bandes protéiques probablement par dégradation oxydative. Les fragments peptidiques de très faibles MM issus de cette dégradation sont alors non détectables sur le gel. La cinétique de dégradation a été suivie. Les résultats sont donnés par la figure 66. A partir de ces résultats, on constate qu'au bout d'une heure et 30 min, toutes les protéines sont dégradées. Le choix du temps d'incubation à prendre pour ce test est de 3 h, de manière à s'assurer de la dégradation totale des protéines.

L'effet des différentes substances à tester sur la protection des protéines des membranes érythrocytaires contre le stress oxydant induit par le système H_2O_2 (50 mM)/ $FeSO_4$ (30 mM) a été étudié. Les résultats obtenus par les CPO sont donnés par la figure 67. Comparativement au profil témoin, les CPO protègent contre l'oxydation des protéines, en particulier à la concentration de 1 mg/mL. Cette protection s'explique par la capacité de ces molécules à piéger l' H_2O_2 et les radicaux hydroxyles générés par la réaction de Fenton. De plus, cet effet protecteur peut aussi être expliqué par la réduction indirecte de la production du

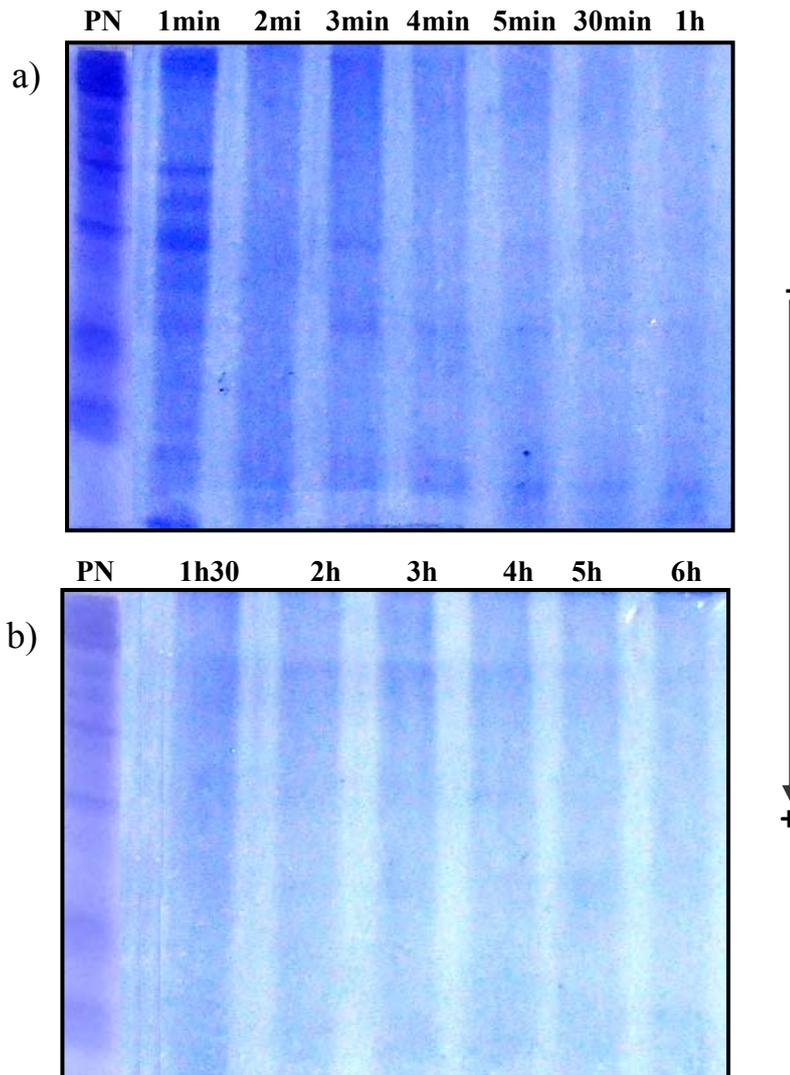


Figure 66 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires à la suite d'un stress oxydatif induit par le système $H_2O_2/FeSO_4$ (50 mM/30 mM) après différents temps d'incubation. PN: Protéine non oxydées.

radical hydroxyle suite à la chélation du fer. Cependant, les concentrations élevées en CPO ont conduit à la disparition des protéines de haut poids moléculaire sur des gels SDS-PAGE et à l'apparition de nouvelles bandes dans la région de faible poids moléculaire, des résultats comparables à ceux obtenus après traitement des érythrocytes avec de l'ascorbate ferreux et du peroxyde d'hydrogène (AJILA et PRASADA RAO, 2008 ; SINGH et RAJINI 2008). Par contre, à des concentrations de 14 à 20 mg/mL les CPO montrent un effet pro-oxydant.

Plusieurs travaux ont rapporté l'effet protecteur des CP contre l'oxydation des protéines de la membrane érythrocytaire. Par exemple, SINGH et RAJINI, (2008) ont constaté que les bandes protéiques sont protégées après traitement avec les CP de la pomme de terre de l'effet du système oxydant fer-ascorbate. Par ailleurs, AJILA et PRASADA RAO, (2008), ont

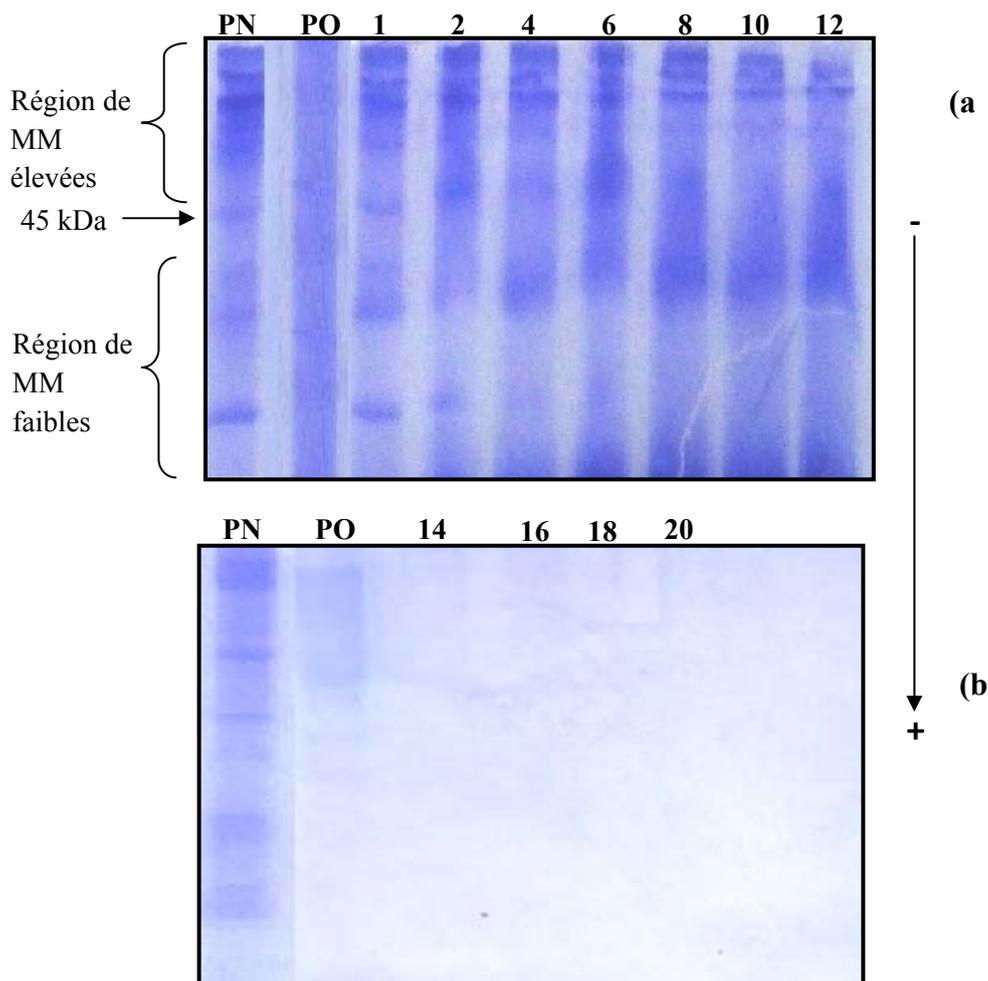


Figure 67 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires après un stress oxydatif induit par le système $H_2O_2/FeSO_4$ (50 mM/30 mM) avec différentes concentrations en CPO a) : 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 mg/mL ; b) : 14, 16, 18, 20 mg/mL ; PN: protéines non oxydées; PO: protéines oxydées.

démonstré l'effet protecteur des CP de la peau de mangue contre le stress oxydant induit par l' H_2O_2 sur les protéines membranaires du globule rouge. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus concernant le rôle protecteur des CPO contre l'oxydation des protéines de la membrane du globule rouge. L'apparition de nouvelles bandes protéiques pourrait être expliquée par l'effet pro-oxydant des CP aux concentrations utilisées et en présence de métaux de transition comme c'est indiqué par KECALI et GORDON, (2002) pour les CP de l'huile d'olive en présence du fer et par CAO et *al.* (1997) pour les flavonoïdes en présence de cuivre. L'apparition de nouvelles bandes pourrait s'expliquer par l'oxydation des protéines et leurs fragmentation, polymérisation et/ou agrégation sous l'effet de stress oxydant (SINGH et RAJINI, 2008 ; PREEDY, 2014).

Il a été rapporté qu'une attaque oxydative par le radical hydroxyle conduit à la réticulation, polymérisation ou à la dégradation des protéines membranaires érythrocytaires (MORZEL *et al.*, 2006 ; ERLETT et STADTMAN, 1997). Les mêmes auteurs ont signalé qu'au sein de la membrane, les protéines peuvent également être oxydées par les produits de la peroxydation lipidique. En outre, l' H_2O_2 , selon SHIVA SHANKAR REDDY *et al.* (2007), pourrait causer une oxydation forte des groupes sulfhydryles (SH) en ponts disulfures responsables des phénomènes d'agrégation des protéines. Dans cette étude, les protéines de MM élevées ne sont pas obtenues, ceci pourrait être expliqué par la formation de ces agrégats protéiques puis leur dégradation sous l'effet des ERO et des peroxydes lipidiques. De plus, dans l'électrophorèse dans les conditions dénaturantes, les ponts disulfures sont réduits et les agrégats formés par ce mécanisme ne peuvent pas être visualisés selon MORZEL *et al.* (2006).

On peut donc conclure que les CPO dans les conditions expérimentales de stress oxydant utilisées, agissent à faibles concentrations comme antioxydants alors qu'ils se comportent comme des pro-oxydants à fortes concentrations.

L'effet obtenu en présence de la vit C est donné par la figure 68. A toutes les concentrations, la vit C n'a pas montré un effet protecteur contre l'oxydation des protéines. De nouvelles bandes dont la MM est située dans la gamme de 40400 à 15453 Da sont apparues. Ce phénomène peut s'expliquer par la fragmentation et/ou la polymérisation des fragments de protéines oxydées du fait de l'effet pro-oxydant de la vit C contrairement à ce qu'il a été signalé par PANDA *et al.* 1999.

Ces résultats confirment que lors de l'exposition des érythrocytes au stress oxydant, les protéines membranaires sont également une cible. A titre d'exemple, il a été rapporté qu'en plus de la peroxydation lipidique, les changements de la conformation de la bande 3 seraient responsables de l'hémolyse accrue induite par les radicaux peroxydes (SATO *et al.*, 1995 ; SHIVA SHANKAR REDDY *et al.*, 2007). Selon SIMAO *et al.* (2006), l'oxydation de la bande 3 induit la formation d'un pore au niveau membranaire ce qui va conduire à l'hémolyse. D'autre part, UYESAKA *et al.* (1992) ont rapporté que les protéines oxydées peuvent être à l'origine de la diminution de la déformabilité des globules rouges et du changement de la charge de leur surface par diminution du taux d'acide sialique. Ce phénomène conduirait à l'agrégation érythrocytaire dans plusieurs cas pathologiques (SANGEETHA *et al.* 2005).

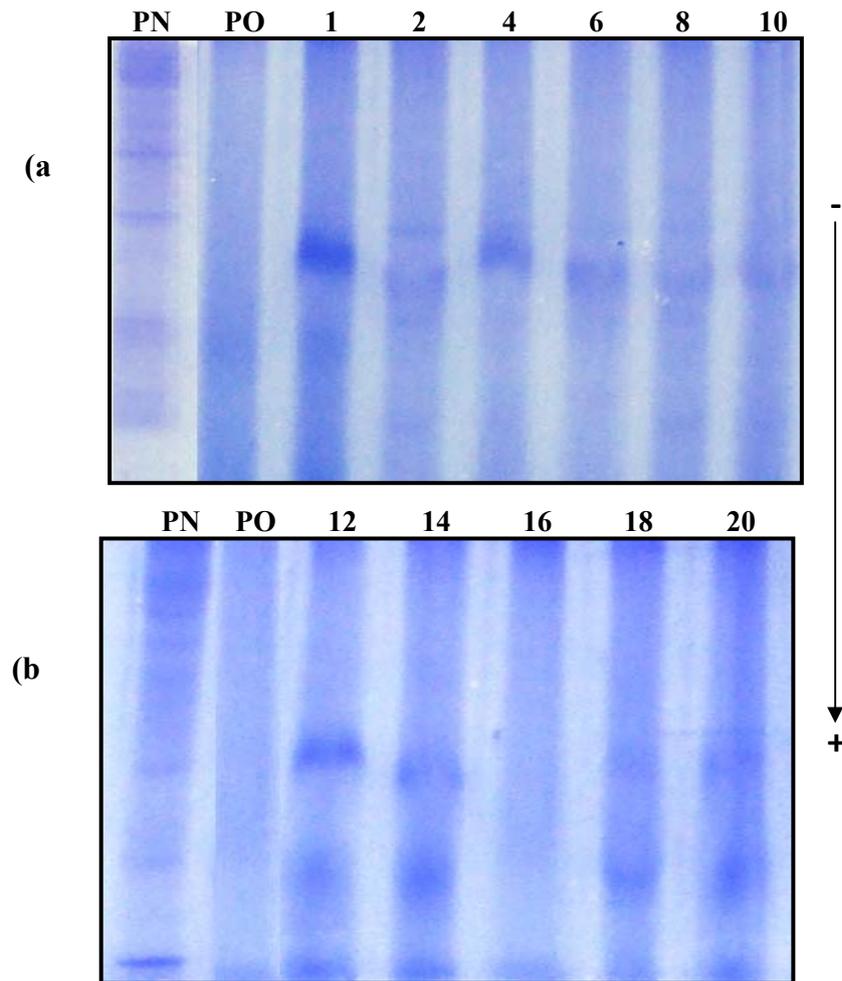


Figure 68 : Electrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines membranaires érythrocytaires suite à un stress oxydatif induit par le système $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$ (50 mM/30 mM) en présence de différentes concentrations de la vit C a) : 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL; b) : 12, 14, 16, 18, 20 mg/mL ; PN : protéines non oxydées; PO : protéines oxydées.

*Conclusion générale et
perspectives*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le verger mondial destiné à la production d'huile d'olive est en pleine expansion et se concentre à plus de 97% dans le bassin méditerranéen où les conditions climatiques sont idéales pour ce type de culture. Les pays producteurs sont confrontés cependant à une augmentation significative des sous-produits issus du procédé d'extraction à savoir les margines et les grignons qui impactent fortement cette activité au niveau environnemental. Le grignon d'olive est constitué de la peau, de la pulpe et du noyau. Les margines correspondent, en plus de l'eau de végétation, à l'eau additionnée durant le processus d'extraction. La valorisation de ces sous-produits comme source de molécules à haute valeur ajoutée a fait l'objet de ce travail de thèse. L'objectif de ce travail était d'extraire, de purifier et de caractériser les polysaccharides et/ou les composés phénoliques des sous-produits oléicoles et de la pulpe d'olive en vue d'étudier leur potentiel comme prébiotiques et antioxydants.

L'extraction des polysaccharides des sous-produits oléicoles a permis leur obtention avec des rendements significatifs. Le rendement en RIA de margines était de 20,51g/100g de MS. Une extraction à l'eau du RIA a conduit à l'obtention de deux fractions qualifiées de fraction soluble (FSM) et de fraction insoluble (FIM) dans le cas des margines. Dans le cas des grignons, des fractions FSG et FIG sont obtenues correspondant respectivement aux fractions soluble et insoluble. Les fractions FSM et FIM ont été obtenues avec des rendements respectifs de 13,33% et 3,69% alors que les fractions FSG et FIG ont été extraites avec des rendements de 3,5% et de 82,5% respectivement.

La caractérisation biochimique des fractions obtenues a montré un contenu élevé en composés glucidiques (25-72,65 g/100 g) en plus d'une présence non négligeable de protéines (0,29-11,80 g/100g) et de composés phénoliques (1,90-3,23 g/100g). La caractérisation de la composition en monosaccharides des différentes fractions polysaccharidiques indique une grande hétérogénéité aussi bien sur le plan qualitatif et quantitatif. A noter que toutes les fractions sont riches en glucose, avec la présence d'autres monosaccharides neutres et acides (Gal, Rha, Ara, Man, Xyl, AGal, AGlc et Fuc).

Ainsi l'étude de la fraction FSM extraite à partir des margines, a montré la présence de constituants de la paroi cellulaire de l'olive tels que les pectines, les hémicellulose et la cellulose, associés à des composés phénoliques et à des protéines. Une déphénolisation de la FSM sous l'action d'hydrolyses alcalines a permis d'extraire une partie des composés phénoliques liés aux polysaccharides soit par des liaisons esters ou éthers. L'acide caféique, et

des dimères ou oligomères d'acide férulique et caféique ont pu être identifiés comme composés phénoliques majoritaires associés à ces polysaccharides.

L'investigation des activités biologiques du RIA et de la FSM a révélé d'importantes activités prébiotiques et antioxydantes. Ainsi, ces extraits ont présenté une activité stimulatrice sur la croissance de deux espèces de lactobacilles (*L. casei* et *L. rhamnosus*) en plus de leur grande résistance à l'hydrolyse par le suc gastrique artificiel. Ces résultats témoignent du potentiel prébiotique de ces extraits. La fraction FSM a montré également de grandes capacités à piéger plusieurs espèces radicalaires telles que le radical hydroxyle et le radical DPPH. À partir de ces résultats, il est possible de conclure que l'extraction des polysaccharides à partir des margines constitue l'une des options de valorisation de cet effluent.

Ce travail a permis également de mettre en évidence les propriétés antioxydantes de l'extrait phénolique de la pulpe d'olive. Les composés phénoliques ont montré des capacités importantes à neutraliser le radical DPPH et l' H_2O_2 ainsi qu'un pouvoir réducteur élevé comparativement à celui de la vitamine C. Sur le modèle cellulaire, les composés phénoliques ont confirmé leur potentiel antioxydant en protégeant les globules rouges contre l'hémolyse et donc contre la mort cellulaire induite par un stress oxydant. L'activité anti-hémolytique des composés phénoliques extraits s'explique par la protection des lipides membranaires contre la peroxydation lipidique ainsi que la protection des protéines contre les dommages oxydatifs.

Ces travaux de thèse ont donc permis de caractériser les extraits polysaccharides des margines. L'étude des activités biologiques de ces composés a montré des activités prébiotique et antioxydante. En outre, les composés phénoliques de la pulpe d'olive ont montré une activité antiradicalaire, réductrice et antioxydante importante aussi bien *in vitro* que sur modèle cellulaire.

Ces résultats peuvent envisager l'utilisation de ces molécules dans le domaine de la santé surtout pour la prévention des maladies liées au stress oxydant, ainsi que dans l'amélioration du bien-être intestinal et d'autres effets bénéfiques sur la santé par leur consommation en tant que molécules prébiotiques. En outre, ces molécules peuvent avoir des applications dans le domaine agroalimentaire en les incorporant dans les aliments. Par leur action antioxydante, ils contribuent à l'amélioration de la durée de vie d'un aliment et de ses propriétés organoleptiques en protégeant ses constituants contre l'oxydation.

Les perspectives de ce travail seraient d'approfondir l'étude structurale des polysaccharides en établissant un protocole, par CPG-SM, permettant de déterminer les liaisons osidiques des polymères polysaccharidiques constituant la FSM ainsi que les autres

fractions polysaccharidiques en utilisant des fractions déphénolisées pour une meilleure réussite des étapes d'acétylation et de méthylation. En outre, il serait intéressant de caractériser qualitativement et quantitativement les composés phénoliques présents dans ces sous-produits par des méthodes chromatographiques telles que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Références

bibliographiques

Références Bibliographiques

- **ABOUGHE-ANGONE S., NGUERNA-ONA E., GHOSH P., LEROUGE P., ISHII T., RAY B. and DRIOUICH A. (2008)**. Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, **343**, 67-72.
- **ACOSTA-ESTRADA B.A, GUTIERREZ-URIBE J.A. and SERNA-SALDIVAR S.O. (2014)**. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.*, **152**, 46–55.
- **ADAPA P.K., KARUNAKARAN C., TABIL L. and SCHOENAU G. (2009)**. Potential applications of infrared and raman spectromicroscopy for agricultural biomass. *Agricultural Engineering International: the CIGRE Journal Manuscript*, **11**, 1-25.
- **AFIDOL (Association Française Interprofessionnelles De l'Olive). (2004)**. Guide du planteur d'oliviers.
- **AFIDOL (Association Française Interprofessionnelles De l'Olive). (2012)**. Le marché de l'huile d'olive : situation et perspectives.
- **AFONSO V., CHAMPY R., MITROVIC D., COLLIN P. et LOMRI A. (2007)**. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev. Rhum.*, **74**, 636–643.
- **AFSSA (2003)**. Alimentation infantile et modification de la flore intestinale. Rapport du groupe de travail.
- **AGUILERA M., QUESADA M.T., GUERRA DEL AGUILA V., MORILLO J.A., RIVADENEYRA M.A., RAMOS-CORMENZANA A. and MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2008)**. Characterisation of Paeni-bacillus jamilae strains that produce exopolysaccharide during growth and detoxification of olive mill wastewaters. *Bioresource Technol.*, **99**, 5640–4.
- **AJILA C.M. and PRASADA RAO U.J.S. (2008)**. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by Mangifera indica L. peel extract. *Food Chem. Tox.*, **46**, 303–309.
- **ALBA-MENDOZA J, RUIZ-GOMEZ A, HIDALGO-CASADO F. (1990)**. Technological evolution of the different processes for olive oil extraction. In: Erickson DR, editor. Edible fats and oils processing: basic principles and modern practices. Champaign, Illinois, USA: *Am Oil Chem. Soc.*, 341–7.
- **ALBA-MENDOZA J, HIDALGO CASADO F., RUÍZ GÓMEZ M.A., MARTINEZ ROMÁN F., MOYANO PÉREZ M.J., CERT-VENTULÁ A., PÉREZ-CAMINO M.C. and RUÍZ-MÉNDEZ M.V. (1996)**. Características de los aceites de oliva de primera y segunda centrifugación. *Grasas Aceites.*, **47**, 163–181. In **APARICIO R. HARWOOD J. (2013)**. Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. 2nd ed. Springer.
- **ALBURQUERQUE J.A., GONZALVEZ J., GARCÍA D. and CEGARRA J. (2004)**. Agrochemical characterization of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technol.*, **91**, 195–200.
- **ALBURQUERQUE J.A., GONZALVEZ J., GARCIA D. and CEGARRA J. (2007)**. Effects of a compost made from the solid by-product (“alperujo”) of the two-phase centrifugation system for olive oil extraction and cotton gin waste on growth and nutrient content of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Bioresource Technol.*, **98**, 940–5.
- **ALDINI G., PICCOLI A., BERETTA G., MORAZZONI P., RIVA A., MARINELLO C. and MAFFEI FACINO R. (2006)**. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia*, **77**, 121–128.
- **ALISSA E.M. (2014)**. Antioxidant and cardiovascular diseases : A summary of the evidence. *JCVd.*, *in press*.

- ALLOUCHE N., FKI I. and SAYADI S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, **52** (2), 267–73.
- ALTIERI R., ESPOSITO A., PARATI F., LOBIANCO A. and PEPI M. (2009). Performance of olive mill solid waste as a constituent of the substrate in commercial cultivation of *Agaricus bisporus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **63**, 993–7.
- ALU'DATT M.H., ALLI I., EREIFEJ K., ALHAMAD M., AL-TAWAHA AR. and RABABAH T. (2010). Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chem.*, **123**, 117–22.
- ALVAREZ-OLMOS M. I. and OBERHELMAN R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.*, **32**, 1567-1576.
- AMES B.N., SHIGENAGA M.K. and HAGEN T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 7915-7922.
- AMIOT M.J., FLEURIET A. and MACHEIX J.J. (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, **28**, 67–9.
- AMRO B., ABURJAI T. and AL-KHALIL S. (2002). Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia*, **73**(6), 456–61.
- ANDERSSON H., ASP N.G, BRUCE A., ROOS S., WADSTROM T. and WOLD A.E. (2001). Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies. *Scand. J. Nutr.*, **45**, 58-75.
- APAK R., GÜÇLÜ K., DEMIRATA B., ÖZYÜREK M., ÇELİK S.E., BEKTASOĞLU B., BERKER K.I. and ÖZYURT D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. *Molecules*, **12**, 1496-1547.
- APARICIO R and HARWOOD J. (2013). Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. 2nd ed. Springer.
- ARAKI K. and RIFKIND J.M. (1980). Age dependent changes in osmotic hemolysis of human erythrocytes. *J. Gerontol.*, **35**(4), 499-505.
- ARAUJO A.J., LABAVITCH J.M. and MORENO A.H. (1994). Changes in the cell wall of olive fruit during processing. *J. Agr. Food Chem.*, **42**, 1194–1199.
- ARDESTANI A. and YAZDANPARAST R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.*, **104**, 21–29.
- ARNOLD J.N., DWEK R.A., RUDD P.M. and SIM R.B. (2006). Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. *Immunol. Lett.*, **106**, 103-110.
- ARORA A., BYREM T.M., NAIR M.G. and STRASBURG G.M. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 102–109.
- ARUOMA O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *JAACS.*, **75**, 199–212.
- ASSAS N., AYED L., MAROUANI L. and HAMDI M. (2002). Decolorization of fresh and stored black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochem.*, **38**, 361–5.
- AVIANI I., LAOR Y., MEDINA S.H., KRASSNOVSKY A. and RAVIV M. (2010). Co-composting of solid and liquid olive mill wastes: Management aspects and the horticultural value of the resulting composts. *Bioresour. Technol.*, **101**, 6699–706.
- AXELSSON L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria* (2nd edition). SALMINEN S. and Von WRIGHT A. New York, Marcel Dekker, 1–72.
- AZIZ A., OUALIA M.S., ELANDALOUSSIA E.H., MENORVAL L.C. and LINDHEIMER M. (2009). Chemically modified olive stone: a low-cost sorbent for heavy metals and basic dyes removal from aqueous solutions. *J. Hazard Mater.*, **163**, 441–7.

- **BACCAR R., BOUZID J., FEKI M. and MONTIEL A. (2009)**. Preparation of activated carbon from Tunisian olive-waste cakes and its application for adsorption of heavy metal ions. *J. Hazard Mater.*, **162**, 1522–9.
- **BACIC A., HARRIS P.J. and STONE B.A. (1988)**. Structure and function of plant cell walls. In **PREISS J.** ed, In *The Biochemistry of Plants: a Comprehensive Treatise*. Vol 14, Carbohydrates. Academic Press, New York, 297–371.
- **BACOT S. (2004)**. Caractérisation d'un nouvel aldéhyde d'origine plaquettaire (4-hydroxydodecadienal) et formation d'adduits de Michael avec les phospholipides à éthanolamine. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France.
- **BARAHONA T., ENCINAS M.V., MANSILLA A., MATSUHIRO B. and ZUÑIGA E.A. (2012)**. A sulfated galactan with antioxidant capacity from the green variant of tetrasporic *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.*, **10**, **347(1)**, 114-20.
- **BARBARO B., TOIETTA G., MAGGIO R., ARCIELLO M., TAROCCHI M., GALLI A. and BALSANO C. (2014)**. Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 18508-18524.
- **BELDMAN G., SCHOLS H.A., PITSON S.M., SEARLE-VAN LEEUWEN M.J.F. and VORAGEN, A.G.J. (1997)**. Arabinans and arabinan degrading enzymes. In: *Advances in macromolecular carbohydrate research*, Vol. 1. R.J. Sturgeon (ed), London: JAI Press, 1-64.
- **BEN SASSI A., OUAZZANI N., WALKER G.M., IBNSOUDA S., EL MZIBRI M. and BOUSSAID A. (2008)**. Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast Isolates. *Biodegradation*, **19**, 337–46.
- **BENITEZ J., BELTRAN-HEREDIA J., TORREGROSA J., ACERO J.L. and CERCAS V. (1997)**. Aerobic degradation of olive mill wastewaters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 185–8.
- **BERARD E. (1997)**. Métabolisme et régulation du monoxyde d'azote : un médiateur de contrôle difficile. *Arch. Pédiatrie*, **4**, 1004-1011.
- **BERGER M.M. (2006)**. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutr. Clin. Métabol.*, **20**, 48–53.
- **BERLETT B.S. and STADTMAN E.R. (1997)**. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **272**, 20313–20316.
- **BIANCO A., BUIARELLI F., CARTONI G., COCCIOLI F., JASIONOWSKA R. and MARGHERITA P. (2003)**. Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters. Part I. *J. Separation Sci.*, **26**, 409–16.
- **BISWAS S., BHATTACHARYYA J. and DUTTA A.G. (2005)**. Oxidant induced injury of erythrocyte-role of green tea leaf and ascorbic acid. *Moll. Cell. Biochem.*, **276**, 205–210.
- **BLAUT M. (2002)**. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur. J. Nutr. I, Suppl.*, **1**, I11–I16.
- **BLUMENKRANTZ N. and ASBOE-HANSEN G. (1973)**. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54(2)**, 484–489.
- BORELLA M. (2006)**. Contrôle de la fonctionnalisation de surface de revêtements obtenus par PECVD à partir d'un composé organosilicié cyclique. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique de la Lorraine en science et ingénierie des matériaux. France.
- **BORJA R., ALBA J., GARRIDO S.E., MARTINEZ L., GARCIA M.P., INCERTI C. and RAMOS CORMEN-ZANA A. (1995)**. Comparative study of anaerobic digestion of olive mill wastewater (OMW) and OMW previously fermented with *Aspergillus terreus*. *Bioprocess Eng.*, **13**, 317–22.
- **BOSKOU G., SALTA F.N., CHRYSOSTOMOU S., MYLONA A., CHIOU A. and ANDRIKOPOULOS N.K. (2006)**. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chem.*, **94**, 558–564.

- **BOTINEAU M. (2010)**. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Editions Tec et Doc., Lavoisier. Paris.
- **BOUAL Z., PIERRE G., DELATTRE C., BENAOUN F., PETIT E., GARDARIN C., MICHAUD P. and DIDI OULD EL HADJ M. (2015)**. Mediterranean semi-arid plant astragalus armatus as source of bioactive galactomannan. *Bioact. Carbohydr. Dietary Fibre*, **5**, 10–18.
- **BOUAYED J. and BOHN T. (2012)**. Dietary Derived Antioxidants: Implications on Health. In: **BOUAYED J., BOHN T. (Eds.)**, Nutrition, Well-Being and Health. *In Tech*. 1-22.
- **BOURDON E. (2004)**. Altérations oxydatives de protéines aux importantes propriétés physiologiques : L'albumine-la protéine de régulation du fer (IRP2), la superoxyde dismutase-le proteasome. Mémoire pour obtenir l'Habilitation à Diriger les Recherches. Université de la Réunion. La Réunion.
- **BRADFORD H.M. (1976)**. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- **BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E. and BERSET C. (1995)**. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **28**, 25–30.
- **BRAVO L., ABIA R. and SAURA-CALIXTO F. (1994)**. Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on *in vivo* and *in vitro* properties. *J. Agr. Food Chem.*, **42(7)**, 1481–1487.
- **BRAVO L. (1998)**. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nut. Rev.*, **56**, 317–33.
- **BRENES M., REJANO L., GARCIA P., SANCHEZ A.H. and GARRIDO A. (1995)**. Biochemical changes in phenolic compounds during spanish-style green olive processing. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2702-2706.
- **BRETT C. and WALDRON K. (1990)**. Physiology and biochemistry of plant cell walls, Boston: Hyman, 255.
- **BRITTA HARBAUM M.SC. (2007)**. Characterization of Free and Cell-Wall-Bound Phenolic Compounds in Chinese Brassica Vegetables. Thèse de Doctorat. Université Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Allemagne.
- **BROWN R.M. (2004)**. Cellulose structure and biosynthesis : What is in store for 21st century? *J. Polym. Sci.*, **42**, 487–495.
- **BRÜGEL W. (1962)**. An introduction to infrared spectroscopy. Methuen, Londres.
- **BUANAFINA M.M.O. (2009)**. Feruloylation in Grasses: Current and Future Perspectives. *Mol. Plant*, **2(5)**, 861–872.
- **BUDINOVA T., PETROV N., RAZVIGOROVA M., PARRA J. and GALIATSATOU P. (2006)**. Removal of arsenic (III) from aqueous solution by activated carbons prepared from solvent extracted olive pulp and olive stones. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **45**, 1896–901.
- **BUEGE J.A. and AUST S.D. (1978)**. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **52**, 302–310.
- **BUKOWSKA B., MICHALOWICZ J. and DUDA W. (2007)**. Alterations in human red blood cell properties induced by 3-(dimethylamino) phenol (*in vitro*). *Toxicol. in Vitro*, **21**, 1574–1580.
- **BULOTTA S., CELANO M., LEPORE S.M., MONTALCINI T., ARTURO PUJIA A. and RUSSO D. (2014)**. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *J. Transl. Med.*, **12**, 219.
- **BUNZEL M., RALPH J. and STEINHART H. (2004)**. Phenolic compounds as cross-links of plant derived polysaccharides. *Czech. J. Food Sci.*, **22**, 64-67.

- **BUNZEL M., RALPH J., BRUNING P. and STEINHART H. (2006)**. Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.*, **54**(17), 6409-6418.
- **BUNZEL M. (2010)**. Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochem. Rev.*, **9**, 47-64.
- **BURR S.J. and FRY S. C. (2009)**. Extracellular cross-linking of maize arabinoxylans by oxidation of feruloyl esters to form oligoferuloyl esters and ether-like bonds. *Plant J.*, **58**, 554-567.
- **CANDELA M., MACCAFERRI S., TURRONI S., CARNEVALI P. and BRIGIDI P. (2010)**. Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. *Int. J. Food Microbiol.*, **140**, 93-101.
- **CAO G., SOFIC E. and PRIOR R.L. (1997)**. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 749-760.
- **CAO Y. and IKEDA I. (2009)**. Antioxidant activity and antitumor activity (*in vitro*) of xyloglucan selenious ester and sulfated xyloglucan. *Int. J. Biol. Macromol.*, **45**(3), 231-5.
- **CAPASSO R., EVIDENTE A., SCHIVO L., ORRU G., MARCIALIS M.A. and CRISTINZIO G. (1995)**. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 393-8.
- **CARDONA F., ANDRÉS-LACUEVA C., TULIPANI S., TINAHONES F.J. and QUEIPO-ORTUÑO M.I. (2013)**. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.*, **24**, 1415-1422.
- **CARDOSO S.M., SILVA A.M.S., COIMBRA M.A. (2002)**. Structural characterisation of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains. *Carbohydr. Res.*, **337**, 917-24.
- **CARDOSO S.M., COIMBRA M.A. and LOPEZ DA SILVA J.A. (2003a)**. Calcium-mediated gelation of an olive pomace extract. *Carbohydr. Polym.*, **52**(2), 125-33.
- **CARDOSO S.M., COIMBRA M.A. and LOPES DA SILVA J.A. (2003b)**. Temperature dependence of the formation and melting of pectin-Ca²⁺ networks: a rheological study. *Food Hydrocolloids*, **17**, 801-7.
- **CARDOSO S.M., MAFRA I., REIS A., NUNES C., SARAIVA J.A. and COIMBRA M.A. (2010)**. Naturally fermented black olives: Effect on cell wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. *LWT- Food Sci. Technol.*, **43**, 153-160.
- **CARINI M., ALDINI G., BOMBARDELLI E., MORAZZONI P. and MAFFEI FACINO R. (2000)**. UVB – induced hemolysis of rat erythrocytes: protective effect of procyanidins from grape seeds. *Life Sci.*, **67**, 1799-1814.
- **CARPITA N.C. and GIBEAUT D.M. (1993)**. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant J.*, **3**, 1-30.
- **CARUANA M., HOGEN T., LEVIN J., HILLMER A., GIESE A. and VASSALLO N. (2011)**. Inhibition and disaggregation of alpha-synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett.*, **585**, 1113-1120.
- **CASHMAN K. (2003)**. Prebiotics and Calcium Bioavailability. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, **4**, 21-32.
- **CATETO C.A.B. (2008)**. Lignin-Based Polyurethanes: Characterisation, Synthesis and Applications. Thèse de Doctorat. Université de Porto. Portugal. Institut Polytechnique de Grenoble. France.
- **CAZZOLA R., RUSSO-VOLPE S., CERVATO G. and CESTARO B. (2003)**. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur. J. Clin. Invest.*, **33** (10), 924-930.
- **CHANG X.L., CHEN B.Y. and FENG Y.M. (2011)**. Water-soluble polysaccharides isolated from skin juice, gel juice and flower of Aloe vera Miller. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **42**, 197-203.

- **CHAUDIERE J.** and **FERRARI-ILIOU R.** (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Tox.*, **37**, 949–962.
- **CHEN J.**, **ZHANG T.**, **JIANG B.**, **MU W.** and **MIAO M.** (2012). Characterization and antioxidant activity of Ginkgo biloba exocarp polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, **87**, 40–45.
- **CHEN Y.**, **YIN L.**, **ZHANG X.**, **WANG Y.**, **CHEN Q.**, **JIN C.**, **HU Y.** and **WANG J.** (2014). Optimization of Alkaline Extraction and Bioactivities of Polysaccharides from Rhizome of *Polygonatum odoratum*. *Biomed. Res. Int.*, 1-8.
- **CHEVALIER F.**, **CHOBERT J.M.**, **GENOT C.** and **HAERTLE T.** (2001). Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of α -lactoglobulin glycosylated with several sugars. *J. Agr. Food Chem.*, **49**, 5031–5038.
- **CHIACCHIERINI E.**, **MELE G.**, **RESTUCCIA D.** and **VINCI G.** (2007). Impact evaluation of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality. *Trends Food Sci. Tech.*, **18**, 299-305.
- **CHISTENSEN U.**, **ALONSO-SIMON A.**, **SCHELLER H.V.**, **WILLATS W.G.T.** and **HARHOLT J.** (2010). Characterization of the primary cell walls of seedlings of *Brachypodium distachyon* –A potential model plant for temperate grasses. *Phytochemistry*, **71**, 62-69.
- **CHOUAKI S.**, **BESSEDIK F.**, **CHEBOUTI A.**, **MAAMRI F.**, **OUMATA S.**, **KHELDOUN S.**, **HAMANA M.F.**, **DOUZENE M.**, **BELLAH F.** et **KHELDOUN A.** (2006). Deuxième rapport national sur l'état des ressources Phytogénétiques. Institut national de la recherche agronomique d'Algérie.
- **CHUNG Y.C.**, **CHANG C.T.**, **CHAO W.W.**, **LIN C.F.** and **CHOU S.T.** (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2454-2458.
- **CICCOLI L.**, **LEONCINI S.**, **SIGNORINI C.** and **COMPORITI M.** (2008). In **VALACCHI G.** and **DAVIS P.** (2008). Oxidant in biology. A Question of Balance. Springer Science+ Business Media.
- **COI** (International Olive Council) (1990) Collection: Technical Handbooks. Olive Oil Quality Improvement. International Olive Oil Council, Madrid
- **COI** (Conseil oléicole international). (2006). Indicateurs macroéconomiques et agricoles.
- **COI** (Conseil oléicole international) (2011). World market in figures. *Olivae.*, **115**, 26–29.
- **COI** (Conseil oléicole international). Novembre 2014a. Huiles d'olive, Production.
- **COI** (Conseil oléicole international). Novembre 2014b. Huiles d'olive, Consommation.
- **COI** (Conseil oléicole international). Novembre 2014c. Huiles d'olive, Exportations.
- **COI** (Conseil oléicole international). Novembre 2014d. Huiles d'olive, Importations.
- **COI** (Conseil oléicole international). Novembre 2014e. Olives de table, Production.
- **COI** (Conseil oléicole international). Novembre 2014f. Olives de table, Consommation.
- **COI** (Conseil oléicole international). Novembre 2014g. Olives de table, Exportations.
- **COI** (Conseil oléicole international). Novembre 2014h. Olives de table, Importations.
- **COIMBRA M.A.**, **WALDRON K.W.** and **SELVENDRAN R.R.** (1994). Isolation and characterization of cell wall polymers from olive pulp (*Olea europea* L.). *Carbohydr. Res.*, **252**, 245–262.
- **COIMBRA M.A.**, **WALDRON K.W.** and **SELVENDRAN R.R.** (1995a). Isolation and characterization of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive (*Olea europaea*) seed hull. *Carbohydr. Polym.*, **27**, 285–94.
- **COIMBRA M.A.**, **RIGBY N.M.**, **SELVENDRAN R.R.** and **WALDRON K.W.** (1995b). Investigation of the occurrence of xylan-xyloglucan complexes in the cell walls of olive pulp (*Olea europaea*). *Carbohydr. Polym.*, **27**, 277-284.

- COIMBRA M.A., BARROS A., BARROS M., RUTLEDGE D.N. and DELGADILLO I. (1998). Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.*, **37**, 241–8.
- COIMBRA M.A., BARROS A., RUTLEDGE D.N. and DELGADILLO I. (1999). FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydr. Res.*, **317**, 145-154.
- COPPA G.V., ZAMPINI L., GALEAZZI T. and GABRIELLI O. (2006). Prebiotics in human milk: a review. *Dig. Liver Dis.*, **38**, S291-S294.
- COSGROVE D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 850-861.
- COULON L. (2004). Effet d'un hydroperoxyde lipidique et des LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans la libération de l'acide arachidonique des phospholipides plaquettaires. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France.
- CROGNALE S., D'ANNIBALE A., FEDERICI F., FENICE M., QUARATINO D. and PETRUCCIOLI M. (2006). Olive oil mill wastewater valorisation by fungi. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 1547–55.
- D'ANNIBALE A., SERMANI G.G., FEDERICI F. and PETRUCCIOLI M. (2006). Olive mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technol.*, **97**, 1828–33.
- DAI J. and MUMPER R.J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15**, 7313-7352.
- DANELLAKIS D., NTAIKOU I., KORNAROS M. and DAILIANIS S. (2011). Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, **101**, 358–66.
- DAS D.K., ENGELMAN R.M., LIU X., MAITY S., ROUSOU J.A., FLACK J., LAKSMIPATI J., JONES R.M., PRASAD M.R. and DEATON D.W. (1992). Oxygen-derived free radicals and hemolysis during open heart surgery. *Moll. Cell. Biochem.*, **111**, 77-86.
- DASS N.B., JOHN A.K., BASSIL A.K., CRUMBLEY C.W., SHEHEE W.R., MAURIO F.P., MOORE G.B., TAYLOR C.M. and SANGER G.J. (2007). The relationship between the effects of short-chain fatty acids on intestinal motility in vitro and GPR43 receptor activation. *Neurogastroenterol. Motil.*, **19**, 66–74.
- DAVIES M.J., FU S., WANG H. and DEAN R.T. (1999). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 1151-1163.
- DE FELICE M., GOMES T. and CATALANO M. (1979). Estrazione dell'olio dalle olive con sistemi continui di centrifugazione delle paste. Risultati di ricerche triennali. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **56**, 361–369. In APARICIO R and HARWOOD J. (2013). Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. 2nd ed. Springer.
- DE ZWART L.L., MEERMAN J.H.N., COMMANDEUR J.N.M. and VERMEULEN N.P.E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, **26(1-2)**, 202–226.
- DELZENNE N.M., DAUBIOUL C., NEYRINCK A., LASA M. and TAPER H.S. (2002). Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals, review of biological events and future prospects. *Br. J. Nutr.*, **87(1)**, 255-259.
- DELZENNE N.M., CANI P.D. and NEYRINCK A.M. (2008). Prebiotics and lipid metabolism. In VERSALOVIC J. and WILSON M. Therapeutic Microbiology: Probiotics and Related Strategies. Press, Washington, DC. 184-191.
- DEMIGNE C., JACOBS H., MOUNDRAS C., DAVICCO M.J., HORCAJADA M.N., BERNALIER A. and COXAM V. (2008). Comparison of native or reformulated chicory fructans, or non purified chicory, on rat cecal fermentation and mineral metabolism. *Eur. j. nutr.*, **47**, 366-374.

- **DEPASS C.M. (2011)**. Campylobacter jejuni Serotype HS: 10 Capsular Polysaccharide and the Conjugate Vaccine thereof. Thèse de doctorat. Université de Guelph. Canada.
- **DERMECHE S. et MOULTI-MATI F. (2012)**. Biodégradation de Composés phénoliques. *TJMPNP.*, **8 (2)**, 73-78.
- **DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F. and MICHAUD P. (2013)**. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem.*, **48**, 1532–1552.
- **DEUTSCH J.C. (1998)**. Ascorbic acid possesses labile oxygen atoms in aqueous solution. *J. Chromatogr. (A)*, **802**, 385–390.
- **DI GIOVACCHINO L., SOLINAS M. and MICCOLI M. (1994)**. Aspetti qualitativi e quantitativi delle produzioni olearie ottenute dalla lavorazione delle olive con i differenti sistemi di estrazione. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **71**, 587–594. In **APARICIO R and HARWOOD J. (2013)**. Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. 2nd ed. Springer.
- **DI GIOVACCHINO L., SESTILI S. and Di Vincenzo D. (2002)**. Influence of olive processing on virgin olive quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **104**, 587–601.
- **DOURADO F., MADUREIRA P., CARVALHO V., COELHO R., COIMBRA M.A., VILANOVA M., MOTA M. and GAMA F.M. (2004)**. Purification, structure and immunobiological activity of an arabinan-rich pectic polysaccharide from the cell walls of Prunus dulcis seeds. *Carbohydr. Res.*, **339**, 2555–2566.
- **DUEÑAS M., MUÑOZ-GONZÁLEZ I., CUEVA C., JIMÉNEZ-GIRÓN A., SÁNCHEZ-PATÁN F., SANTOS-BUELGA C., MORENO-ARRIBAS M.V. and BARTOLOMÉ B. (2015)**. A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. *Biomed. Res. Int.*, 1-15.
- **DUFF S.J.B. and MURRAY W.D. (1996)**. Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technol.*, **55**, 1–33.
- **DUPONT M.S. and SELVENDRAN R.R. (1987)**. Hemicellulosic polymers from the cell walls of beeswing wheat bran: part 1, polymers solubilised by alkali at 2°C. *Carbohydr. Res.*, **163**, 99–113.
- **EBRAHIMZADEH M.A., POURMORAD F. and HAFEZI S. (2008)**. Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. *Turk. J. Biol.*, **32**, 1-7.
- **EL-SABBAN F. (2014)**. The antioxidant advantage of the Mediterranean diet in cardiovascular disease. *Nutr. Diet. Suppl.*, **6**, 6 35–40.
- **EROGLU E., EROGLU I., GUNDUZ U. and YUCEL M. (2008)**. Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. *Bioresource Technol.*, **99**, 6799–808.
- **EROGLU E., EROGLU I., GUNDUZ U. and YUCEL M. (2009)**. Comparison of the physicochemical characteristics and photofermentative hydrogen production potential of wastewaters produced from different olive-oil mills in Western-Anatolia, Turkey. *Biomass. Bioenerg.*, **33(4)**, 706–11.
- **FAO WHO. (2002)**. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 1-11.
- **FAO WHO. (2001)**. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 1-34.
- **FAVIER A. (2003)**. Le stress oxydant. *L'Act. Chim.*, 108-115.
- **FEDORAK P.M. and HRUDEY S.E. (1984)**. The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. *Water Res.*, **18**, 361–7.
- **FELIZÓN B., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J., HEREDIA A. and GUILLÉN R. (2000)**. Steam-explosion pretreatment of olive cake. *JAOCs.*, **77**, 15–22.

- **FEMENIA A., RIGBY N.M., SELVENDRAN R.R. and WALDRON K.W. (1999)**. Investigation of the occurrence of pectic-xylan-xyloglucan complexes in the cell walls of cauliflower stem tissues. *Carbohydr. Polym.*, **39**, 151-164.
- **FEMIA A.P., LUCERI C., DOLARA P., GIANNINI A., BIGGERI A., SALVADORI M., CLUNE Y., COLLINS K.J., PAGLIERANI M. and CADERNI G. (2002)**. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, **23**, 1953-1960.
- **FENG L., JIA X.B., SHI F. and CHEN Y. (2010)**. Identification of Two Polysaccharides from *Prunella vulgaris* L. and Evaluation on Their Anti-Lung Adenocarcinoma Activity. *Molecules*, **15**, 5093-5103.
- **FERNÁNDEZ- BOLAÑOS J., FELIZÓN B., BRENES M., GUILLÉN R. and HEREDIA A. (1998)**. Hydroxytyrosol and Tyrosol as the Main Compounds Found in the Phenolic Fraction of Steam-Exploded Olive Stones. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 1–7.
- **FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J., FELIZÓN B., HEREDIA A., GUILLÉN R., JIMÉNEZ A. (1999)**. Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from steam exploded olive stones. *Ibid.*, **68**, 1–12.
- **FERNÁNDEZ- BOLAÑOS J., RODRIGUEZ G., RODRIGUEZ R., HEREDIA A., GUILLEN R. and JIMENEZ A. (2002)**. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of the two-phase olive oil processing or “alperujo”. *J. Agri. Food Chem.*, **50**, 6804–11.
- **FERREIRA J.A., MAFRA I., SOARES M.R., DMITRY V., EVTUGUIN D.V. and COIMBRA MA. (2006)**. Dimeric calcium complexes of arabinan-rich pectic polysaccharides from *Olea europaea* L. cell walls. *Carbohydr. Polym.*, **65**, 535–43.
- **FERREIRA I.C.F.R., BARROS L., SOARES M.E, BASTOS M.L. and PEREIRA J.A. (2007)**. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chem.*, **103**, 188–195.
- **FILIPPI C., BEDINI S., LEVI-MINZI R., CARDELLI R. and SAVIOZZI A. (2002)**. Cocomposting of olive oil mill by-products: chemical and microbiological evaluations. *Compost Sci. Util.*, **10**, 63–71.
- **FIORDALISO M., KOK N., DESAGER J. P., GOETHALS F., DEBOYSER D., ROBERFROID M. and DELZENNE N. (1995)**. Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipids*, **30**, 163-167.
- **FLINT H.J., DUNCAN S.H., SCOTT K.P. and LOUIS P. (2007)**. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.*, **9**, 1101–1111.
- **FLORA S.J.S. (2009)**. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2(4)**, 191-206.
- **FONTAINE E., BARNOUD D., SCHWEBEL C. et LEVERVE X. (2002)**. Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, **11**, 411-420.
- **FRANCONI F., COINU R., CARTA S., URGEGHE P.P., IERI F., MULINACCI N. and ROMANI A. (2006)**. Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3121-3125.
- **FRY S.C. (1982)**. Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. *Biochem. J.*, **203 (2)**, 493-504.
- **FRY S.C. (1983)**. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta*, **157(2)**, 111-123.

- **FRY S.C., WILLIS S.C. and PATERSON A.E.J. (2000)**. Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. *Planta*, **211(5)**:679-692.
- **GALANAKIS C.M., TORNBERG E. and GEKAS V. (2009)**. Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs. *LWT- Food Sci. Technol.*, 1–8.
- **GALANAKIS C.M., TORNBERG E. and GEKAS V. (2010a)**. 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. Technol.*, **43**, 1009–17.
- **GALANAKIS C.M., TORNBERG E. and GEKAS V. (2010b)**. Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs. *LWT- Food Sci. Technol.*, **43**, 1018–1025.
- **GALANAKIS C.M., TORNBERG E. and GEKAS V. (2010c)**. The effect of heat processing on the functional properties of pectin contained in olive mill wastewater. *LWT- Food Sci. Technol.*, **43**, 1001–8.
- **GARBARZ M., DHERMY D., LECOMTE M.C., FEO C., CHAVEROCHE I., GALAND C., BOURNIER O., BERTRAND O. and BOIVIN P. (1984)**. A variant of erythrocyte membrane skeletal protein band 4.1 associated with hereditary elliptocytosis. *Blood*, **64(5)**, 1006-1015.
- **GARCIA-RASO A., FERNANDEZ-DIAZ M., PAEZ M.I., SANZ J., MARTINEZ-CASTRO I. J. (1989)**. Gas chromatographic retention of carbohydrate trimethylsilyl ethers- III. Ketohexoses. *J. Chromatogr. A.*, **471**, 205-216.
- **GARIBOLDI P., JOMMI G., and VEROTTA L. (1986)**. Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, **25**, 865–869.
- **GARRIDO FERNANDEZ A., FERNANDEZ-DIEZ M.J. and ADAMS, M.R. (1997)**. Table Olives: Production and Processing. Chapman and Hall, London.
- **GAUTAM N., MANTHA A.K. and MITTAL S. (2014)**. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 1-23.
- **GEISSMANN T. and NEUKOM H. (1971)**. Vernetzung von Phenolcarbonsäureestern von Polysacchariden durch oxydative phenolische Kupplung. *Helv. Chim. Acta.*, **54**, 1108–1112.
- **GIBSON G.R. and ROBERFROID M.B. (1995)**. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.*, **125**, 1401–1412.
- **GIBSON G.R. and ANGUS F. (2000)**. Prebiotics and Probiotics. Leatherhead Food RA publishing. Leatherhead. UK.
- **GIBSON G. R., PROBERT H.M., LOO J.V., RASTALL R.A., and ROBERFROID M. B. (2004)**. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.*, **17(2)**, 259-275.
- **GIL-SERRANO A., MATEOS-MATOS M.I. and TEJERO-MATEO M.P. (1986)**. Acidic xylan from olive pulp. *Phytochemistry*, **25**, 2653–4.
- **GIL-SERRANO A. and TEJERO-MATEO P. (1988)**. A xyloglucan from olive pulp. *Carbohydr. Res.*, **181**, 278–81.
- **GLAZER A.N. and NIKAIDO H. (2007)**. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. 2^{ème} Edition, Cambridge University Press, New York.
- **GODERSKA K., NOWAK J. and CZARNECKI Z. (2008)**. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, **7(2)**, 5-20.
- **GOGET C. and DECONINCK G. (2011)**. Agent for colouring and/or bleaching keratinous fibres in two parts, including a particular fatty body and a reductone. brevet ep2338571 a1.

- **GOMEZ-RICO A., FREGAPANE G. and SALVADOR M.D. (2008)**. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Res. Int.*, **41**, 433–440.
- **GONCALVES C., PEREIRA C. and BELO I. (2010)**. Comparison of batch and fed-batch lipase production from olive mill wastewater by *Yarrowia lipolytica* and *Candida cylindracea*. *J. Biotechnol.*, **150**, S405.
- **GOVENDER M., CHOONARA Y.E., KUMAR P., Du TOIT L.C., VUUREN S.V. and PILLAY V. (2014)**. A Review of the Advancements in Probiotic Delivery: Conventional vs. Non-conventional Formulations for Intestinal Flora Supplementation. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.*, **15**(1), 29-43.
- **GRANT G.T., MORRIS E.R., REES D.A., SMITH P.J.C. and THOM D. (1973)**. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS. Lett.*, **32**, 195-198.
- **GRASSBY T. (2008)**. Phenolics and phenolic-polysaccharide linkages in Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) cell walls. Thèse de Doctorat. Université d'East Anglia. Angleterre.
- **GRATTAN B.J.Jr. (2013)**. Plant Sterols as Anticancer Nutrients: Evidence for Their Role in Breast Cancer. *Nutrients*, **5**, 359-387.
- **GREEN P.S. (2002)**. A revision of *Olea L.* (Oleaceae). *Kew Bull.*, **57**, 91–140.
- **GUARNER F. (2007)**. A prebiotic in inflammatory bowel diseases. *Br. J. Nutr.*, **98**(1), 85-89.
- **GUEYE P.M. (2007)**. « Phénotypes majeurs de l’haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l’hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge ». Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur – Strasbourg I. France.
- **GUITTON J., TINARDON F., LAMRINI R., LACAN P., DESAGE M. and FRANCINA A. (1998)**. Decarboxylation of [1-13C]leucine by hydroxyl radicals - for clinical research and diagnosis. *Free Radic. Biol. Med.*, **25** (3), 340-345.
- **GULLÓN B., GULLÓN P., SANZ Y., ALONSO J.L. and PARAJÓ J.C. (2011)**. Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT- Food Sci. Technol.*, **44**, 1687-1696.
- **GULLÓN B., GÓMEZ B., MARTÍNEZ-SABAJANES M., YÁÑEZ R., PARAJÓ J.C. and ALONSO J.L. (2013)**. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends Food Sci. Tech.*, **30**, 153-161.
- **GUTFINGER J. (1981)**. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 966–968.
- **HAAGENSEN F., SKIADAS I.V., GAVALA H.N. and AHRING B.K. (2009)**. Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass Bioenerg.*, **33**, 1643–51.
- **Hach Company. (1997-2009)**. COLORIMETRE DR/890. Méthodes d’analyses.
- **HAJIMAHMOODI M., SADEGHI N., JANNAT B., OVEISI M.R., MADANI S. and KIAYI M. (2008)**. Antioxidant activity reducing power and total phenolic content of Iranian olive cultivar. *J. Biol. Sci.*, **8**(4), 779-783.
- **HALLIWELL B. (1991)**. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.*, **91** (3), S14–S22.
- **HALLIWELL B. (1994)**. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr. Rev.*, **52**, 253-265.
- **HALLIWELL B. (1995)**. Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol.*, **49**(10), 1341-1348.
- **HALLIWELL B., CLEMENT M.V. and LONG L.H. (2000)**. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.*, **486**, 10–13.
- **HALLIWELL B. (2002)**. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.*, **32**(10), 968–974.

- HALLIWELL B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.*, **31**(9), 509–515.
- HAMDI M. (1993). Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment: a review. *Bioprocess Eng.*, **8**, 209–14.
- HARRIS PJ., HENRY RJ., BLAKENEY AB. and STONE BA. (1984). An improved method for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, **127**, 59-73.
- HARRY-O'KURU R.E. (2007). Scale-Up of Sicklepod Processing. In: Janick, J., Whipkey, A., editors. *Issues in new crops and new uses.* Alexandria, VA: ASHS Press. 132-137.
- HARTLEY R.D., MORRISON W.H., BALZA F. and TOWERS G.H.N. (1990). Substituted truxillic and truxinic acids in cell walls of *cyanodon dactylon*. *Phytochemistry*, **29**, 3699-3703.
- HAYASHI T. (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 139-168.
- HEFNAWY H.T.M. and GEHAN A.E. (2014). Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharide extracted from Rice Bran. *WJDFS.*, **9** (2), 95-104.
- HENNEBELLE T. (2006). Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille-Lilles1. France.
- HOENTJEN F., WELLING G.W., HARMSSEN H.J., ZHANG X., SNART J., TANNOCK G.W., LIEN K., CHURCHILL T.A., LUPICKI M. and DIELEMAN L.A. (2005). Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflamm. Bowel Dis.*, **11**, 977-985.
- HOLZAPFEL W. H., HABERER P., GEISEN R., BJORKROTH J. and SCHILLINGER U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**, 365S-373S.
- HOSONO A., OZAWA A., KATO R., OHNISHI Y., NAKANISHI Y., KIMURA T. and NAKAMURA R. (2003). Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci. biotech. bioch.*, **67**, 758-764.
- HOUSSET B. (1990). Aberrations du métabolisme des protéines et des acides nucléiques au cours du vieillissement. Rôle des radicaux libres. *Rev. Med. Interne*, **11**, 62-66.
- HUANG X., LI Q., LI H. and GUO L. (2009). Neuroprotective and antioxidative effect of cactus polysaccharides in vivo and in vitro. *Cell Mol. Neurobiol.*, **29**(8), 1211-21.
- HUANG J.F., SU Z., YUAN X.Y., WANG X.Y. and LI M. (2010). Structure and Properties of Carboxymethyl Cellulose/ Soy Protein Isolate Blend Edible Films Crosslinked by Maillard Reactions. *Carbohydr. Polym.*, **79**(1), 145-153.
- HUANG G., CHEN Y. and WANG X. (2011). Extraction and deproteinization of pumpkin polysaccharide. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **62**(6), 568-71.
- HUISMAN M.M.H., SCHOLS H.A. and VORAGEN A.G.J. (1996). Changes in cell wall polysaccharides from ripening olive fruits. *Carbohydr. Polym.*, **31**(3), 123–33.
- ILBERT H. (2005). Produits du terroir méditerranéen : conditions d'émergence, d'efficacité et modes de gouvernance (PTM : CEE et MG). Centre international de hautes études agronomiques. Montpellier.
- INOUE K., KITAHARA K., AIKAWA Y., ARAI S. and MASUDA-HANADA T. (2011). HPLC Separation of All Aldopentoses and Aldohexoses on an Anion-Exchange Stationary Phase Prepared from Polystyrene-Based Copolymer and Diamine: The Effect of NaOH Eluent Concentration. *Molecules*, **16**, 5905-5915.
- ISHII I. and HIROI T. (1990). Linkage of phenolic acids to cell-wall polysaccharides of bamboo shoot. *Carbohydr. Res.*, **206** (2), 297-310.

- **ISHII T., PANAUD O., BRAR D. S., and KHUSH G.S. (1990)**. Use of non-radioactive digoxigenin-labeled DNA probe for RFLP analysis in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **8**, 167-179.
- **ISHII T., HIROI T. and THOMAS J.R. (1990)**. Feruloylated xyloglucan and *p*-coumaroyl arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, **29**, 1999-2003.
- **ISHII T. (1997)**. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, **127**, 111–127.
- **ISHII T. and MATSUNAGA T. (2001)**. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*, **57(6)**, 969-974.
- **JOZWIK M., JOZWIK M., JOZWIK M., SZCZYPKA M., GAJEWSKA J. and LASKOWSKA-KLITA T. (1997)**. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin. Chim. Acta*, **267**, 129–142.
- **JANUEL C. (2003)**. Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète. Etude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. Thèse de Doctorat. Université de Lyon I/INSA-Lyon. France.
- **JARVIS M.C. and APPERLEY D.C. (1995)**. Chain conformation in concentrated pectic gels: evidence from ¹³C NMR. *Carbohydr. Res.*, **275**, 131-145.
- **JASKARI J., KONBULA P., SIITONEN A., JOUSIMES-SOMEN H., MATILLA-SANDHOLM T. and POUTAMEN K. (1998)**. Oat beta-glucan and xylan hydrolyzates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 175–181.
- **JIMÉNEZ A., GUILLÉN R., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J. and HEREDIA A. (1994)**. Cell wall composition of olives. *J. Food Sci.*, **59**, 1192–6.
- **JIMÉNEZ A., RODRÍGUEZ R., FERNÁNDEZ-CARO I., GUILLÉN R., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J. and HEREDIA A. (2001)**. Olive Fruit Cell Wall: Degradation of Pectic Polysaccharides during Ripening. *J. Agr. Food Chem.*, **49**, 409–415.
- **JIANG Y.H., JIANG X.L., WANG P., MOU H.J., HU X.K. and LIU S.Q. (2008)**. The antitumor and antioxidative activities of polysaccharides isolated from *Isaria farinosa* B05. *Microbiol. Res.*, **163**, 424-430.
- **JAYAPRAKASHA G.K., GIRENAVAR B. and PATIL B.S. (2008)**. Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT- Lwt-Food Sci. Technol.*, **41**, 376–384.
- **KALUEFF A.V., EREMIN K. O. and TUOHIMAA P. (2004)**. Mechanisms of Neuroprotective Action of Vitamin D3. *Biochemistry (Mosc)*, **69 (7)**, 738-741.
- **KANEKO T., KOHMOTO T., KIKUCHI H., SHIOTA M., IINO H. and MITSUOKA, T. (1994)**. Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2288–2290.
- **KAO C.H.J., JESUTHASAN A.C., BISHOP K.S., GLUCINA M.P. and FERGUSON L.R. (2013)**. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. *FFHD.*, **3(2)**, 48-65.
- **KAPELLAKIS I.E., TSAGARAKIS K.P. and CROWTHER J.C. (2008)**. Olive oil history, production and by-product management. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **7**, 1–26.
- **KATAOKA H. (2005)**. Gas chromatography of amines as various derivatives. Quantitization of amino acids and amines by chromatography-methods and protocols. *J. Chromatogr. Lib.*, **70**, 364-404.
- **KATO, A., AZUMA, J. and KOSHIJIMA, A. (1983)**. A new feruloylated trisaccharide from bagasse. *Chem. Lett.*, 137-140.
- **KAUR H., CHAUHAN S. and SANDHIR R. (2011)**. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease. *Neurochem.Res.*, **36**, 1435–1443.

- **KECELI T.** and **GORDON M.H. (2002)**. Ferric ions reduce the antioxidant activity of the phenolic fraction of virgin olive oil. *J. Food Sci.*, **67 (3)**, 943- 947.
- **KEEGSTRA K., TALMADGE K.W., BAUER W.D.** and **ALBERSHEIM P. (1973)**. Structure of plant-cell walls. 3. Model of walls of suspension-cultured sycamore cells based on interconnections of macromolecular components. *Plant Physiol.*, **51**, 188-196.
- **KELSEY N.A., WILKINS H.M.** and **LINSEMAN D.A. (2010)**. Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. *Molecules*, **15**, 7792-7814.
- **KENNEDY J.F.** and **ROBERTSON S.M. (1978)**. Mass-spectrometric fragmentation pathways of the Otrimethylsilyl derivatives of hexuronic acids and their lactones. *Carbohydr. Res.*, **67(1)**, 1-15.
- **KERR E.M.** and **FRY S.C. (2004)**. Extracellular cross-linking of xylan and xyloglucan in maize cell-suspension cultures: the role of oxidative phenolic coupling. *Planta*, **219**, 73–83.
- **KESSLER B., WEUSTHUIS R., WITHOLT B.** and **EGGINK G. (2001)**. Production of microbialpolyesters: fermentation and downstream processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **71**,159–82.
- **KIM S.J., HAN D., KWANG DEOG MOON K.D.** and **RHEE J.S. (1995)**. Measurement of Superoxide Dismutase-like Activity of Natural Antioxidants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59 (5)**, 822-826.
- **KLOBUKOWSKI J., MODZELEWSKA-KAPITULA M.** and **KORNACKI K. (2009)**. Calcium Bioavailability from Diets Based on White Cheese Containing Probiotics or Synbiotics in Short-Time Study in Rats. *Pak. J. Nutr.*, **8 (7)**, 933-936.
- **KOBAYASHI M., MATOH T.** and **AZUMA JI. (1996)**. Two Chains of Rhamnogalacturonan II Are Cross-Linked by Borate-Diol Ester Bonds in Higher Plant Cell Walls. *Plant Physiol.*, **110(3)**, 1017–1020.
- **KOLIDA S.** and **GIBSON, G.R. (2008)**. The prebiotic effect: Review of experimental and human data. In *Handbook of Prebiotics*; Gibson, G.R., Roberfroid, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 69–93.
- **KORAKLI M., GANZLE M.G.** and **VOGEL R.F. (2002)**. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Appl. Microbiol.*, **92**, 958–965.
- **KRINSKY N.I. (1989)**. Antioxydants function of carotenoides. *Free Rad. Biol. Med.*, **7(6)**, 617-635.
- KUMEMURA M., HASHIMOTO F., FUJII C., MATSUO K., KIMURA H., MIYAZOE R., OKAMATSU H., INOKUCHI T., ITO H., OIZUMI K.** and **OKU T. (1992)**. Effects of administration of 4G-beta-Dgalactosylsucrose on fecal microflora putrefactive products, short chain fatty acids, weight, moisture, and subjective sensation of defecation in the elderly with constipation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **13**, 199–210.
- LAEMMLI U. K.** and **FAVRE H. (1973)**. Maturation of the head of bacteriophage T4 I DNA packaging events. *J. Moll. Biol.* , **780**, 575-599.
- **LAFKA T.A., LAZOU A.E., SINANOGLU V.J.** and **LAZOS E.S. (2011)**. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chem*, **125**, 92–8.
- **LAGUERRE M., LÓPEZ-GIRALDO L.J., LECOMTE J., PINA M.** et **VILLENEUVE P. (2007)**. Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *OCL.*, **14(5)**, 278-292.
- **LANCIOTTI R., GIANOTTI A., BALDI D., ANGRISANI R., SUZZI G.** and **MASTROCOLA D.** and **GUERZONI M.E. (2005)**. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technol.*, **96**, 317–22.
- **LAPARRA J.M.** and **SANZ Y. (2010)**. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharm. Res.*, **61**, 219–225.
- **LARROSA M, YAÑEZ-GASCÓN MJ, SELMA MV, GONZÁLEZ-SARRÍAS A, TOTI S, CERÓN J.J., TOMÁS-BARBERÁN F., DOLARA P.** and **ESPÍN J.C. (2009)**. Effect of a low dose

of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 2211–20.

- LEFEVRE G., BELJEAN-LEYMARIE M., BEYERLE F., BONNEFONTROUSSELOT D., CRISTOL JP., THEROND P. et TORREILLES J. (1998). Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Ann. Biol. Clin.*, **56**(3), 305-319.

- LESAGE-MEESSEN L., NAVARRO D., MAUNIER S., SIGOILLOT J.C., LORQUIN J., DELATTRE M., SIMON J.L., ASTHER M. and LABAT M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem.*, **75**, 501–7.

- LEVIGNE S.V., RALET M.C.J., QUEMENER B.C., POLLET B.M.L., LAPIERRE C. and THIBAUT J.F.J. (2004). Isolation from sugar beet cell walls of arabinan oligosaccharides esterified by two ferulic acid monomers. *Plant Physiol.*, **134**, 1173–1180.

- LEVINE R.L., WEHR N., WILLIAMS J.A., STADMAN E.R. and SHACTER E. (2000). 'Determination of carbonyl groups in oxidized proteins'. *Methods Mol. Biol.*, **99**, 15-24.

- LEVITT M.D., GIBSON G.R. and CHRISTL S. (1995). Gas metabolism in the large intestine. In Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Health. GR Gibson and GT Macfarlane, (eds). CRC Press. Boca Raton, FL, pp. 113–154.

- LICHT T.R., EBERSBACH T. and FRØKLÆR H. (2012). Prebiotics for prevention of gut infections. *Trends Food Sci. Technol.*, **23**, 70-82.

- LINDERKAMP O., KIAU U. and RUEF P. (1997). Cellular and membrane deformability of red blood cells in protein infants with and without growth retardation. *Clin. Hemorheol. Micro.*, **17**, 279–283.

- LIU D.M., SHENG J.W., QI H.M., ZHANG WF., HAN C.M. and XIN X.L. (2011). Antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Athyrium multidentatum* (Doll) Ching. *J. Med. Plants Res.*, **5**(14), 3061-3066.

- LÓPEZ M.J. and RAMOS-CORMENZANA A. (1996). Xanthan production from olive-mill wastewaters. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **38**, 263–70.

- LÓPEZ-MOLINA D., NAVARRO-MARTÍNEZ M.D., MELGAREJO F.R., HINER A.N.P., CHAZARRA S. and RODRÍGUEZ-LÓPEZ J.N. (2005). Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynarascolymus* L.). *Phytochemistry*, **66**, 1476–1484.

- LOUADJ L. and GIUFFRÈ A.M. (2010). Analytical characteristics of olive oil produced with three different processes in Algeria. *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, **87**(3), 186-195.

- LOUMOU A. and GIOURGA C. (2003). Olive groves: "The life and identity of the Mediterranean". *Agr. Hum. Val.*, **20**, 87–95.

- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biochem.*, **193**, 265-275.

- LUO A.X., HE X.J., ZHOU S.D., FAN Y.J., LUO A.S. and CHUN Z. (2010). Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. *Carbohydr. Polym.*, **79**, 1014–1019.

- LUTZ T. and SCHARRER E. (1991). Effect of short-chain fatty acids on calcium absorption by the rat colon. *Exp. Physiol.*, **76**, 615–618.

- MABINYA L.V., MAFUNGA T. and BRAND J.M. (2006). Determination of ferulic acid and related compounds by thin layer chromatography. *Afr. J. Biotechnol.*, **5**(13), 1271-1273.

- MACFARLANE G.T., GIBSON G.R. and CUMMINGS J.H. (1992). Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**, 57–64.

- MACFARLANE S. and MACFARLANE G.T. (1995). Proteolysis and amino acid fermentation. In Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology, pp. 75–100 [GR Gibson and GT Macfarlane, editors]. Boca Raton, FL: CRC Press

- MAESTRO-DURÁN R., LEON-CABELLO R., RUIZ-GUTIERREZ V., FIESTAS P. and VAZQUEZ-RONCERO A. (1994). Glucosidos fenólicos amargos de las semillas del olivo. *GrasasAceites*, **45**, 332–5.
- MAFRA I., LANZA B., REIS A., MARSILIO V., CAMPESTRE C., DE ANGELIS M. and COIMBRA M.A. (2001). Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharidecomposition of olive fruit. *Physiol. Plantarum.*, **111**, 439–47.
- MANDALARI G., NUENO PALOP C. TUOHY K., GIBSON G.R. BENNETT R.N. WALDRON K.W., BISIGNANO G. NARBAD A. and FAULDS C.B. (2007). In vitro evaluation of the prebiotic activity of a pectic oligosaccharide-rich extract enzymatically derived from bergamot peel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 1173–1179.
- MANDALARI G., FAULKS R.M., BISIGNANO C., WALDRON K.W., NARBAD A. and WICKHAM M.S.J. (2010). “In vitro evaluation of the prebiotic properties of almond skins (*Amygdalus communis* L.)”. *FEMS Microbiol. Lett.*, **304**(2), 116–122.
- MANNA C., GALLETTI P., CUCCIOLLA V., MONTEDORO G. and ZAPPIA V. (1999). Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr. Biochem.*, **10**, 159–165.
- MANNING T.S. and GIBSON G.R. (2004). Prebiotics. *Best Practice Res. Clin. Gastr.*, **18**, 287-298.
- MARI I., EHALIOTIS C., KOTSOU M., BALIS C. and GEORGAKAKIS D. (2003). Respiration profiles inmonitoring the composting of by-products from the olive oil agro-industry. *Bioresource Technol.*, **87**, 331–6.
- MARTINEZ MORENO J.M., GOMEZ HERRERA J.M. and JANER DEL VALLE C. (1957). Estudios fisico-quimicos sobre las pastas de aceitunas molidas. IV. Las goats de aceite. *Grasas Aceites*, **8**, 112–118. In APARICIO R and HARWOOD J. (2013). Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. 2nd ed. Springer.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ A.L., CARVAJAL-MILLAN E., LIZARDI-MENDOZA J., LÓPEZ-FRANCO Y.L., RASCÓN-CHU A., SALAS-MUÑOZ E., BARRON C. and MICARD V. (2011). The Peroxidase/H₂O₂ System as a Free Radical-Generating Agent for Gelling Maize Bran Arabinoxylans: Rheological and Structural Properties. *Molecules*, **16**, 8410-8418.
- MARTINS D.A.B., PRADO H.F.A.D., LEITE R.S.R., FERREIRA H., MORETTI M.M.S., SILVA R.D. and GOMES E. (2011). Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. In SUNIL K. (ed) Integrated Waste Management, **2**, InTech, Croatia, 319-360.
- MASSADEH M.I. and MODALLAL N. (2008). Ethanol production from olive mill waste-water (OMW) pretreated with *Pleurotus sajor-caju*. *Energy Fuels*, **150**(22), 150–4.
- MATOS M., BARREIRO M.F. and GANDINI A. (2010). Olive stone as a renewable source of biopolyols. *Ind. Crop. Prod.*, **32**, 7–12.
- MATSUNAGA T., ISHII T., MATSUNAMOTO S., HIGUCHI M., DARVILL A., ALBERSHEIM P. and O’NEILL M. (2004). Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan-II in peridophytes, lycophytes, and bryophytes.Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiol.*, **134**, 339-351.
- MCCLEARY B.V. (2007). An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 291–308.
- MCNAMARA C.J., ANASTASIOU C.C., O’FLAHERTY V. and MITCHELL R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *Int. Biodeter. Biodegr.*, **61**, 127–34.
- McCANN M.C. and ROBERTS K. (1994). Plant cell walls: murals and mosaics, *Agro-Food-Industry Hi-Tech.*, **5**, 43-46.

- **MENDIL M. (2009)**. Pour la modernisation de l'oléiculture en Algérie. L'oléiculture : l'expérience algérienne. Filaha Innove. Issn n° 1111-4762, N° 4.
- **McNEIL M., DARVILL A.G., FRY S.C. and ALBERSHEIM P. (1984)**. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 625-663.
- **MOHANASRINIVASAN V., GHOSAL T., THASLIM J.B., ZEBA H.J., SELVARAJAN E., SUGANTHI V. and SUBATHRA DEVI C. (2014)**. Production and cross linking studies of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* MTCC10508 for biopolymer preparation. *RJPT.*, **7 (1)**, 08-11.
- **MOHNEN D. (2008)**. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. in Plant Biol.*, **11**, 266-277.
- **MOLIS C. F., LOURIE B. and OUARNE F. (1996)**. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**, 324-328.
- **MONSIGNY M., PETIT C. and ROCHE A.C. (1988)**. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulphuric acid micromethod. *Anal. Biochem.*, **175**, 525-530.
- **MONTEDORO G.F., BEGLIOMINI A.L., SERVILI M., PETRUCCIOLI M. and FEDERICI F. (1993)**. Pectinase production from olive vegetation waters and its use in the mechanical olive oil extraction process to increase oil yield and improve quality. *Ital. J. Food Sci.*, **5**, 355-362.
- **MORILLO J.A., GUERRA DEL ÁGUILA V., AGUILERA M., RAMOS-CORMENZANA A. and MONTEOLIVA-SÁNCHEZ M. (2007)**. Production and characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill-waste waters. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 1705-10.
- **MORZEL M., GATELLIER P., SAYD T., RENERRE M. and LAVILLE E. (2006)**. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Sci.*, **73**, 536-543.
- **MOULTI-MATI F. et SALHI-MOHAND OUSSAID O. (2009)**. Etude de la décoloration des margines par quelques champignons de la pourriture blanche. *Remise.*, **3**, 78-90.
- **MUNJAL U., GLEI M., POOL-ZOBEL B. L. and SCHARLAU D. (2009)**. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *Br. J. Nutr.*, **27**, 1-9.
- **MUÑOZ A.E. and ALBA M.J. (1980)**. Informe de la Almazara Experimental del Instituto de la Grasa correspondiente a la campaña 1979-80. *Grasas Aceites*, **31**, 423-428. In **APARICIO R** and **HARWOOD J. (2013)**. Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. 2nd ed. Springer.
- **NADOUR M., MOULTI-MATI F., MICHAUD P. and LAROCHE C. (2012)**. Composition, structure, and valorisation of fibres from olive fruit and by products., *Agro Food Ind. Hi-Tec.*, **23 (6)**, 18-22.
- **NEISH A.S. (2009)**. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, **136**, 65-80.
- **NERGARD C.S., MATSUMOTO T., INNGJERDINGEN M., INNGJERDINGEN K., HOKPUTSA S., HARDING S.E., MICHAELSEN T.E., DIALLO D., KIYOHARA H., PAULSEN B.S. and YAMADA H. (2005)**. Structural and immunological studies of a pectin and a pecticarabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. exWalp. (Asteraceae). *Carbohydr. Res.*, **340**, 115-130.
- **NEVE J. (2002)**. Modulation de l'apport alimentaire en antioxydants. *Nutr. Clin. Métabol.*, **16**, 292-300.
- **NEZLIN R. and GHETIE V. (2004)**. Interactions of immunoglobulins outside the antigencombining site. *Adv. Immunol.*, **82**, 155-215.
- **NIAOUNAKIS M. and HALVADAKIS C.P. (2004)**. Olive mill waste management, literature review and patent survey. Athens, Greece: Typothito-George Dardanos, Athens.
- **NIAOUNAKIS M. and HALVADAKIS C.P. (2006)**. Olive processing waste management literature review and patent survey. Waste management series, vol. 5, 2nd ed. Elsevier.

- NIDETZKY B., STEINER W., HAYN M. and ESTERBAUER H. (1993). Enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreatment: Experimental data and kinetic modeling. *Bioresource Technol.*, **44**, 25–32.
- NINESS K.R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they? *J. Nutr.*, **129**, 1402S–1406S.
- NTAIKOU I., KOURMENTZA C., KOUTROULI E.C., STAMATELATOU K., ZAMPRAKA A., KORAROS M. and LYBERATOS G. (2009). Exploitation of olive oil mill wastewater for combined biohydrogen and biopolymers production. *Bioresource Technol.*, **100**, 3724–30.
- O'DELL B.L., BROWNING J.D. and REEVES P.G. (1987). Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes. *J. Nutr.*, **117**, 1883–1889.
- O'NEILL M., ALBERSHEIM P. and DARVILL A. (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. In DEY P.M. (Ed.), *Carbohydrates. Methods in plant biochemistry*, vol. 2, 415-441. London: Academic press.
- OBIED H.K., ALLEN M.S., BEDGOOD D.R., PRENZLER P.D., ROBARDS K. and STOCKMANN R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 823–837.
- OBIED H.K., ALLEN M.S. and BEDGOOD D.R. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chem. Tox.*, **45**, 1238–48.
- OBRO J., HARHOLT J., SHELLER HV. and ORFILA C. (2004). Rhamnogalacturonan-I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry*, **65**, 1429–1438.
- OCHOA-VILLARREAL M., AISPURRO-HERNÁNDEZ E., VARGAS-ARISPURO I. and MARTÍNEZ-TÉLLEZ M.Á. (2012). Plant cell wall polymers: Function, structure and biological activity of their derivatives. In A. De Souza Gomes (Eds). *Polymerization*, InTech, New York, 63-86.
- OLANO-MARTIN E., GIBSON G.R. and RASTALL R.A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.*, **93**, 505-511.
- OMAR S.H. (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm. J.*, **18**, 111–121.
- OOSTERVELD A., POL I.E., BELDMAN G. and VORAGEN A.G.J. (2001). Isolation of feruloylated arabinans and rhamnogalacturonans from sugar beet pulp and their gel forming ability by oxidative cross-linking. *Carbohydr. Polym.*, **44**, 9–17.
- OTLES S. (2013). *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*. CRC Press Inc. United states.
- OTT S.J., MUSFELDT M., ULLMANN U., HAMPE I. and SCHREIBER S. (2004). Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2566-72.
- OUWEHAND A. (2007). Success in applying pro- and prebiotics in dairy products. In Proceedings of the fourth international FFNet meeting on functional foods. 26-27, Budapest, Hungary.
- OYAIZU M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *J. Nutr.*, **44**, 307–315.
- PAEZ M., MARTINEZ-CASTRO I., SANZ J., OLANO A., GARCIA-RASO A. and SAURACALIXTO F. (1987). Identification of the components of aldoses in a tautomeric equilibrium mixture as their trimethylsilyl ethers by capillary gas chromatography. *Chromatographia*, **23** (1), 43-46.
- PAIVA-MARTINS F., GORDON M.H. and GAMEIRO P. (2003). Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, **124**, 23–36.
- PAIVA-MARTINS F., FERNANDES J., ROCHA S., NASCIMENTO H., VITORINO R., AMADO F., BORGES F., BELO L. and SANTOS-SILVA A. (2009). Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol. Nutr. Food Res.*, **53**, 1-8.

- PAIXAO N., PERESTRELO R., MARQUES J.C. and CAMARA J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.*, **105**, 204–214.
- PAK D., MUTHAIYAN A., STORY R.S., O'BRYAN C.A. LEE S.O., CRANDALL P.G. and RICKE S.C. (2013). Fermentative Capacity of Three Strains of *Lactobacillus* Using Different Sources of Carbohydrates: *In Vitro* Evaluation of Synbiotic Effects, Resistance and Tolerance to Bile and Gastric Juices. *JFR.*, **2**(1), 158-167.
- PALA F.S and GÜRKAN H. (2008). The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Adv. Mol. Biol.*, (1), 1-9.
- PAN X., WU T., ZHANG L., CAI L. and SONG Z. (2009). Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of lactobacilli to simulated stress environment. *Lett. Appl. Microbiol.*, **48**, 362–367.
- PANDA K., CHATTOPADHYAY R., GHOSH M.K., CHATTOPADHYAY D.J. and CHATTERJEE I.B. (1999). Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. *Free Rad. Biol. Med.*, **27**, 1064–1079.
- PANDEY K.B. and RIZVI S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2**(5), 270-278.
- PAPADELLI M., ROUSSIS A., PAPADOPOULOU K., VENIERAKI A., CHATZIPAVLIDIS I., KATI-NAKIS P. and BALIS K. (1996). Biochemical and molecular characterization of an *Azotobacter vinelandii* strain with respect to its ability to grow and fix nitrogen in olive mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **38**, 179–81.
- PAREDES M.J., MORENO E., RAMOS-CORMENZANA A. and MARTINEZ J. (1987). Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, **16**(7), 1557–64.
- PARIKH S.J. and CHOROVER J. (2005). FTIR Spectroscopic Study of Biogenic Mn-Oxide Formation by *Pseudomonas putida* GB-1. *Geomicrobiol. J.*, **22**, 207–218.
- PARKER M.L., NG A. and WALDRON K.W. (2005). The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *J. Sci. Food Agric.*, **85**, 2539–2547.
- PATEL S. and GOYAL A. (2011). Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 1119–1128.
- PAULY M., QIN Q., GREENE H., ALBERSHEIM P., DARVILL A. and YORK W.S. (2001). Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. *Planta*, **212**, 842-850.
- PAZDZIOCH-CZOCZRA M. and WIDENSKA A. (2002). Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide scavenging activity. *Analyt. Chim. Acta.*, **452**, 177–184.
- PELLERIN P., DOCO T., VIDAL S., WILLIAMS P., BRILLOUET J-M. and O'NEILL, M.A. (1996). Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.*, **290**, 183-197.
- PENG J., JONES G.L. and WATSON K. (2000). Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**(11), 1598–1606.
- PFAFFEROTT C., MEISELMAN H.J. and HOCHSTEIN P. (1982). The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. *Blood*, **59**, 12–15.
- PIERCE A.E. (1968). Silylation of Organic Compounds. Pierce Chemical, Rockford, III.
- PIERRE F., PERRIN P., CHAMP M., BORNET F., MEFLAH K. and MENANTEAU J. (1997). Short chain fructo-oligosaccharides reduce the occurrence of colon tumors and develop gut-associated lymphoid tissue in Min mice. *Cancer Res.*, **57**, 225-228.
- PIERRE G., SALAH R., GARDARIN C., TRAIKIA M., PETIT E., DELORT A.-M., MAMERI N., MOULTI-MATI F. and MICHAUD P. (2013). Enzymatic degradation and bioactivity evaluation of C-6 oxidized chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, **60**, 383-392.

- PINCEMAIL J., BONJEAN K., CAYEUX K. et DEFRAIGNE J.O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutr. Clin. Métabol.*, **16**, 233–239.
- PINTO G., POLLIO A., PREVITERA L., STANZIONE M. and TEMUSSI F. (2003). Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1657–9.
- PIYATHIDA J., DECHA S., KUSUMARN N., NONGPORN H.T. and RAPEPUN W. (2014). β -glucan-containing polysaccharide extract from the grey oyster mushroom [*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.] stimulates glucose uptake by the L6 myotubes. *Int. Food Res. J.*, **21**(2), 779-784.
- PREEDY V.R. (2014). Aging : Oxidative stress and Dietary Antioxidants (ed 1). Elsevier. USA.
- QUEMENER B., DÉSIÉ C., LAHAYE M., DEBRAUWER L. and NEGRONI L. (2003). Structural characterization of both positive- and negative ion electrospray mass spectrometry of partially methyl-esterified oligogalacturonides purified by semi-preparative high performance anion-exchange chromatography. *Eur. J. Mass. Spectrom.*, **9**, 45–60.
- RABILLOUD T., CHEVALLET M., LUCHE S. and LEIZE-WAGNER E. (2005). Oxidative stress response: A proteomic view. *Expert. Rev. Proteomics*, **2**, 949–956.
- RAHMAN I., BISWAS S.K. and KODE A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.*, **533**, 222–239.
- RALET M.C., THIBAUT J.F., FAULDS C.B. and WILLIAMSON G. (1994). Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell-walls of sugar-beet pulp. *Carbohydr. Res.*, **263**, 227–241.
- RALET M.C., ANDRE-LEROUX G., QUEMENER B. and THIBAUT, J.F. (2005). Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall. *Phytochemistry*, **66**, 2800–2814.
- RAMNANI P., CHITARRARI R., TUOHY K., GRANT J., HOTCHKISS S., PHILP K., CAMPBELL R., GILL C. and ROWLAND I. (2012). In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe*, **18**, 1-6.
- RAMOS-CORMENZANA A., JUAREZ-JIMENEZ B. and GARCIA-PAREJA M.P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (Alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **38**, 283–90.
- RANALLI A. (1992). Microbiological treatment of oil mill waste waters. *Grasas Aceites*, **43**, 16–9.
- RANALLI A. and DE MATTIA G. (1997). Characterisation of olive oil produced with a new enzyme processing aid. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1105-1113.
- RASCHKA L. and DANIEL H. (2005). Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. *Bone*, **37**, 728-735.
- RIDLEY B.L., O'NEILL M.A. and MOHNEN D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-released signaling. *Phytochemistry*, **57**, 929-967.
- RINCÓN B., BORJA R., MARTÍN M.A. and MARTÍN A. (2009). Evaluation of the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion process of acidified olive mill solid residue from a previous hydrolytic–acidogenic step. *Waste Manage*, **29**, 2566–73.
- ROBERFROID M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.*, **137**, (3 Suppl. 2), 830S-837S.
- ROBERFROID M.B. (2008). Prebiotics in Nutrition. In *Handbook of Prebiotics*, 1st ed.; GIBSON G.R., ROBERFROID M.B., Eds.; CRC Group: Boca Raton, FL, USA, pp. 1–11.
- ROBERFROID M., GIBSON G.R., HOYLES L., MCCARTNEY A.L., RASTALL R., ROWLAND I., WOLVERS D., WATZL B., SZAJEWSKA H., STAHL B., GUARNER F., RESPONDEK F., WHELAN K., COXAM V., DAVICCO M.J., LÉOTOING L., WITTRANT

- Y., **DELZENNE N.M., CANI P.D., NEYRINCK A.M. and MEHEUST A. (2010)**. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.*, **104(2)**, S1-S63.
- **ROBERTSON J.A., DE MONREDON F.D., DYSSSELER P., GUILLON F., AMADO R. and THIBAUT J-F. (2000)**. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **33**, 72–79.
- **RODIS P.S., KARATHANOS V.T. and MANTZAVINO A. (2002)**. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agr. Food Chem.*, **50**, 596–601.
- **RODRIGUEZ J., DI PIERRO D., GIOIA M., MONACO S., DELGADO R., COLETTA M. and MARINI S. (2006)**. Effects of a natural extract from *Mangifera indica* L, and its active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1760**, 1333–1342.
- **RODRÍGUEZ R, JIMÉNEZ A, FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J, GUILLÉN R. and HEREDIA A. (2006)**. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends Food Sci. Technol.*, **17(1)**, 3–15.
- **RODRÍGUEZ G., LAMA A., RODRÍGUEZ R., JIMÉNEZ A., GUILLÉN R., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J. (2008)**. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technol.*, **13**, 5261-5229.
- **ROGINSKY V. and LISSI E.A. (2005)**. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, **92**, 235–254.
- **ROHRER J.S. and OLECHNO J.D. (1992)**. Secondary isotope effect: The resolution of deuterated glucoses by anion-exchange chromatography. *Anal. Chem.*, **64**, 914-916.
- **ROIG A., CAYUELA M.L. and SANCHEZ-MONEDERO M.A. (2006)**. An overview on olive mill wastes and their valorization methods. *Waste Manage.*, **26**, 960–9.
- **ROLLET-LABELLE E., GRANGE M. J., ELBIM C., MARQUETTY C., GOUGEROT-POCIDALO M.A. and PASQUIER C. (1998)**. Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 563–572.
- **ROUAU X., CHEYNIER V., SURGET A., GLOUX D., BARRON C., MEUDEEC E., LOUIS-MONTERO J. and CRITON M. (2003)**. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry*, **63**, 899-903.
- **ROWLAND I.R., MALLETT A.K. and WISE A. (1985)**. The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities. *Crit. Rev. Toxicol.*, **16**, 31–103.
- **RUCH R. J., CHENG S.J. and KLAUNIG J.E. (1989)**. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, **10**, 1003–1008.
- **RUIZ G. (2005)**. Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. France
- **RUIZ-MATUTE A.I., HERNANDEZ-HERNANDEZ O., RODRIGUEZ-SANCHEZ S., SANZ M.L. and Martinez-Castro I. (2011)**. Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *J. Chromatogr. B.*, **879**, 1226–1240.
- **RYAN D., PRENZLER P.D., LAVÉE S., ANTOLOVICH M. and ROBARDS K. (2003)**. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2532–8.
- **RYAN D. and ROBARDS K. (1998)**. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, **123**, 31R–44R.
- **RYAN D., ROBARDS K. and LAVÉE S. (1999)**. Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. (A)*, **832**, 87–96.
- **SAAD N., DELATTRE C., URDACI M., SCHMITTER J.M. and BRESSOLLIER P. (2013)**. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Sci. Technol.*, **50**, 1-16.

- SAIJA A., TROMBETTA D., TOMAINO A., CASCIO R.L., PRINCI P., UCCELLA N., BONINA F. and CASTELLI F. (1998). 'In vitro' evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int. J. Pharm.*, **166**, 123–133.
- SAITO Y., TAKANO T. and ROWLAND I. (1992). Effects of soy- bean oligosaccharides on the human gut microflora in *in vitro* culture, *Microb. Ecol. Health Dis.*, **5**, 105-110.
- SALVADOR M.D., ARANDA F. and FREGAPANE G. (2001). Influence of fruit ripening on "Cornicabra" virgin olive oil quality. A study of four successive crop seasons. *Food Chem.*, **73**, 45–53.
- SAMANTA A.K., JAYAPAL N., SENANI S., KOLTE A.P. and SRIDHAR M. (2013). Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Braz. J. Microbiol.*, **44**, 1–14.
- SÁNCHEZ-MORAL P. and RUIZ-MÉNDEZ M.V. (2006). Production of pomace olive oil. *Grasas Aceites*, **57**(1), 47–55.
- SANDERSON I.R. (2007). Dietary modulation of GALT. *J. Nutr.*, **137**, 2557S–2562S.
- SANGEETHA P., BALU M., HARIPRIYA D. and PANNEERSELVAM C. (2005). Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins. *Exp. Gerontol.*, **40**, 820–828.
- SATO Y., KAMO S., TAKANISHI T. and SUZUKI Y. (1995). Mechanism of free radicals induced haemolysis of human erythrocytes: haemolysis by water-soluble radical initiator. *Biochemistry*, **34**, 8940–8949.
- SAVARESE M., DE MARCO E. and SACCHI R. (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem.*, **105** (2), 761-770.
- SCALBERT A., MONTIES B., LALLEMAND J., GUITTET E. and ROLANDO C. (1985). Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*, **24**, 1359–1362
- SCHEPPACH W., BARTRAM P., RICHTER A., RICHTER F., LIEPOLD H., DUSEL G., HOFSTETTER G., RÜTHLEIN J. and KASPER H. (1992). Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, **16**(1), 43-48.
- SCHLEY P.D. and FIELD C.J. (2002). The immune enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Brit. J. Nutr.*, **87** (2), 221–230.
- SCHOLS H.A. and VORAGEN A.G.J. (1996). Progress in Biotechnology. In VISSER J. and VORAGEN A.G.J (Ed.) Pectins and Pectinases. 3-19. Elsevier, Amsterdam.
- SEIFRIED H.E., ANDERSON D.E., FISHER E.I. and MILNER J.A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.*, **18**(9), 567-79.
- SELVENDRAN R.R. (1985). Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *J. Cell. Sci.*, **2**, 51-88.
- SELVENDRAN R.R. and O'NEIL M.A. (1987). Isolation and analysis of cell walls from plant material. *Method. Biochem. Anal.*, **32**, 25-153.
- SEN S, CHAKRABORTY R, SRIDHAR C, REDDY Y.S.R. and De B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int. J. Pharm Sci. Rev. and Res.*, **3**(1), 91-100.
- SENANI N. et MOULTI-MATI. (2012). Etude du pouvoir antifongique des extraits phénoliques issus des margines de la variété chamlal (*olea europea*) sur des souches *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. *TJMPNP.*, **8** (1), 44-48.
- SENTURK U.K., GUNDUZ F., KURU O., AKTEKIN M.R., KIPMEN D. YALCIN O., KUCUKATAY M.B., YESILKAYA A. and BASKURT O.K. (2001). Exercise-induced oxidative

- stress affects erythrocyte in sedentary rats but not exercise-trained rats. *J. Appl. Physiol.*, **91**, 1999–2004.
- **SERAFINI M. (2006)**. The role of antioxidants in disease prevention. *Medicine*, **34(12)**, 533–535.
 - **SERVAIS S. (2004)**. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : effets de l’âge et d’une supplémentation en oméga-3. Thèse de Doctorat. Université de Claude Bernard- Lyon 1. France.
 - **SERVILI M., SELVAGGINI R., ESPOSTO S., TATICCHI A., MONTEDORO G.F. and MOROZZI G. (2004)**. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr.*, **1054 (1–2)**, 113–127.
 - **SHAH N.P. (2001)**. Functional foods, probiotics and prebiotics. *Food Technol-Chicago.*, **55**, 46–53.
 - **SHAHIDI F. and NACZK M. (2004)**. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL.
 - **SHAREEF A., PARNIS C.J., ANGOVE M.J., WELLS J.D. and JOHNSON B.B. (2004)**. Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamidend N-(tert.-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 alpha-ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **1026**, 295–300.
 - **SHARMA R. and PREMACHANDRA B.R. (1991)**. Membrane-bound hemoglobin as a marker of oxidative injury in adult and neonatal red blood cells, *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **46**, 33–44.
 - **SHIVA SHANKAR REDDY C.S., SUBRAMANYAM M.V.V., VANI R. and ASHA DEVI S. (2007)**. *In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes : effect of antioxidant supplements. *Toxicol. in Vitro*, **21**, 1355–1364.
 - **SHOWALTER A.M. (2001)**. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol. Life Sci.*, **58**, 1399-1417.
 - **SILA D.N., BUGGENHOUT S.V., DUVETTER T., FRAEYE I., DE ROECK A., LOEY A.V. and HENDRICKX M. (2009)**. Pectins in processed fruits and vegetables: part II - structure-function relationships. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **8**, 86–104.
 - **SIMAO C.A., SUZUKAWA A.A., CASADO M.F., OLIVEIRA R.D., GUARNEIR F.A. and CECCHINI R. (2006)**. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,20-azobis (amidinopropane). *Life Sci.*, **78**, 1202–1210.
 - **SINGH N. and RAJINI P.S. (2008)**. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chem-Biol. Interact.*, **173**, 97–104.
 - **SINOLEA (1991)**. European Patent No. 0252025®, Munich, 2 January 1991. Property of Rapanelli Co., Foligno, Italy .
 - **SIVAM A.S., SUN-WATERHOUSE D., PERERA C.O. and WATERHOUSE G.I.N. (2013)**. Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. *Food Res. Int.*, **50**, 574–585.
 - **SLAVIN J. (2013)**. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients*, **5**, 1417-1435.
 - **SOMERVILLE C., BAUER S., BRININSTOOL G., FACETTE M., HAMANN T., MILNE J., OSBORNE E., PAREDEZ A., PERSON S., RAAB T., VORMERK S. and YOUNGS H. (2004)**. Towards a System Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, **306 (5705)**, 2206-2211.
 - **SOUSA A., FERREIRA I.C.F.R., BARROS L., BENTO A. and PEREIRA J.A. (2008)**. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “alcaparras”. *LWT- Food Sci. Technol.*, **41**, 739–745.
 - **SPAHIS N., ADDOUN A. and MAHMOUDI H. (2007)**. Study on solar adsorption refrigeration cycle utilizing activated carbon prepared from olive stones. *Rev. Energ. Renouvelables*, **10(3)**, 415–20.

- SPAHIS N., ADDOUN A., MAHMOUDI H. and GHAF FOUR N. (2008). Purification of water by activated carbon prepared from olive stones. *Desalination*, **222**, 519–27.
- SPIK G. and MONTREUIL J. (1964). 2 causes of error in colorimetric determinations of total neutral sugars. *bull. soc. chim. boil.*, **46**, 739-49.
- STASINAKIS A.S., ELIA I., PETALAS A.V. and HALVADAKIS C.P. (2008). Removal of total phenols from olive- mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace. *J. Hazard Mater.*, **160**, 408–13.
- SUN R.C., SUN X.F. and ZHANG, S.H. (2001). Quantitative Determination of Hydroxycinnamic Acids in Wheat, Rice, Rye, and Barley Straws, Maize Stems, Oil Palm Frond Fiber, and Fast-Growing Poplar Wood. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5122-5129.
- SYNITSYA A., MLČKOVA K., SYNITSYA A., JABLONSKY I., SPEVACEK J., ERBAN V., ELIŠKA KOVAŘIKOVA E. and COPIKOVA J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr. Polym.*, **76**, 548–556.
- SZWAJGIER D. and JAKUBCZYK A. (2011). Production of extracellular ferulic acid esterases by *Lactobacillus* strains using natural and synthetic carbon sources. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, **10**(3), 287-302.
- TANAKA T., SHNIMIZU M. and MORIWAKI H. (2012). Cancer Chemoprevention by Carotenoids. *Molecules*, **17**, 3202-3242.
- TANILGANA K., ÖZCANB M.M. and ÜNVERB A. (2007). Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L.) varieties and their oils. *Grasas Aceites*, **58** (2), 142-147.
- TANNER M.J.A. and BOXER D.H. (1972). Separation and some properties of the major proteins of the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.*, **129**, 333-347.
- TEDESCO I., RUSSO G.L., NAZZARO F., RUSSO M. and PALUMBO R. (2001). Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *J. Nutr. Biochem.*, **12**, 505–511.
- TERAQ J., PISKULA M. and YAO Q. (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 278–284.
- THANNICKAL V.J. and FANBURG B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **279**, L1005–L1028.
- THOMPSON J.E. and FRY S.C. (2000). Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta*, **211**, 275-286.
- TIEN M.T., GIRARDIN S.E., REGNAULT B., Le BOURHIS L., DILLIES M.A., COPPEE J.Y., BOURDET-SICARD R., SANSONETTI P.J. and PÉDRON T. (2006). Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.*, **176**, 1228-1237.
- TSIMIDOU M., PAPADOPOULOS G. and BOSKOU D. (1992). Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reverse-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chem.*, **44**, 53–60.
- UYESAKA N., HASEGAWA S., ISHIOKA N., ISHIOKA R., SHIO H. and SCHECHTER A.N. (1992). Effects of superoxide anions on red cell deformability and membrane proteins. *Biorheology*, **29**, 217–229.
- VALIENTE C., ARRIGONI E., ESTEBAN RM. and AMADÓ R. (1995). Chemical composition of olive by-product and modifications through enzymatic treatments. *J Sci Food Agric*, **69**:27–32.
- VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J., CRONIN M.T.D., MAZUR M. and TELSER J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell B*, **39**, 44–84.

- VAN DE WIELE T., BOON N., POSSEMIERS S., JACOBS H. and VERSTRAETE W. (2007). Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl. Microbiol.*, **102**, 452-60.
- VARDAKOU M., PALOP C.N., CHRISTAKOPOULOS P., FAULDS C.B., GASSON M.A. and NARBAD A. (2008). Evaluation of prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora. *Int. J. Food Microbiol.*, **123**, 166–170.
- VEILLET S. (2010). Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France.
- VEKIARI S.A., PAPADOPOULOU P. and KOUTSAFTAKIS A. (2002). Comparison of different olive oil extraction systems and the effect of storage conditions on the quality of the virgin olive oil. *Grasas Aceites*, **53**, 324–9.
- VERNAZZA, C.L., GIBSON G.R. and RASTALL R.A. (2006). Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of Bifidobacterium. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 846-853.
- VERSTRAETEN SV., KEEN CL., SCHMITZ H.H., FRAGA CG. and OTEIZA PI. (2003). Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 84–92.
- VINCKEN J-P. VAN DEN BROEK L.A.M., VAN DER LEI D.D., BELDMAN G. and VORAGEN, A.G.J. (1997). Fungal and plant xyloglucanases may act in concert during liquefaction of apples. *J. Sci. Food Agric.*, **73**, 407-416.
- VINHA A.F., FERRERES F., SILVA B.M., VALENTAO P., GONCALVES A., PEREIRA J.A., OLIVEIRA M.B., SEABRA R.M. and ANDRADE P.B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.*, **89**, 561–568.
- VIERHUIS E., SCHOLS H. A., BELDMAN G. and VORAGEN A.G.J. (2000). Isolation and characterization of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki) at different ripening stages. *Carbohydr. Polym.*, **44**, 51–62.
- VIERHUIS E, SCHOLS H.A., BELDMAN G. and VORAGEN A.G.J. (2001). Structural characterization of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki). *Carbohydr. Polym.*, **44**, 51–62.
- VIERHUIS E., SERVILI M., BALDIOLI M., SCHOLS H.A., VORAGEN A.G.J. and MONTEDORO G. (2001). Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1218–23.
- VIERHUIS E., YORK W.S., KOLLI V.S.K., VINCKEN J-P, SCHOLS H.A., VAN ALEBEEK G-J.W.M. and VORAGEN A.G.J. (2001). Structural analyses of two arabinose containing oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. *Carbohydr. Res.*, **332**, 285–97.
- VIERHUIS E. (2002). Structural characteristics of polysaccharides from olive fruit cell walls in relation to ripening and processing. Thèse de Doctorat. Université de Wageningen. Allemagne.
- VIERHUIS E., KORVER M., SCHOLS H.A. and VORAGEN, A.G.J. (2003). Structural characteristics of pectic polysaccharides from olive fruit (*Olea europaea* cv moraiolo) in relation to processing for oil extraction. *Carbohydr. Polym.*, **51**, 135–48.
- VILLARES A., MATEO-VIVARACHO L. and GUILLAMÓN E. (2012). Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms. *Agriculture*, **2**, 452-471.
- VISIOLI F., BELLOMO G., MONTEDORO G.F. and GALLI C. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, **117**, 25-32.
- VISIOLI F., BELLOMO G. and GALLI C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**(1), 60–64.

- VISIOLI F., POLI A. and GALLI C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.*, **22**(1), 65–75.
- VORAGEN A.G.J., PILNIK W., THIBAUT J-F., AXELOS M.A.V. and RENARD C.M.G.C. (1995). Pectins. In: Food polysaccharides and their applications. A.M. Stephen (ed), New York: Dekker, 287-339.
- VORAGEN A.G.J., BELDMAN G. and SCHOLS H.A. (2001). Chemistry and enzymology of pectins. In MCCLEARY B. V. and PROSKY L. (Eds.), Advanced dietary fibre technology (pp. 379-398). Oxford: Blackwell.
- VORAGEN A.G.J., SCHOLS H. and VISSER R. (2003). Advances in Pectin and Pectinase Research. Netherlands. Kluwer Academic Publishers.
- VLYSSIDES A.G., LOIZIDES M. and KARLIS P.K. (2004). Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *J. Clean. Prod.*, **12**, 603–611.
- WAFFENSCHMIDT S. and JAENICKE L. (1987). Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchinate. *Anal. Biochem.*, **165**, 337–340.
- WALDRON K.W. and SELVENDRAN R.R. (1992). Cell-wall changes in immature asparagus stem tissue after excision. *Phytochemistry*, **31**, 1931-1940.
- WALLACE G., RUSSELL W.R., LOMAX J.A., JARVIS M.C., LAPIERRE C. and CHESSON A. (1995). Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. *Carbohydr. Res.*, **272**, 41–53.
- WANG Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Res. Int.*, **42**, 8–12.
- WANG Z. and LUO D. (2007). Extraction, purification and antioxidant activities of polysaccharide from *Dioscorea nipponica* Makino. *Nature Production Research Development*, **19**, 29–34.
- WANG X., BROWN I L., KHALED D., MAHONEY M.C., EVANS A.J. et CONWAY P.L. (2002). Manipulation of colonic bacteria and volatile fatty acid production by dietary high amylose maize (amylomaize) starch granules. *J. Appl. Microbiol.*, **93**, 390-397.
- WANG H., GAO X.D., ZHOU G.C., CAI L. and YAO W.B. (2008). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chem.*, **106**, 888–895.
- WHITCOMBE, A.J., O'NEILL, M.A., STEFFAN, W., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. (1995). Structural characterization of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan-il, *Carbohydr. Res.*, **271**, 15-29.
- WICHENCHOT S., PRASERTSAN P., HONGPATTARAKERE T., GIBSON G.R. and RASTALL R.A. (2006). *In vitro* three-stage continuous fermentation of gluco-oligosaccharides produced by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 by the human colonic microflora. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, **7**, 13–18.
- WICHENCHOT S., JATUPORNPIPAT M. and RASTALL R.A. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem.*, **120**, 850–857.
- WICKER L., KIM Y., KIM M.J., THIRKIELD B., LIN Z. and JUNG J. (2014). Pectin as a bioactive polysaccharide-Extracting tailored function from less. *Food Hydrocoll.*, **42** (2), 251-259.
- WINARTI S., HARMAYANI E., MARSONO Y. and PRANOTO Y. (2013). Effect of inulin isolated from lesser yam (*Dioscorea esculenta*) on the growth of probiotics bacteria and SCFA formation during fermentation. *IRJM.*, **4**(2), 53-63.
- WINYARD P.G., MOODY C.J. and JACOB C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem. Sci.*, **30**(8), 453–461.
- WIRTH D., CHRISTIANS E.S., DRION P.V., DESSY-DOIZE C. et GUSTIN P. (2003). Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Ann. Méd. Vét.*, **147**, 127-144.

- **WLODEK L.** and **KUSIOR D.** (2006). Oxidative hemolysis of erythrocytes. *BAMBED.*, **34** (6), 438–443.
- **WONG S.P.**, **LEONG L.P.** and **KOH J.H.W.** (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.*, **99**, 775–783.
- **WU G.H.**, **HU T.**, **LI Z.Y.**, **HUANG Z.L.** and **JIANG, J.G.** (2014). In vitro antioxidant activities of the polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. *Food Chem.*, **148**, 351–356.
- **XING R.E.**, **LIU S.**, **GUO Z.Y.**, **YU H.H.**, **WANG P.B.**, **LI C.P.**, **LI Z.E.** and **LI P.C.** (2005). Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates *in vitro*. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**(4), 1387-1392.
- **XU R.**, **YE H.**, **SUN Y.**, **TU Y.** and **ZENG X.** (2012). Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). *Food Chem. Toxicol.*, **50**, 2473–2480.
- **YAMAGUCHI T.**, **TAKAMURA H.**, **MATOKA T.** and **TERAO J.** (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1201–1204.
- **YAN R.**, **LI S.L.**, **CHUNG H.S.**, **TAM Y.K.** and **LIN G.** (2005). Simultaneous quantification of 12 bioactive components of *Ligusticum chuanxiong* Hort. by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **37**, 87–95.
- **YANG J.G.** and **UCHIYAMA T.** (2000). Dehydrodimers of caffeic acid in the cell walls of suspension-cultured *Mentha*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**(4), 862–864.
- **YANG B.**, **ZHAO M.**, **PRASADK N.**, **JIANG G.** and **JIANG Y.** (2010). Effect of methylation on the structure and radical scavenging activity of polysaccharides from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Food Chem.*, **118**, 364–368.
- **YANG J.G.**, **MA Y.Y.**, **LIN Y.**, **LIN Q.** and **WU H.** (2014). Study on the cross-links between wall polysaccharides by dehydrodimers of hydroxycinnamic acids during the cessation of cell elongation. *J. Chem. Pharm. Res.*, **6** (7), 1460-1466.
- **YANGUI T.**, **DHOUB A.**, **RHOUMA A.** and **SAYADI S.** (2009). Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chem.*, **117**, 1–8.
- **YANGUI T.**, **SAYADI S.**, **GARGOUBI A.** and **DHOUB A.** (2010). Fungicidal effect of hydroxytyrosol-rich preparations from olive mill wastewater against *Verticillium dahliae*. *Crop Protection*, **29**, 1208–13.
- **YEN G-C.**, **DUH P-D.** and **TSAI H-L.** (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.*, **79**, 307–313.
- **YUAN X.**, **WANG J.**, **YAO H.** and **CHEN F.** (2005). Free radical-scavenging capacity and inhibitory activity on rat erythrocyte hemolysis of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **38**, 877–883.
- **YUAN H.M.**, **ZHANG W.W.**, **LI X.G.**, **LÜ X.X.**, **LI N.**, **GAO X.L.** and **SONG J.M.** (2005). Preparation and *in vitro* antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated and phosphorylated derivatives. *Carbohydr. Res.*, **340**, 685-692.
- **YUN C.H.**, **ESTRADA A.**, **VAN KESSEL A.**, **GAJADHAR A.**, **REDMOND M.J.** and **LAARVELD B.** (1998). Immunomodulatory effects of oat β -glucan administered intragastrically or parenterally on mice infected with *Eimeria vermiformis*. *Microbiol. immunol.*, **42**, 457–465.
- **ZAIDEL D.N.A.** and **MEYER A.S.** (2012). Biocatalytic cross-linking of pectic polysaccharides for designed food functionality: Structures, mechanisms, and reactions. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **1**, 207–219.
- **ZARKOVIC N.** (2003). 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects Med.*, **24** (4-5), 281-91.

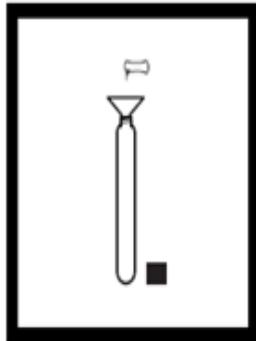
- **ZENG J., LI G., GAO H. and RU Z. (2011)**. Comparison of A and B Starch Granules from Three Wheat Varieties. *Molecules*, **16**, 10570-10591.
- **ZENG W.C., ZHANG Z., GAO H., JIA L.R. and CHEN W.Y. (2012)**. Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction. *Carbohydr. Polym.*, **89**, 694– 700.
- **ZENJARI B., EL HAJJOUJI H., AIT BADDI G., BAILLY J-R, REVEL J-C, NEJMEDDINE A. and HAFIDI M. (2006)**. Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater-straw mixtures. *J. Hazard Mater.*, **138**, 433–7.
- **ZERVAKIS G., YIATRAS P. and BALIS C. (1996)**. Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **38**, 237–43.
- **ZYKWINSKA A., GAILLARD C., BULEON A., PONTOIRE B., GARNIER C., THIBAUT J.F. and RALET M.C. (2007)**. Assessment of in vitro binding of isolated pectic domains to cellulose by adsorption isotherms, electron microscopy, and X-ray diffraction methods. *Biomacromolecules*, **8**, 223-232.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1 : Méthode 10072**AZOTE TOTAL, gamme haute, Test 'N Tube (10,0 à 150,0 mg/l N)****Méthode de digestion TNT au persulfate alcalin**

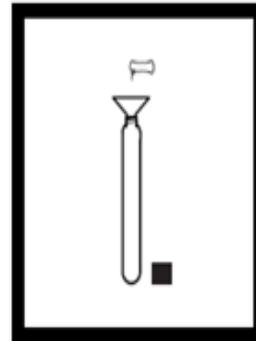
1. Allumer le réacteur DCO. Préchauffer à 103-106 °C (la température optimale est 105 °C). Placer l'écran de sécurité devant le réacteur.



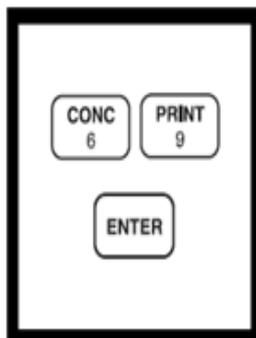
2. Préparer un blanc de réactif : Avec un entonnoir, ajouter le contenu d'une gélule de réactif persulfate pour azote total dans un tube de réactif hydroxyde pour azote total GH.



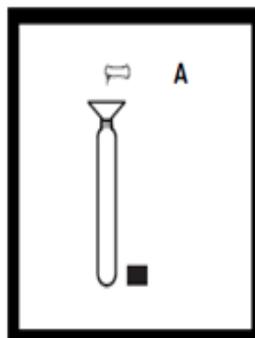
3. Ajouter 0,5 ml d'eau exempte de matière organique. Boucher et agiter vigoureusement pendant environ 30 secondes. Traiter ce blanc de réactif exactement comme l'échantillon, incluant la digestion et la mesure colorimétrique. Passer à l'étape 6.



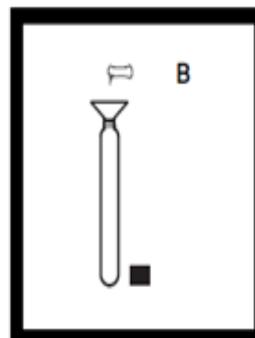
4. Préparer l'échantillon : Avec un entonnoir, ajouter le contenu d'une gélule de réactif persulfate pour azote total dans un tube de réactif hydroxyde pour azote total GH.



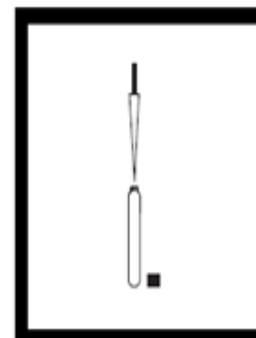
5. Ajouter 0,5 ml d'échantillon au tube. Boucher le tube, agiter vigoureusement pendant environ 30 secondes.



6. Placer les deux tubes dans le réacteur DCO. Chauffer pendant 30 minutes.



7. Avec des doigts de protection ou des gants, retirer les tubes chauds du réacteur. et laisser refroidir à la température ambiante.



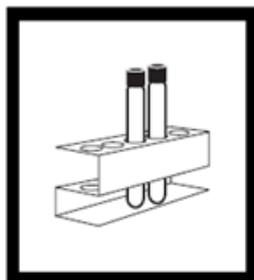
8. Entrer le numéro de programme mémorisé pour l'azote total GH Test 'N Tube. Presser : **PRGM** L'affichage indique : **PRGM ?**



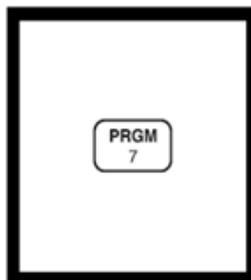
9. Presser : **69 ENTER**
L'affichage indique **mg/l, N** et le symbole **ZERO**



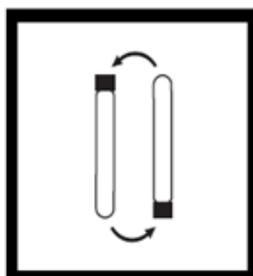
10. Retirer le bouchon des tubes digérés refroidis et ajouter le contenu d'une gélule de réactif NT A à chaque tube. Boucher les tubes et agiter pendant 15 secondes.



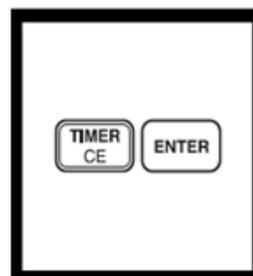
11. Lorsque le minuteur sonne, retirer le bouchon des tubes et ajouter le contenu d'une gélule de réactif NT B à chaque tube. Boucher les tubes et agiter pendant 15 secondes. L'affichage indique : **02:00 Timer 2**
Presser **ENTER** après agitation. Une période de réaction de 2 minutes commence.



12. Lorsque le minuteur sonne, retirer le bouchon de deux tubes de réactif NT C et ajouter 2 ml d'échantillon digéré traité à un tube. Ajouter 2 ml de blanc de réactif digéré traité au second tube de réactif NT C.



13. Boucher et étourmer 10 fois pour mélanger. Les tubes deviennent chauds.



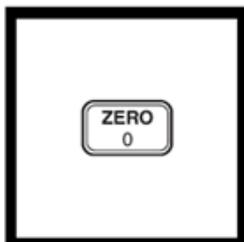
14. L'affichage indique : **05:00 Timer 3**
Presser : **ENTER**
Une période de réaction de 5 minutes commence. Ne plus retourner les tubes.



15. Placer l'adaptateur de tube DCO/TNT dans le puits de mesure en le tournant pour qu'il tombe en place. L'enfoncer pour qu'il soit correctement installé.



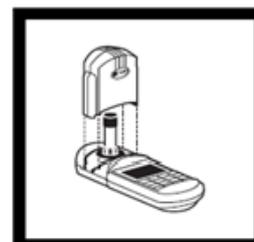
16. Lorsque le minuteur sonne, essuyer avec un tissu propre l'extérieur du tube de réactif acide NT C contenant le blanc de réactif. Placer le blanc dans l'adaptateur avec le logo Hach dirigé vers l'opérateur. Presser verticalement sur le haut du tube jusqu'à ce qu'il soit solidement en place dans l'adaptateur. Ajuster le capot de l'appareil pour couvrir le tube.



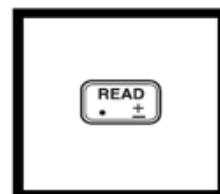
17. Presser : **ZERO**
Le curseur se déplace vers la droite puis l'affichage indique : **0 mg/l N**



18. Essuyer avec un tissu propre l'extérieur du tube de réactif acide NT C contenant l'échantillon préparé.

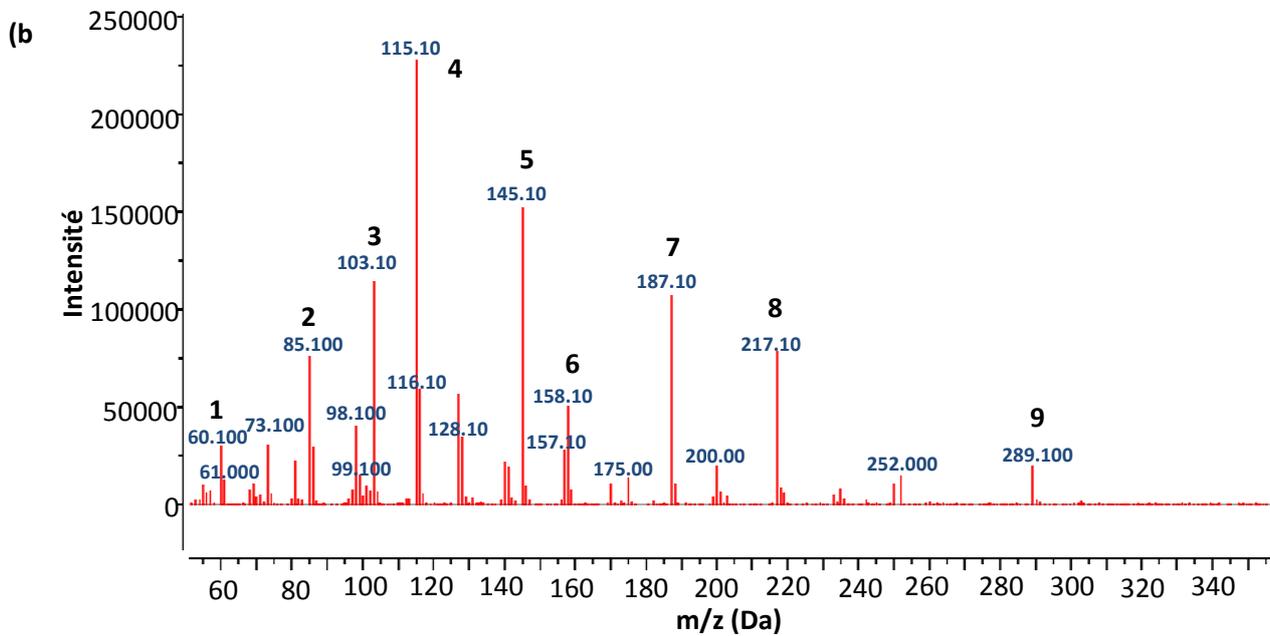
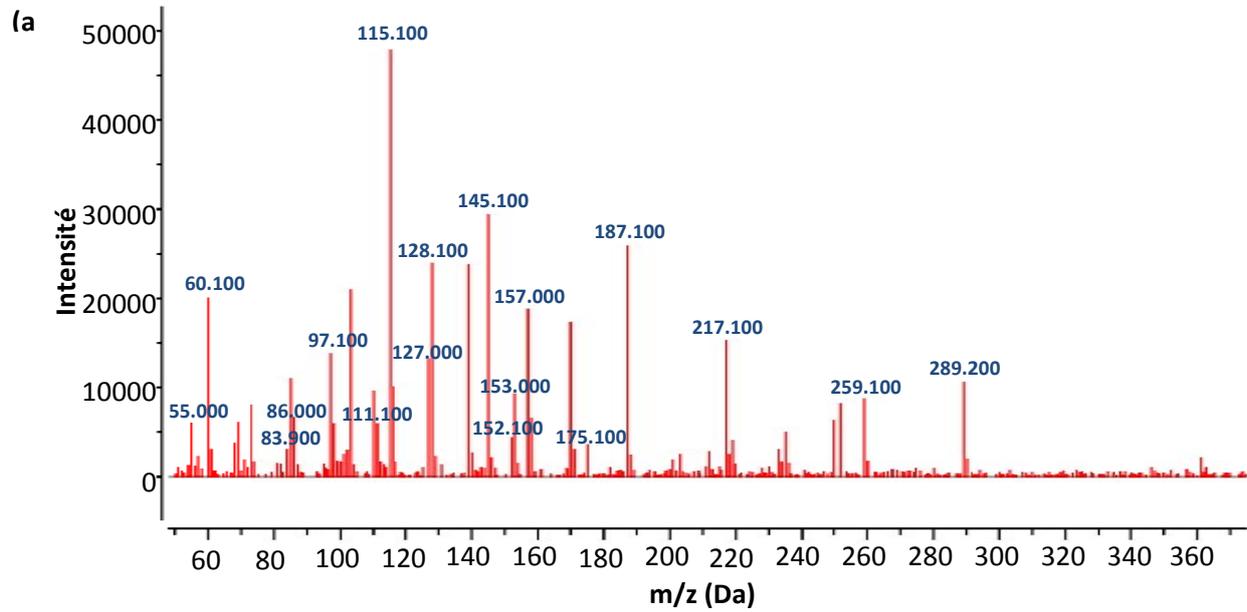


19. Placer le tube dans le puits de mesure avec le logo Hach dirigé vers l'opérateur. Presser verticalement sur le haut du tube jusqu'à ce qu'il soit solidement en place dans l'adaptateur. Ajuster le capot de l'appareil pour couvrir le tube.

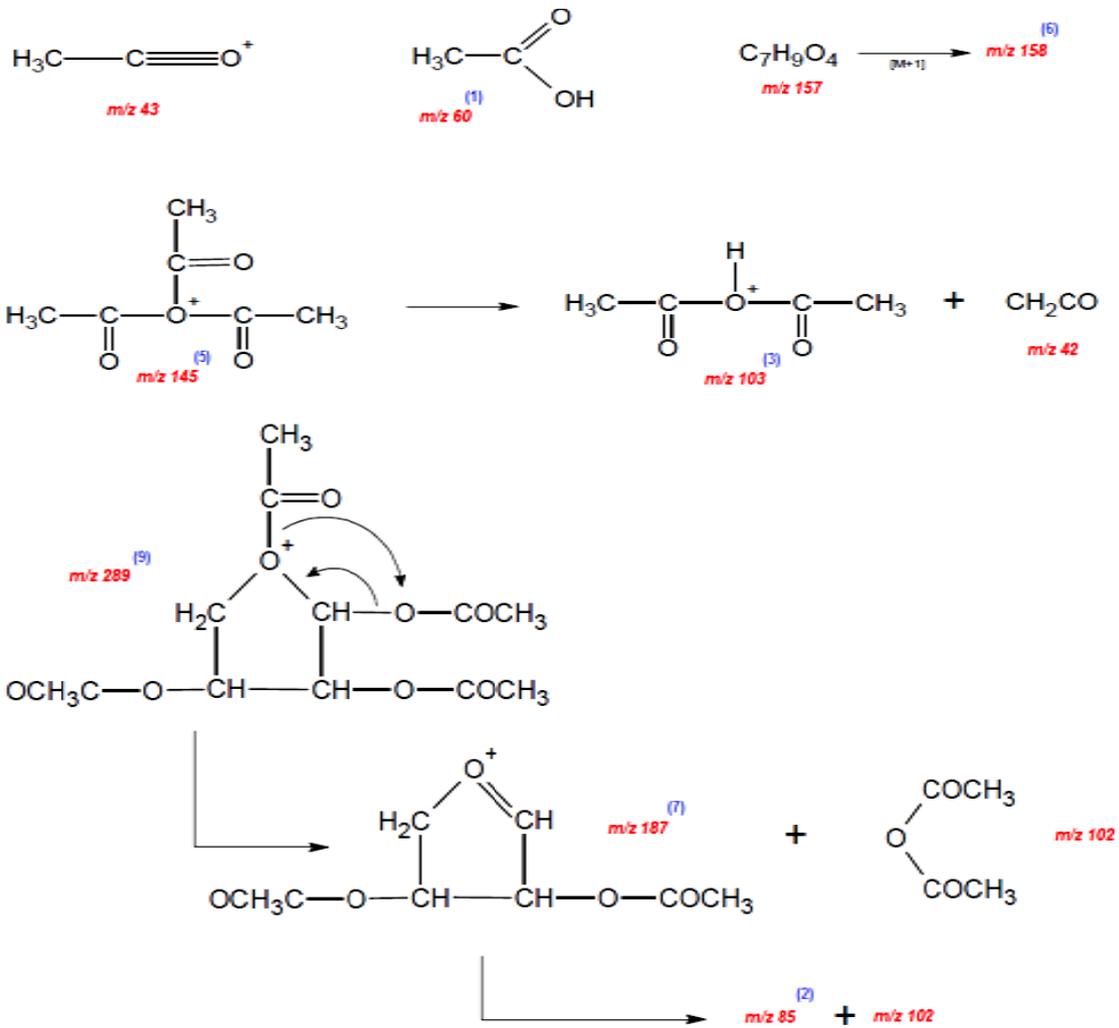


20. Presser : **READ**
Le curseur se déplace vers la droite puis le résultat en mg/l d'azote total (N) s'affiche.

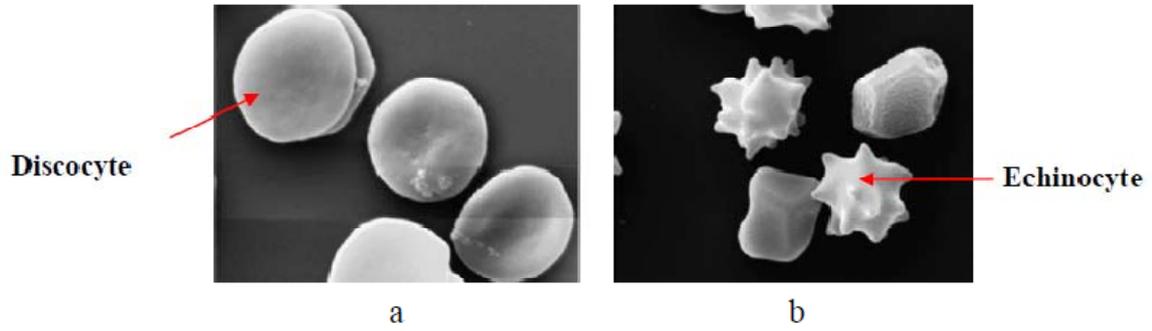
Annexe 3 : Spectre de masse (EI) du D-glucitol hexaacétate (a) et du L-arabitol pentaacétate (b).



Annexe 4 : Voies de fragmentation d'acétates d'alditols par CGP/SM en Impact Electronique (EI, 70 eV).



Annexe 5 : Micrographie électronique (X 4000) d'érythrocytes normales (a) et d'érythrocytes traités par H₂O₂ (b) (SINGH et RAJINI, 2008).



*Publications et
communications*

Publications et communications

Ce travail de thèse a été valorisé par les publications et les communications ci-après :

Publications :

-**Nadour M.**, Laroche C., Pierre G., Delattre C., Moulti-Mati F. and Michaud P. (2015). Structural characterization and biological activities of polysaccharides from olive mill wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, in press.

-Dermeche M., **Nadour M.**, Larroche C., Moulti-Mati F. and Michaud P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. A review. *Process Biochemistry*, 48, 1532-1552.

-**Nadour M.**, Michaud P. and Moulti-Mati F. Antioxidant Activities of Polyphenols Extracted from Olive (*Olea europaea*) of *Chamlal* Variety. (2012). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(6), 802-10.

Nadour M., Moulti-Mati F., Michaud P. and Laroche C. (2012). Composition, structure and valorisation of fibres from olive fruit and by products. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 23 (6), 18-22.

Communications:

-**Nadour M.**, Laroche C., Moulti-Mati F. and Michaud P. (2014). Valorization of polysaccharidic fraction of olive oil processing by-products. *13th International Conference on Bioplastics, Biocomposites & Biorefining (ICBBB)*, 19-24 Mai, Guelph, Ontario, Canada.

-**Nadour M.**, Laroche C., Moulti-Mati F. and Michaud P. (2011). Extraction and characterisation of polysaccharides from olive by-products. *Conférence internationale "New Horizons in biotechnology"*, 21- 24 Novembre, Trivandrum, Inde.

-**Nadour M.**, Mati A. et Moulti-Mati F. (2010). Pouvoirs réducteur et anti-hémolytique des polyphénols de l'olive variété *chamlal*. Séminaire des journées internationales de biotechnologie, 19-22 Décembre, Tunisie.

Antioxidant Activities of Polyphenols Extracted from Olive (*Olea europaea*) of *Chamlal* Variety

M. Nadour · P. Michaud · F. Moulti-Mati

Received: 21 October 2011 / Accepted: 22 February 2012 /
Published online: 9 March 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract The antioxidant properties of phenolic compounds from olive pulp (PCO) of *chamlal* variety and those of individual phenolic compounds were evaluated and compared with that of vitamin C (Vit C). The antioxidant activity was measured by the tests of iron reduction and scavenging hydrogen peroxide (H_2O_2). Results showed that all the substances tested exhibit a reducing power. The PCO present activities of iron reduction and H_2O_2 scavenging higher than those of Vit C. The protective effect of PCO against oxidation of lipids and proteins from erythrocyte membranes was studied. The measurement of malondialdehyde generated under oxidative stress conditions induced by hydroxyl radicals generating system revealed that PCO have the most significant protective activity against lipid peroxidation ($IC_{50}=49.27\pm 1.91 \mu g mL^{-1}$). Paradoxically, Vit C revealed a pro-oxidant effect. Proteins oxidation was evaluated using the $H_2O_2/FeSO_4$ system and electrophoresis. In the presence of PCO at $1 mg mL^{-1}$, proteins of erythrocyte membranes were protected contrary to those treated with Vit C at the same concentration.

Keywords Phenolic compounds · Olive · Antioxidant activities

Introduction

In humans, many physiopathological situations are associated with an increased production of reactive oxygen species (ROS) such as hydroxyl radicals. In this context, the research of natural active molecules as phenolic compounds preventing these pathologies becomes more and more extensive [1, 2]. Phenolic compounds, with over 8,000 structural variants, are secondary metabolites of plants [3]. The main dietary sources of polyphenols include some

M. Nadour · F. Moulti-Mati
Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Faculté des Sciences Biologiques et des
Sciences Agronomiques, Université M. Mammeri, BPN°17, RP 15000 Tizi-Ouzou, Algeria

P. Michaud (✉)
Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut Pascal UMR CNRS 6602, Polytech' Clermont
Ferrand, 24 avenue des landais, BP-20206, 63174 Aubière, France
e-mail: philippe.michaud@univ-bpclermont.fr

common fruits, vegetables, and beverages. These phytochemicals compounds are of considerable physiological and morphological importance in plants where they contribute towards the color and sensory characteristics of fruits and vegetables [4]. Structurally, phenolic compounds comprise an aromatic ring bearing one or more hydroxyl substituents and range from simple phenolic molecules to highly polymerized ones [4]. Most naturally occurring phenolic compounds are present as conjugates with mono-, oligo-, and polysaccharides linked to one or more hydroxyls of phenolic groups. They may also occur as functional derivatives such as esters and methyl esters [5]. Although such structural diversity results in the wide range of phenolic compounds that occur in nature, they can basically be categorized into several classes [5]. Among them, phenolic acids, flavonoids, and tannins are regarded as the main dietary phenolic compounds. Polyphenols show a wide range of biological effects, including antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative, and anti-atherogenic properties. Some dietary polyphenols, such as hydroxytyrosol, flavonols (kaempferol, quercetin, and myricetin), flavones (luteolin and apigenin), flavanols (epigallocatechin-3-gallate), and resveratrol suppressed growth and proliferation of various types of tumor cells via induction of apoptosis or arrest of a specific phase of the cell cycle [3]. Oleuropein, hydroxytyrosol, quercetin, proanthocyanidin, and resveratrol were thought to exert anti-atherosclerosis and cardioprotection. Furthermore, neuroprotective effects of hydroxytyrosol, flavonoids, and curcumin have been also demonstrated [3, 6]. Even if phenolic compounds have many favorable effects on human health, their ability to react with metal ions as iron and copper could make them pro-oxidant, mutagens, and inhibitors of key enzymes involved in hormone metabolism [7].

In this context, the antioxidant activities under oxidative stress conditions ($H_2O_2/FeSO_4$) of phenolic compounds extracted from olive pulp (PCO) of *chamlal* olive variety from the area of kabylia in Algeria were evaluated and compared with vitamin C and some phenolic compounds occurring naturally in olive and taken individually. The objective was to validate the high potential of this olive variety traditionally cultivated in Kabylia as antioxidant agent.

Materials and Methods

Biological Materials

The green olives of *Olea europaea* generated from the variety *chamlal* were harvested in Kabylia region (Algeria) on October 27, 2007. Olives were weighed, separated in fractions of 200 g, and stored at $-20^\circ C$.

The healthy human blood collected on citrate was used to isolate erythrocytes according to the method of Yuan et al. [8]. Human erythrocytes from citrated blood were isolated by centrifugation at $3,000\times g$ for 10 min and washed four times with a 160 mM phosphate buffered saline (PBS) containing 150 mM NaCl, 1.9 mM NaH_2PO_4 , and 8.1 mM Na_2HPO_4 at pH 7.4. They were then resuspended using the same buffer and stored at $4^\circ C$.

Preparation of Erythrocyte Ghost Membranes

The preparation of erythrocyte membranes was carried out according to the method of Shiva Shankar Reddy et al. [9]. To approximately 2 mL of erythrocytes sediments was added 28 mL of hypotonic buffer PBS (20 mOsm, pH 7.4). After gentle swirling, the tubes are centrifuged at $4^\circ C$ for 40 min at $20,000\times g$. After centrifugation, the supernatant was

removed, and the pellets containing ghosts (cell membranes) were suspended in the same buffer and washed by centrifugation under the same conditions before to be stored at 4 °C in PBS.

Extraction of Phenolic Compounds

The extraction was carried out according to the method described by Brenes et al. [10] and modified by Savarese et al. [11]. After defrosting, the olives were stoned and crushed at room temperature. Olive pulp (10 g) was mixed with 30 mL of methanol/water 80:20 (v/v) at room temperature during 30 min. The mixture was then centrifuged (3,000×g, 10 min) and filtered through Whatman filter (8 µm) to remove insoluble particles. This extraction was repeated three times. The extracts were collected, pooled, and methanol was evaporated under vacuum at 40 °C. The water phase was washed three times with hexane (3×15 mL), in order to remove lipids, and phenolic compounds of the aqueous fraction were extracted with ethyl acetate (5×20 mL). After evaporation of ethyl acetate under vacuum at 40 °C, the dry residue was dissolved in 2 mL of methanol. The phenolic extracts were stored at 4 °C.

Determination of Total Phenolic Content

The total phenolic compounds content of PCO extracts was determined using Folin–Ciocalteu reagent [12]. Phenolic extract (0.1 mL) was diluted in distilled water until a final volume of 5 mL. Folin–Ciocalteu reagent (0.5 mL) was added, and the mixture was incubated 3 min at room temperature. One milliliter of sodium carbonate (NaCO₃) at 35 % (w/v) was added. After agitation, the volume was adjusted to 10 mL, and the reactive medium was incubated 1 h at room temperature. Absorbances at 725 nm (A_{725}) were then read. Results were expressed in equivalent of gallic acid (GA) (µg mL⁻¹).

Reducing Power

The evaluation of reducing power was carried out according to the protocol described by Oyaizu [13]. To 2.5 mL of sample solutions [PCO, GA, caffeic acid (CA), tannic acid (TA), and Vit C] at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, and 80 µg mL⁻¹) was added 2.5 mL of phosphate buffer composed of 0.066 M KH₂PO₄ and 0.066 M Na₂HPO₄ at pH 6.6 and 2.5 mL of potassium ferricyanide K₃[Fe(CN)₆] 1 % (w/v). After incubation at 50 °C during 20 min, the reaction was stopped by the addition of 2.5 mL of trichloroacetic acid (CCl₃COOH) at 10 % (w/v). The mixture was then centrifuged (1,000×g, 8 min), and the upper layer was collected. A volume of 2.5 mL of it was supplemented with the same volume of distilled water and 1 mL of ferric chloride solution (FeCl₃, 0.1 %). The absorbance at 700 nm (A_{700}) was then measured.

The reducing power, (PR_{0.5AU}), was defined as the amount of material in microgram per milliliter producing an increase of 0.5 absorbance unit.

Scavenging of H₂O₂

The capacity of antioxidant agent to trap H₂O₂ was determined by the method of Ruch et al. [14]. Samples (2 mL) at various concentrations (10, 50, 100, 150, 200, and 250 µg mL⁻¹) were incubated with 1 mL of an H₂O₂ solution at 43 mM prepared in PBS pH 7.4. After 15 min at room temperature, the absorbance of hydrogen peroxide was measured at 230 nm (A_{230}).

The trapping percentage of hydrogen peroxide was calculated according to Eq. (1)

$$\% \text{H}_2\text{O}_2\text{scavenging} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad (1)$$

where A_0 was A_{230} of control (lack of antioxidant agent in sample), and A_1 was A_{230} of the assay.

Lipid Peroxidation

Total protein in erythrocyte ghost membrane was assayed according to the method described by Lowry et al. [15] using bovine serum albumin (BSA) as standard. One milliliter of erythrocyte membrane suspension (1 mg mL^{-1} of protein) was supplemented with $300 \mu\text{L}$ of H_2O_2 (900 mM), $100 \mu\text{L}$ of FeSO_4 (1 mM) and $150 \mu\text{L}$ of sample at various concentrations (20, 80, 150, 200, and $250 \mu\text{g mL}^{-1}$). After 3 h of incubation, the quantification of malondialdehyde (MDA), one of the breakdown products of degraded fatty acid generated during lipid peroxidation, was carried out as follows. One milliliter of the reactive mixture was treated with 2 mL of 1 M HCl solution containing 15 % (w/v) of trichloroacetic acid and 0.75 % (w/v) of thiobarbituric acid (TBA). The reaction mixture was boiled at 100°C for 30 min, cooled in ice [16], and centrifuged ($3\,000\times g$, 10 min). The supernatants containing complexes MDA-TBA were recovered, and their absorbances were measured at 532 nm (A_{532}). The percentage of inhibition of lipid peroxidation was calculated according to Eq. (2).

$$\% \text{inhibition of lipid peroxidation} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad (2)$$

where A_0 was A_{532} of control, and A_1 was A_{532} of assay.

Concentration providing 50 % inhibition (IC_{50}) was calculated from the plot of inhibition (%) against tested compounds concentration.

Evaluation of Oxidative Damages on Erythrocyte Ghost Membrane Proteins by SDS-PAGE

The oxidative modifications of proteins of erythrocyte ghost membranes was determined after Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the method described by Carini et al. [17] with slight modifications. The oxidation of membrane proteins was induced by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$ system. Five hundred microliters of erythrocyte membranes (3.5 mg mL^{-1} of proteins) was mixed with $250 \mu\text{L}$ of FeSO_4 solution (30 mM), $250 \mu\text{L}$ of H_2O_2 solution (50 mM), and $250 \mu\text{L}$ of PBS or sample at various concentrations (1, 2, 4, 6, 8, and 10 mg mL^{-1}). After incubation during 3 h, proteins of samples were separated by SDS-PAGE according to the method of Laemmli and Favre [18] in 12 % polyacrylamide gels at 200 V for 1 h using minicuves HOEFFER SE.280 system (Bio-rad). Proteins were stained with Coomassie blue. Molecular weight markers BSA (66,000 Da), ovalbumin (45,000 Da), β -lactoglobulin (18,000 Da), and α -lactalbumin (14,000 Da) were used for molecular mass determinations.

Statistical Analysis

The values were expressed as the average \pm standard deviation of three measurements. The data were treated by the test of the analysis of variance and the Student's *t* test using statistical package Statistica 6.

Results and Discussion

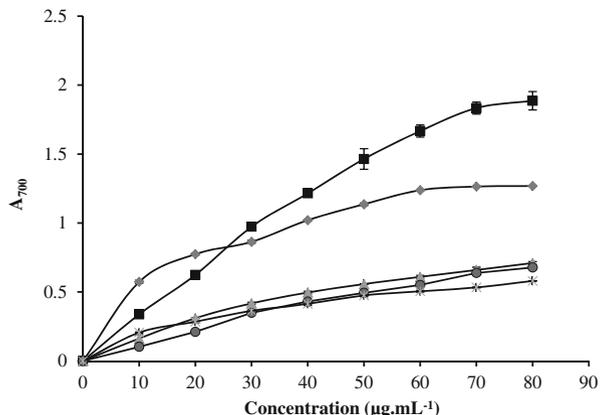
Total Phenolic Content

The total PCO concentration of the analyzed sample of olives was $1,633 \pm 0.16$ mg EqGA/100 g of pulp. This amount of total PCO was in the same range that those obtained by Hajimahmoodi et al. [19] in 2008 with *Conservalina* (888 mg EqGA/100 g) and *Mishen* (2,997 mg EqGA/100 g) cultivars. Note that total PCO content of olive pulp varied according to the conditions of extraction, agronomic parameters (cultivar, climate, agronomic techniques, ...), and fruit ripening [20, 21].

Reducing Power

The reduction of Fe^{3+} was often used to study the capacity of a substance to transfer electrons. This property constitutes an important mechanism of antioxidant activities [22]. Therefore, the reducing power of PCO sample was evaluated and compared with Vit C and pure phenolic compounds using potassium ferricyanide as described in “Materials and Methods.” The objective was to determine the antioxidant properties of PCO extracted from pulp of *chamlal* variety. Results obtained (Fig. 1) showed that all the compounds have a reducing power increasing proportionally with their concentrations. $\text{PR}_{0.5\text{AU}}$ of the various substances tested were evaluated. GA presented the highest reducing power ($\text{PR}_{0.5\text{AU}} = 7.65 \pm 0.43 \mu\text{g mL}^{-1}$). PCO have a $\text{PR}_{0.5\text{AU}}$ of $50.55 \pm 3.33 \mu\text{g mL}^{-1}$ with an activity higher or equivalent than that of Vit C ($57.94 \pm 4.44 \mu\text{g mL}^{-1}$). Other works carried out about the reducing power of PCO from olives confirmed results obtained here with the *chamlal* variety. Effectively, the reduction of iron by PCO from variety *alcaparras* exhibited a reducing power of $360 \mu\text{g mL}^{-1}$ [23]. The antioxidant activity of PCO depends mainly on the phenolic profile, which varies according to the variety of olive. Investigations about six Iranian olive cultivars led to reducing powers expressed in vitamin E contents between 8.6 and 2.4 g/100 g of dry plants [19]. The degree of ripeness influences also the antioxidant potential. During maturation, some changes are produced in the composition of fruit in polyphenols. For example, the quantity in oleuropein decreased, whereas that of the tyrosol and of the hydroxytyrosol increased in ripe olive pulp [24]. This could have a direct impact in reducing power [25].

Fig. 1 Reducing power of phenolic substances depending on concentration: PCO (●), CA (■), GA (◆), TA (▲), and vitamin C (×)



Scavenging of H₂O₂

After the study of reducing power, another activity corresponding to the capacity of PCO to scavenge ROS species as hydrogen peroxide was examined by the method of Ruch et al. [14] as described in “Materials and Methods.” Results significantly different ($p < 0.001$) revealed a correlation between the concentration and the activity of H₂O₂ scavenging by the various substances tested except for CA (Fig. 2). Effectively, for this compound, a significant H₂O₂ scavenging appeared at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and no real evolution was observed for higher concentrations. At the concentrations of 150, 200, and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, PCOs were more active for H₂O₂ scavenging than Vit C and GA. Moreover, the percentage of H₂O₂ scavenging by PCO was equivalent to this of TA for 200 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentrations. Several studies reported that the activity of H₂O₂ trapping increases with the concentration in phenolic compounds [26]. Scavenging activity of hydrogen peroxide by the phenolic compounds is attributed to its electron donating ability. The number of hydroxyl groups in the aromatic ring and the nature of the substituents in *para* or *ortho* positions are important structural characteristics that determine the antioxidant activity [27]. These compounds react with free radicals and generate a new radical, which is stabilized by a resonance effect of the aromatic ring. In particular, *ortho*-diphenolic substitution gives high antioxidant ability, while a single hydroxyl substitution, as in tyrosol [28].

Inhibition of Lipid Peroxidation

Due to their susceptibility to oxidation, erythrocytes have been used as a cellular model to investigate oxidative damage in biomembranes. Erythrocytes are considered as prime targets for free radical attack owing to the presence of both high membrane concentration of polyunsaturated fatty acids and O₂ transport associated with redox active hemoglobin molecules. In biological systems, lipid peroxidation generates a number of degradation products such as MDA at the origin of cell membrane destruction and cell damage. MDA, one of the major products of lipid peroxidation, has been extensively studied and measured as an index of lipid peroxidation and as a marker of oxidative stress [29]. There is a correlation between the percentage of inhibition of lipid peroxidation and the concentration

Fig. 2 Percentages of H₂O₂ scavenging by phenolic substances depending on concentration

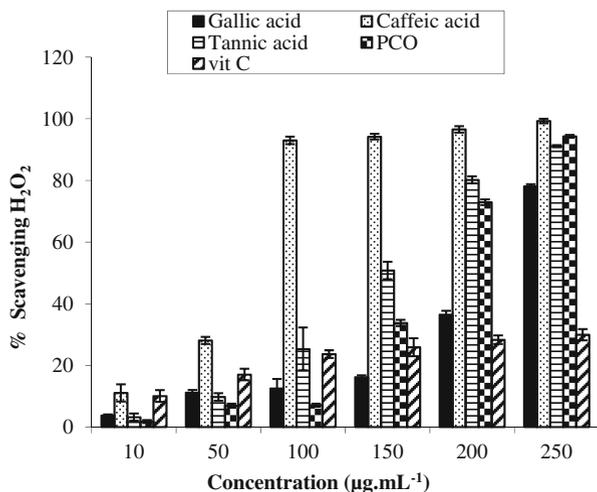
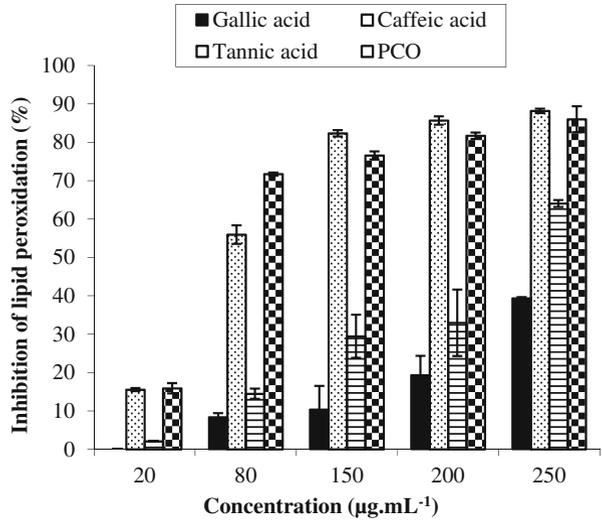
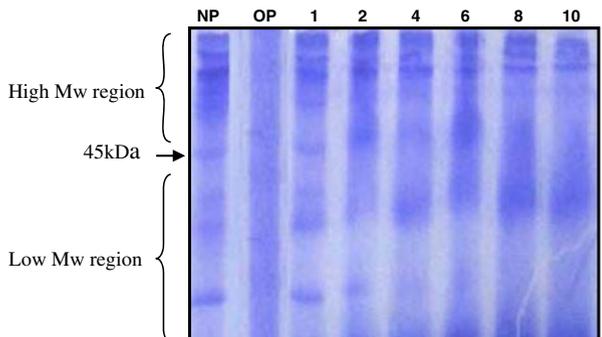


Fig. 3 Inhibition of lipid peroxidation of erythrocyte membranes (1 mg mL^{-1} of protein) by various substances depending on concentration



of all tested phenolic compounds (Fig. 3). Note that Vit C showed a pro-oxidant effect in the experimental conditions (data not shown). This phenomenon was announced by several authors that claimed that this pro-oxidant effect is induced by Fenton reaction in the presence of iron [30]. PCO had the most significant activity with an IC_{50} of $49.27 \pm 1.91 \mu\text{g mL}^{-1}$, followed by CA ($\text{IC}_{50} = 69.22 \pm 4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) and TA ($\text{IC}_{50} = 217.64 \pm 15.68 \mu\text{g mL}^{-1}$). GA presents, in this case, the lowest protective effect with an IC_{50} higher than $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. These results corroborated those obtained with other models of lipid peroxidation such as human LDL [31], soybean phospholipid liposomes [32], and unilamellar vesicles [33]. Oleuropein and its derivatives represent one of the main classes of PCO responsible for the antioxidant activity of olives and olive oil [31, 33]. PCO are regarded as chain-breaking antioxidants. Their protective effect against the lipoperoxidative damages depends on their capacity to yield an atom of hydrogen of an hydroxyl group [34]. The phenolic compounds and PCO tested could give an electron or a hydrogen atom to the lipid radical formed during the propagation phase of lipid oxidation and stabilize the phenoxy radical resulting by delocalization of unpaired electron as described by other authors [35].

Fig. 4 SDS-PAGE of erythrocyte membrane proteins under conditions of oxidative stress. *NP* not oxidized proteins, *OP* oxidized proteins; 1, 2, 4, 6, 8, 10 proteins incubated with PCO concentrations of respectively: 1, 2, 4, 6, 8, and 10 mg mL^{-1} under conditions of oxidative stress by the system $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$ (50 mM/30 mM)



Protection of Erythrocyte Membrane Proteins Against the Oxidative Stress

Cellular membranes, which contain abundant phospholipids and proteins, are major targets of free radicals that induce lipid peroxidation and protein oxidation and thereby cause malfunctioning of membranes [36]. In this context, erythrocyte constitutes a good model to study oxidative stress because of its vulnerability to oxidation. The use of iron and H_2O_2 as oxidant substrates led to the generation of hydroxyl radicals by the Fenton reaction. These radicals generate oxidative damages on biological molecules such as proteins [37]. After their extraction, the protein pattern of blood cell membranes during an oxidative stress, with or without PCO at various concentrations, was analyzed by SDS-PAGE (Fig. 4). Comparatively to the profile given in absence of PCO, PCOs protect proteins against oxidation in particular at concentrations of 1 and 2 mg mL⁻¹. This protection conferred by the PCO could be explained by the capacity of these molecules to trap H_2O_2 and hydroxyl radicals generated by the Fenton reaction. Moreover, this protective effect could also be explained by the indirect reduction in the production of the hydroxyl radical, through iron chelation. These results confirmed those obtained after erythrocyte treatment with ferrous ascorbate, leading to the decrease or disappearance of high molecular weights proteins on SDS-PAGE gels while new bands appeared in the low molecular weight region [38]. Moreover, the protective effect of mango peel extract rich in polyphenols or green tea extract and black tea rich in catechins against the oxidative stress on proteins [37, 39] reinforced the positive effects of PCO from olive pulp

Conclusion

Many researches are focused on studies of the beneficial effects of phenolic compounds extracted from olive fruits and olive oils. They indicate that these phenolic compounds protect against oxidative stress in vitro and in vivo [28, 40]. It comes out from this study that PCO from Algerian green olive fruits of *chamlal* variety are molecules with significant antioxidant properties generally higher than those of the Vit C. Their antioxidant properties would mainly be explained by their reducing power and their free-radical scavenging capacity. These properties were also demonstrated at the cellular level preserving in this way the erythrocytes membrane integrity. PCO could be utilized to develop functional food, health-promoting, and pharmaceutical agents against diseases caused by oxidative stress. It will be interesting to carry out research on the identification and structural characterization of different phenolics compounds in total extract (PCO). The qualitative and quantitative analysis of all phenolic compounds will lead to structure–functions relations.

Acknowledgment This work was supported by the Partenariat Hubert Curien TASSILI (EGIDE)

References

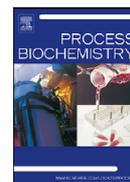
1. Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., et al. (2009). *Food Chemistry*, 112, 587–594.
2. Fukui, M., Choi, H. J., & Zhu, B. T. (2010). *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 800–813.
3. Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). *International Journal of Molecular Sciences*, 8, 950–988.
4. Bravo, L. (1998). *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.
5. Harborne, J. B., Baxter, H., & Moss, G. P. (Eds.). (1999). *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants* (2nd ed.). London: Taylor & Francis.

6. Garcia-Alloza, M., Borrelli, L. A., Rozkalne, A., Hyman, B. T., & Bacsikai, B. J. (2007). *Journal of Neurochemistry*, *102*, 1095–1104.
7. Skibola, C. F., & Smith, M. T. (2000). *Free Radical Biology & Medicine*, *29*, 375–383.
8. Yuan, X., Wang, J., Yao, H., & Chen, F. (2005). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, *38*, 877–883.
9. Shiva Shankar Reddy, C. S., Subramanyam, M. V. V., Vani, R., & Asha Devi, S. (2007). *Toxicology in Vitro*, *21*, 1355–1364.
10. Brenes, M., Rejano, L., Garcia, P., Sanchez, A. H., & Garrido, A. (1995). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*, 2702–2706.
11. Savarese, M., De Marco, E., & Sacchi, R. (2007). *Food Chemistry*, *105*(2), 761–770.
12. Gutfinger, J. (1981). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *58*, 966–968.
13. Oyaizu, M. (1986). *Journal of Nutrition*, *44*, 307–315.
14. Ruch, R. J., Cheng, S. J., & Klaunig, J. E. (1989). *Carcinogenesis*, *10*, 1003–1008.
15. Lowry, O. H., Rosbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265–275.
16. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). *Methods in Enzymology*, *52*, 302–310.
17. Carini, M., Aldini, G., Bombardeelli, E., Morazzoni, P., & Maffei Facino, R. (2000). *Life Sciences*, *67*, 1799–1814.
18. Laemmli, U. K., & Favre, H. (1973). *Journal of Molecular Biology*, *780*, 575–599.
19. Hajimahmoodi, M., Sadeghi, N., Jannat, B., Oveysi, M. R., Madani, S., & Kiayi, M. (2008). *Journal of Biological Sciences*, *8*(4), 779–783.
20. Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentao, P., Goncalves, A., Pereira, J. A., et al. (2005). *Food Chemistry*, *89*, 561–568.
21. Gomez-rico, A., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2008). *Food Research International*, *41*, 433–440.
22. Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F., & Hafezi, S. (2008). *Turkish Journal of Biology*, *32*, 1–7.
23. Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Bento, A., & Pereira, J. A. (2008). *LWT- Food Science and Technology*, *41*, 739–745.
24. Morello, J.-R., Romero, M.-P., & Motilva, M.-J. (2004). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 6002–6009.
25. Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Soares, M. E., Bastos, M. L., & Pereira, J. A. (2007). *Food Chemistry*, *103*, 188–195.
26. Wang, H., Gao, X. D., Zhou, G. C., Cai, L., & Yao, W. B. (2008). *Food Chemistry*, *106*, 888–895.
27. McDonald, S., Prenzler, P. D., Antolovich, M., & Robards, K. (2001). *Food Chemistry*, *73*, 73–84.
28. Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). *Nutrition Research Reviews*, *18*, 98–112.
29. Niranjan, T. G., & Krishnakantha, T. P. (2000). *Molecular and Cellular Biochemistry*, *204*, 57–63.
30. Yen, G.-C., Duh, P.-D., & Tsai, H.-L. (2002). *Food Chemistry*, *79*, 307–313.
31. Franconi, F., Coinu, R., Carta, S., Urgeghe, P. P., Ieri, F., Mulinacci, N., et al. (2006). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3121–3125.
32. Paiva-Martins, F., Gordon, M. H., & Gameiro, P. (2003). *Chemistry and Physics of Lipids*, *124*, 23–36.
33. Saija, A., Trombetta, D., Tomaino, A., Cascio, R. L., Princi, P., Uccella, N., et al. (1998). *International Journal of Pharmaceutics*, *166*, 123–133.
34. Kahl, R. (1991). Protective and adverse biological actions of phenolic antioxidants. In H. Sies (Ed.), *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants* (pp. 245–273). San Diego: Academic.
35. Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). *Food Chemistry*, *92*, 235–254.
36. Rucci, A., Ensínck, M. A., Mufarregge, N., Cotorruelo, C., GarcíaBorrá, S., Racca, L., et al. (2010). *Clinical Biochemistry*, *43*, 1171–1173.
37. Ajila, C. M., & PrasadaRao, U. J. S. (2008). *Food and Chemical Toxicology*, *46*, 303–309.
38. Singh, N., & Rajini, P. S. (2008). *Chemico-Biological Interactions*, *173*, 97–104.
39. Halder, J., & Bhaduri, A. N. (1998). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *244*, 903–907.
40. Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2010). *International Journal of Molecular Sciences*, *11*, 458–479.



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Review

Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies

S. Dermeche^{a,1}, M. Nadour^{a,1}, C. Larroche^b, F. Moulti-Mati^a, P. Michaud^{b,*}^a Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Université M. Mammeri, BP N° 17 RP, 15000 Tizi Ouzou, Algeria^b Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut Pascal UMR CNRS 6602, Polytech' Clermont-Ferrand, 24 avenue des Landais, BP-20206, 63174 Aubière, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2012

Received in revised form 15 July 2013

Accepted 16 July 2013

Available online 24 July 2013

Keywords:

Olive

Phenolic compounds

Polysaccharide

Olive mill wastewater

Olive pomace

Bioconversion

ABSTRACT

The olive mill waste generated from olive oil extraction is a major environmental issue, particularly in Mediterranean areas. The extraction of olive oil is achieved through discontinuous or continuous processes. The two processes yield three fractions: a solid residue and two liquid phases (oil and olive mill wastewater). The characterization of these two by-products showed that they are mainly composed of phenolic compounds, carbohydrates, organic acids and mineral nutrients variably distributed depending on the process employed and the agronomic practices. Untreated olive by-products discharged between November and March into the environment are a major ecological issue for olive oil-producing countries due to their high toxic organic loads, low pH, and high chemical and biological demands. In this context, recent research studies highlight on the treatment approaches and valorization options for dealing with olive mill waste residues, predominantly those allowing for the recovery of valuable natural components such as phenolic compounds, dietary fibers, animal feed, biofuel, biogas, enzymes, polymers and other. The impact of the chemical heterogeneity and water content of olive mill by-products about these processes of valorization and bioconversion is discussed.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction.....	1533
2. Processes for the extraction of olive oil and its associated by-products.....	1533
3. Chemical compositions of olive by-products.....	1535
3.1. General composition.....	1535
3.2. Phenolic compounds.....	1535
3.2.1. Recovery of phenolic compounds.....	1535
3.2.2. Phenolic compounds from liquid residue: OMWW.....	1537
3.2.3. Phenolic compounds in solid residues: olive pomace.....	1537
3.3. Carbohydrates: purification and structure.....	1538
4. Environmental impacts of OMWW.....	1540
4.1. Soil pollution and phytotoxicity.....	1540
4.2. Water pollution.....	1541
4.3. Air pollution.....	1541
5. Applications and bioconversion of olive oil by-products.....	1541
5.1. Agricultural uses.....	1541
5.2. Production of bioactive phenolic compounds.....	1543

Abbreviations: AIR, alcohol-insoluble residue; Ara, arabinose; BOD, biological oxygen demand; COD, chemical oxygen demand; CPBR, Cylindrical PhotoBioReactor; CSTR, Continuous Stirred Tank Reactor; 3,4-DHPEA-EDA, Decarboxymethyl Oleuropein-Aglycone; DF, dietary fiber; FPBR, flat photobioreactor; Gal, galactose; GalA, galacturonic acid; Glc, glucose; HPLC, High-Performance Liquid Chromatography; HPP, hydrogen production potential; HRT, hydraulic retention time; Man, mannose; NDF, neutral detergent fiber; OMWW, olive mill wastewater; PHAs, polyhydroxyalkanoates; Rha, rhamnose; TPOMW, two-phase olive mill waste; SFE, supercritical fluid extraction; VFA, volatile fatty acids; Xyl, xylose.

* Corresponding author.

E-mail address: philippe.michaud@univ-bpclermont.fr (P. Michaud).¹ Both contributed equally to this work.



Celine
Laroche

Composition, structure, and valorisation of fibres from olive fruit and by-products

M. NADOUR¹, F. MOULTI-MATI¹, P. MICHAUD², C. LAROCHE^{2*}.

*Corresponding author

1. Université M. Mamméri, Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, BP N°17 RP, 15000 Tizi Ouzou, Algérie
2. Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut Pascal UMR CNRS 6602, Polytech¹ Clermont Ferrand, 24 avenue des landais, BP-206, 63174, Aubière, France

KEYWORDS: Olive, dietary fibre, olive mill wastewater, olive pomace, gelation.

ABSTRACT: Dietary fibres (DF) are highly complex substances that can be described as carbohydrates (cellulose, hemicellulose and pectin), lignins and associated substances that resist to digestion by human alimentary enzymes. There is an abundance of scientific evidence regarding the beneficial effects of DF, as they play a significant role in several physiological processes and in the prevention of several diseases, such as metabolic syndrome and different types of cancers by the normalization of blood lipids, and the regulation of glucose absorption and insulin secretion...). DF could play an important role in the prevention of diabetes. Some dietary fibres (soluble fibre as guar gum and β -glucan) may improve glycemic control by reducing the rate of glucose absorption which resulted in decreasing glycemia and hence decreasing insulin secretion; or by modulating gut hormones such as gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide (1). The importance of fibres has led to the appearance of products named as fibre-enriched food and gelling agents. Olive fruit contains a considerable amount of fibres with promising functional properties, such as better gel formation and water holding capacity. During olive oil processing, two by-products are obtained: olive pomace, and olive mill wastewater (OMWW). The last is known for its environmental concerns related to the pollution of water, alteration in soil and toxicity for bacteria, plants and animals. However, it can also contains high amounts of dietary fibres as pectin material, which could be recovered from OMWW. The purpose of this mini-review was to discuss the composition and structural characterization of dietary fibres in olives (fruit and olive oil by-products) related to their potential applications as an interesting valorisation option.

INTRODUCTION

The growing demand by consumers for healthier products has been stimulated by the research on beneficial and functional compounds recovered from natural products. The importance of dietary fibres (DF) has been emphasized by numerous authors during the recent years (1, 2, 3). These studies showed that DF are important components in our diet, and they can provide beneficial effects on our health for example by contributing to the prevention, reduction and treatment of certain cancers (colorectal and breast cancer), cardiovascular diseases, diabetes and obesity (4-7, 8). DF is a plant-derived material resistant to the digestion by human alimentary enzymes (9). They can include cell wall components (cellulose, hemicellulose, lignin and pectin), non-structural components (gums and mucilages). In addition they can be used as additives in industry (modified cellulose or pectin, commercial gums and algae polysaccharides) (10). Cell walls of fruits, vegetables, pulses and whole grain cereals are the most important sources of DF in human diet (11). There is a growing interest in the recovery of DF from the by-products of food processes. The amount and composition of DF can vary a lot between the different sources. Several foods such as cereals or nuts provide up to 10–35 g of fibre/100 g dry weight, whereas fruits and vegetables contain 1.5–2.5 g/100 g DF of their dry weight (9, 12). Cereals are among the main sources of DF in the foods bearing the nutritional claim 'high in fibre' (i.e. contain more than 3 g DF / 100 g or 100 kcal of the product). Cereals contain several types of DF: arabinoxylan, β -glucan and fructan (13). Olive oil extraction by-products could be

an innovative source of DF in the future since the quantity of OMWW and olive pomace produced every year is important, for instance the annual OMWW production in the Mediterranean sea area exceeds 30.10^6 m^3 (14).

The cultivation of olives and the production of olive oil is a well-known practice in the Mediterranean region since many centuries. Around 900 million olive trees are grown on 10 million hectare area around the world, and 98 % of them are located in the Mediterranean Basin (15). Olive fruit contains significant amount of DF (10-15% of dry material) with promising functional proprieties (11, 16-19). During the olive oil processing, two by-products are obtained: olive pomace and olive mill wastewater (OMWW). The pomace is composed of residual parts, such as skins, pulp and pit fragments, whereas the OMWW fraction contains the water from olives but also the water added during the oil processing. The objective of this mini-review was to combine the results of various studies on the DF of olive products (olive fruit, OMWW and olive pomace), with a special emphasis on their biochemical characterization, recovery and potential biological properties.

DIETARY FIBRES OF OLIVE PRODUCTS

Several protocols have been developed to separate and analyse the DF fractions from olive products (Fig.1). Several types of carbohydrate polymers have been detected from the isolated fractions (20-22). From the olive pulp cell wall material (CWM), DF has been extracted using various reagents. For instance, the isolation of DF can be performed