

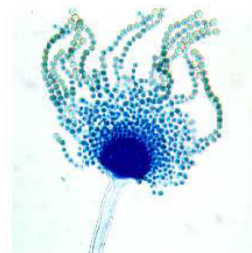
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



THÈSE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat
En Sciences biologiques
Option : Biochimie Appliquée et biotechnologies



THÈME :

Etude des activités anti-oxydante, antifongique et hypoglycémiantes des margines d'olives et de leur extrait phénolique. Applications sur matrice alimentaire et sur modèle murin et cellulaire.

Présentée par : Mme SENANI-OULARBI NASSIMA

Soutenue publiquement le : 28 /06/2018

Devant le jury :

Président	: Mr Karim HOUALI	Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
Directrice de thèse	: Mme Farida MOULTI-MATI	Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
Examineurs	: Mme Adiba BEN AHMED DJILALI	Maitre de conférences A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
	Mr Messaoud BENCHABANE Mme Malika DOUZANE	Professeur à l'Université de Blida Maitre de recherches, Directrice de recherches à l'institut National de la Recherche Agronomique d'Alger (INRAA).
	Mr Salim MOKRANE	Maitre de conférences A à l'ENS de KOUBA, Alger

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au laboratoire de Biochimie Analytique et biotechnologies (LABAB) à la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Une partie de ce travail de recherche est réalisée à l'unité de recherche : INSERM UMR_S1149 CNRS ERL 8252 au centre de recherche sur l'inflammation (CRI) de l'université Paris Diderot sous la direction du chercheur Jean-Claude MARIE.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mme Farida MOULTI-MATI Professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et Directrice du laboratoire de recherche sur les Substances bioactives et valorisations biotechnologiques. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés à ce sujet de recherche. Je tiens aussi à remercier Monsieur le Professeur Abderrahmane MATI, Directeur du laboratoire de Biochimie Analytique et des biotechnologies (LABAB) à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires pour la réalisation des expérimentations. Je le remercie vivement pour tout son soutien, ses encouragements afin de progresser dans nos recherches et pour tous ses précieux conseils.

Je voudrais exprimer ma plus grande gratitude envers le Docteur Jamel El BENNA, Directeur de recherche Inserm U 1149, au sein du centre de recherche sur l'inflammation. Faculté de Médecine Xavier Bichat à Paris pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, sans aucune condition. Jean-Claude MARIE., je te remercie pour ta collaboration, tes précieux conseils et les questions scientifiques toujours enrichissantes face à nos résultats expérimentaux. Merci pour ton calme et ta bonne humeur. Merci également à Philippe LETTERON et Robert DUCROC pour leurs discussions.

Je tiens à remercier Mr Karim HOUALI Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.

Mes remerciements vont aussi à madame BEN AHMED DJILALI Adiba Maitre de conférences à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et madame DOUZANE Malika,

Maitre de recherches, Directrice de la division de recherches des Technologies Agro-alimentaires à l'institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. « INRAA » d'avoir ménagé de leur temps pour juger et critiquer ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honoré par leur participation au jury de cette thèse. Que Monsieur BENCHABANE Messaoud Professeur à l'Université de Blida et Monsieur MOKRANE Salim Maitre de conférences à l'ENS de KOUBA, trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'être examinateurs et de participer au jury de ce travail.

Je tiens à remercier Mr RIBA Amar Professeur à l'Université M'hamed Bougara de Boumerdes, je le remercie vivement de m'avoir fourni la souche Aspergillus Flavus et de m'avoir orienté et guidé sur la partie antifongique.

Je remercie mes collègues du laboratoire et amies pour leur soutien et plus précisément SENOUSSE Chahra, ALMI Dalila, BEDOUHENE Samia, CHABI Samia pour leurs aides et amitiés. Je n'oublie pas l'ingénieur de laboratoire Melle BOUADJLA Lamia pour sa présence son soutien moral et matériel. J'adresse aussi mes remerciements à tous les doctorants en particulier Melle ZOBIRI Assia et les membres du laboratoire de Biochimie qui contribuent par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

Pour terminer, je dédie ce manuscrit à ma famille, tout particulièrement mes parents pour leur soutien tout le long de ma thèse. Mes pensées vont à mes frères, mes sœurs, ma belle mère, mes belles sœurs et beaux frères pour leur présence durant ces instants, leur sympathie et leur encouragement qu'ils m'ont apporté. Un grand merci à mon mari pour son appui inestimable durant les moments difficiles et à mes enfants Abderahim et Tania pour la joie qu'ils nous procurent.

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures et des tableaux

Abréviations

Introduction générale

Première partie : Synthèse bibliographique

I-	Quelques données sur le secteur oléicole.....	3
1.1.	Situation mondial, production et consommation.....	3
1.2.	Situation dans le bassin méditerranéen.....	5
1.3.	Le secteur oléicole algérien	6
1.3.1.	Potentiel oléicole en Algérie	6
1.3.2.	Potentiel oléicole dans la région de Kabylie.....	8
II-	Procédés d'extraction de l'huile d'olive	9
2.1.	Système de presse (Procédé en discontinu)	9
2.2.	Système de centrifugation (Procédé en continu)	11
2.3.	Comparaison entre le système de presse et le système de centrifugation..	13
III-	Les sous- produits de l'olivier et les margines en particulier.....	13
3.1.	Feuilles et brindilles	14
3.2.	Grignons ou tourteaux d'olive	14
3.3.	Margines ou eaux de végétation	14
3.3.1.	Caractéristiques physico-chimique et microbiologique des margines...	14
3.3.2.	Impact des margines sur l'environnement	16
3.3.3.	Traitements des margines	17
3.3.4.	Valorisation des margines	19
3.3.4.1.	Extraction de composés à haute valeur ajoutée.....	21
VI-	Les composés phénoliques.....	22
4.1.	Caractéristiques physicochimiques des composés phénoliques	22
4.2.	Structure et classification des composés phénoliques	22
4.3.	Les grandes lignes de la biosynthèse des polyphénols	23
4.4.	Intérêt biologique des composés phénoliques	25
4.5.	Mécanismes d'absorption des polyphénols chez l'humain.....	29
4.6.	Modes d'action des composés phénoliques	31
4.7.	Les composés phénoliques de l'huile d'olive, grignon et des margines en particulier	33
4.8.	Les activités biologiques des margines et des composés phénoliques des margines en particulier.....	34
V-	La contamination fongique des matrices alimentaires.....	36

5.1. Mycotoxines et moisissures dans les matrices alimentaires.....	36
5.2. Facteurs influençant la production des mycotoxines dans les aliments....	37
5.3. Le genre <i>Aspergillus</i> et la section <i>Flavi</i> en particulier.....	40
5.4. Les aflatoxines.....	43
5.5. Approches de décontamination.....	51
VI- Le diabète sucré.....	54
6.1. Caractéristiques du diabète du type 2.....	54
6.2. Mécanismes de l'absorption intestinale du glucose.....	54
6.3. Modulation de l'absorption intestinale du glucose.....	55
6.4. Traitements du diabète de type 2.....	60
6.5. Les composants photochimiques à effets antidiabétiques.....	60

Deuxième partie : Partie expérimentale

I. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel.....	63
1.2. Méthodes	65
1.2.1. Caractérisation physicochimique des margines	65
1.2.2. Analyse du pouvoir antioxydant de la poudre de margines et de l'extrait phénolique des margines.....	71
1.2.2.1. Test du piégeage du radical DPPH.....	73
1.2.2.2. Test du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (RP).....	73
1.2.2.3. Test du piégeage du radical-cation ABTS ⁺	73
1.2.3. Etude de l'activité antifongique de la poudre et de l'extrait phénolique des margines.....	75
1.2.3.1. Traitement des margines brutes.....	75
1.2.3.2. Préparation de l'inoculum.....	75
1.2.3.3. Tests préliminaires.....	75
1.2.3.4. Tests antifongiques et anti-aflatoxinogènes « <i>in vitro</i> ».....	76
1.2.3.5. Tests antifongiques et anti-aflatoxinogènes « <i>in situ</i> »	77
1.2.3.5.1. Tests préliminaires.....	79
1.2.3.5.2. Choix de la matrice alimentaire.....	79
1.2.3.5.3. Traitement du maïs.....	79
1.2.3.5.4. Effet antifongique et anti -aflatoxinogène de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur le maïs broyé et contaminé par <i>Aspergillus flavus</i>	80
1.2.3.6. Détermination des aflatoxines B1 par le test d'ELISA type « Compétition Directe ».....	82
1.2.4. Etude de l'activité hypoglycémiant de la poudre et de l'extrait phénolique des margines	87
1.2.4.1. Recherche de la toxicité de la poudre et de l'extrait phénolique des margines.....	87
1.2.4.2. Test de tolérance au glucose.....	88
1.2.4.3. Test de provocation <i>in vitro</i> en chambre d'Ussing	88

1.2.4.4. Analyse des membranes cellulaire avec le Western blot.....	92
1.2.4.4.1. Etude de l'effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur l'expression du transporteur membranaire principalement SGLT-1 et de la protéine kinase-C (PKC) sur les cellules intestinale des souris testés.....	92
1.2.4.4.2. Etude de l'effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur l'expression du transporteur membranaire principalement SGLT-1 et de la protéine kinase-C (PKC) sur la lignée cellulaire Mode-K	93
1.2.4.4.2.1. Description de la lignée Mode-K.....	93
1.2.4.4.2.2. Entretien de la lignée	94
1.2.4.4.2.3. Passage de la ligné cellulaire Mode-K.....	94
1.2.4.4.2.4. Comptage des cellules.....	94
1.2.4.4.2.5. Traitement de la lignée cellulaire Mode-K par la poudre et l'extrait phénolique de margines pour le Western blot	95
1.2.4.4.3. Analyse des protéines	96
1.2.4.4.4. Western blotting.....	96
1.2.5. Analyse statistique des résultats.....	97

II. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Caractérisation physicochimiques des margines	98
2.2. Le pouvoir antioxydant de la poudre et de l'extrait phénolique des margines	104
2.2.1. Test du piégeage du radical DPPH'	104
2.2.2. Test du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (RP).....	106
2.2.3. Test du piégeage du radical-cation ABTS ⁺	107
2.3. Etude microbiologique <i>in vitro</i> et <i>in situ</i>	110
2.3.1. Résultats du test <i>in vitro</i>	110
2.3.1.1. Criblage de la production d'aflatoxines de la souche testée sur milieu CAM et par chromatographie sur couche mince	110
2.3.1.2. Concentration minimale inhibitrice, biomasse et nature de l'activité de la poudre et de l'extrait phénolique des margines.....	113
2.3.1.3. Test anti-aflatoxinogène	114
2.3.2. Résultat du test <i>in situ</i>	115
2.3.2.1. Choix de la matrice alimentaire	115
2.3.2.2. Humidité.....	115
2.3.2.3. Effet antifongique et anti-aflatoxinogène de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur le maïs broyé et contaminé par <i>Aspergillus flavus</i>	
2.3.2.3.1. Test antifongique	115
2.3.2.3.2. Test anti-aflatoxinogène.....	118
2.3.3. Effet des margines et des polyphénols extraits des margines sur la germination du maïs.....	120
2.3.4. Effet des margines et de l'extrait phénolique des margines sur la production de l'aflatoxine B1 par le test ELISA compétition directe.....	121
2.3.4.1. Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la production de l'aflatoxine B1 sur milieu SMKY par le test d'ELISA compétition	

directe.....	121
2.3.4.2. Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la production de l'aflatoxine B1 sur le maïs broyé par le test d'ELISA compétition direct	122
2.4. Activité hypoglycémiant de la poudre et de l'extrait phénolique des margines.....	126
2.4.1. Etude de la toxicité <i>in vivo</i> (Test d'innocuité).....	126
2.4.2. Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la tolérance au glucose	126
2.4.2.1. Effet de la poudre de margines sur la tolérance au glucose.....	126
2.4.2.2. Effet de l'extrait phénolique des margines sur la tolérance au glucose....	128
2.4.3. Résultat du test de provocation <i>in vitro</i> en chambre d'Ussing	130
2.4.4. Résultats du test toxicité des cellules Mode-K.....	135
2.4.5. Analyse des cellules intestinales de souris Mode-K et des membranes intestinales des souris avec le Western blot.....	136
2.4.5.1. Western blot des membranes de la lignée cellulaire intestinale de souris Mode-K.....	136
2.4.5.2. Western blot des membranes intestinales de souris.....	139
Conclusion générale et perspectives.....	149

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Résumé

Résumé

Les margines ou effluents liquides de l'industrie huilière ne cessent de poser de grands problèmes de pollution de l'environnement. Pour résoudre ces problèmes de pollution des études de valorisation de ces effluents ont été réalisées. Les margines sont une source naturelle riche en substances bioactives entre autre les polyphénols. Ces derniers présentent de nombreux avantages pour la santé et des effets pharmacologiques intéressants. Des margines récoltées dans une région de la Kabylie (Algérie), ayant fait l'objet d'une étude axée sur trois parties. La première partie visait à étudier l'effet antioxydant *in vitro* de la poudre de margines (PM) et de l'extrait phénolique des margines (EPM). La deuxième partie de ce travail visait à étudier l'activité de la PM et EPM sur la croissance d'*Aspergillus flavus* et la production d'aflatoxine B1 (AFB1) dans le milieu SMKY et sur le maïs choisi comme matrice alimentaire. La troisième partie de notre travail consistait à évaluer l'effet hypoglycémiant de la PM et de l'EPM ainsi leur effet sur la régulation de l'absorption intestinale du glucose chez la souris, comme cible du traitement du diabète du type 2 (DT2). L'activité anti-oxydante a été réalisée par trois tests. Les tests de piégeage des radicaux libres (DPPH, ABTS^{·+}) et le test du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (RP). Pour la partie antifongique, le milieu SMKY et le maïs broyé ont été complétés avec différentes concentrations de PM et d'EPM, inoculés avec *A. flavus* et incubés à 28 °C pendant 7 jours. La biomasse ainsi que le diamètre des mycéliums ont été déterminés dans le milieu SMKY et maïs broyé, respectivement. La synthèse d'AFB1 a été quantifiée par la méthode ELISA compétitive directe. Dans le milieu SMKY, les résultats ont montré que la biomasse des mycéliums était réduite à 50 % et 46,2 % avec des concentrations de 250 mg/L et 4 g/kg d'EPM et de PM, respectivement. Une inhibition complète a été obtenue avec une concentration de 500 mg/L et 10 g/L d'EPM et de la PM, respectivement. Dans le maïs broyé, l'EPM et la PM ont réduit la croissance mycélienne de plus de 50 % avec 800 mg/L et 16 g/kg et une inhibition complète a été obtenue à 1000 mg/kg et 20 g/kg, respectivement. L'AFB1 est totalement inhibée dans le milieu SMKY à 400 mg/L et 8 g/L d'EPM et de PM, respectivement. En ce qui concerne la partie portant sur l'effet hypoglycémiant de la PM et de l'EPM a été évalué chez des souris saines en utilisant un test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT). Une analyse par Western blot a été réalisée pour étudier l'absorption du glucose intestinal par SGLT-1 et la protéine kinase C (PKC), une protéine effectrice clé au niveau des membranes de la bordure en brosse de la muqueuse jéjunale de souris. Nous avons observé que la glycémie diminuait significativement en présence de l'EPM et de la PM, respectivement aux concentrations de 500 mg/kg et 4 g/kg de poids corporel par rapport à la réponse à l'administration orale de glucose seul (1g/kg). L'EPM aurait induit une forte diminution de la protéine SGLT-1 (88 %) ainsi que de la PKC (70 %) en réponse au glucose par rapport aux groupes témoins. Les résultats obtenus dans ces études démontrent la possibilité d'exploiter l'activité anti-oxydante de la PM et de l'EPM dans le contrôle de la souche aflatoxinogène *A. flavus* dans les céréales et les aliments stockés, et suggèrent aussi que la PM et l'EPM peuvent être bénéfiques pour le traitement du DT2 grâce à leur effet hypoglycémiant en agissant sur le co-transporteur du glucose sodium dépendant SGLT-1 et sur la PKC comme cible thérapeutique. Parmi les perspectives d'utilisation des sous-produits oléicoles on citera quelques applications comme l'amélioration de la durée de vie d'un aliment et leur implication dans la prévention des maladies liées au stress oxydant.

Mots clés: margines, extrait phénolique, effet antioxydant, effet antifongique, maïs, effet hypoglycémiant.

Abstract

Olive mill wastewater or liquid effluents from the oil industry pose major problems of environmental pollution. To resolve these pollution problems, recovery studies of these effluents have been carried out. OMW are a natural source rich in bioactive substances including polyphenols. Polyphenols have many health benefits and interesting pharmacological effects. The first part of our study aimed to investigate the effect of crude olive mill wastewater (OMW) and phenolic extract from olive mill wastewater (PE) from olive trees of the *chemlal* variety which is cultivated in Kabylia (Algeria) on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 (AFB1) production in SMKY broth medium and in maize powder. The second part of our work is to evaluate the hypoglycemic effect of phenolic extract from OMW (PE) and OMW on glycaemia and on the regulation of intestinal glucose absorption in mice, a target for treating diabetes mellitus. The antioxidant activity was carried out by three tests. Free radical scavenging tests (DPPH·, ABTS·+) And the ferric ion reduction (RP) test. For the antifungal part the SMKY medium and maize powder were supplemented with various concentrations of OMW and PE, inoculated with *A. flavus* and incubated at 28 °C for 7 days. The mycelia biomass (dry mycelium weight) and fungal colony diameter were determined in SMKY and maize powder, respectively. Aflatoxin B1 synthesis was quantified by direct competitive ELISA method and chemical compositions of PE were analyzed by HPLC. In SMKY medium, results showed that mycelia biomass was reduced to 50 % and 46.2 % with concentrations of 250 mg/L and 4 g/kg of the PE and OMW, respectively. Complete inhibition was obtained with 500 mg/L and 10 g/L of the PE and OMW, respectively. In maize powder, PE and OMW reduced the mycelial growth by more than 50 % with 800 mg/L and 16 g/kg, and complete inhibition was obtained at 1000 mg/kg and 20 g/kg, respectively. Aflatoxin B1 was totally inhibited in SMKY medium to which 400 mg/L and 8 g/L of PE and OMW, respectively, had been added. With regard to the section on the hypoglycemic effect of PE and OMW. The effect of oral administration of PE and crude OMW on mice glycaemia was evaluated using oral glucose tolerance test. Western blot analysis was performed to study intestinal glucose absorption by SGLT-1 and protein kinase C (PKC) a key effector protein at the brush border membranes of mice jejunal mucosa. We observed that the raised glycaemia in mice in response to oral glucose administration was significantly decreased in the presence of PE and crude OMW, respectively at 500 mg/kg and 4 g/kg of body weight. The PE induced a strong decrease of SGLT-1 protein (88 %) as well as PKC (70 %) in response to glucose compared with the control group. Results obtained in the present study indicate the possibility of exploiting PE and crude OMW in the control of aflatoxigenic *A. flavus* in stored foods products and suggest that PE and OMW may be beneficial for diabetes treatment thanks to their novel hypoglycemic effect by acting on SGLT-1 cotransporter. Among the prospects for using olive by-products include some applications such as in food preservation and their involvement in the prevention of diseases related to oxidative stress.

Keywords: olive mill wastewater, phenolic extract, antioxidant effect, antifungal effect, corn, hypoglycemic effect.

Liste des abréviations

ABTS : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

AF: Aflatoxine

AMPK :(AMP-activated protein kinase)

AOAC: Association des chimistes analytiques officiels (Association of Official Agricultural Chemists)

CAM : Milieu à base noix de coco (Coconut agar medium)

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMI : Concentration minimale inhibitrice

COI : Conseil oléicole international

CP : Composés phénoliques

DCO : Demande chimique en oxygène

DBO : Demande biochimique en oxygène

DBO₅ : DBO mesurée au bout de 5 jours

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl

ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (enzyme-linked immunosorbent assay)

EPM : Extrait phénolique des margines

ERKs : kinases qui régulent la signalisation extracellulaire (Extracellular Signal-regulated Kinase)

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

GLUT 4 : Transporteur du glucose de type 4

ha : hectare

CLHP: Chromatographie en phase liquide à haute performance

KRB : Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer

Isc : Intensité du courant de court-circuit

MES : Matière en suspension

MEM NE : Milieu essentiel minimum avec acides aminés non essentiels (Minimal Essential Medium Non Essential amino acid)

OGTT : Oral Glucose Tolerance Test

ONFAA : Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires

PDA : gélose dextrosée à base de pomme de terre (Potato dextrose agar)

PI-3 Kinase : La phosphatidylinositol 3-kinase

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PMA : Phorbol-12-myristate-13-acétate

PP : Polyphénols

ppb : partie par milliard

ppm : partie par million

SDS-PAGE : Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence de Dodécylsulfate de Sodium

SGLT-1 : Co-transporteur du glucose sodium dépendant-1 (sodium glucose cotransporter-1)

SMKY : Sucrose, magnesium sulfate, potassium nitrate and Difco yeast extract

RB : Tampon RIPA (RIPA Buffer)

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium (milieu utilisé en culture cellulaire)

TE :Teneur en eau

GLOSSAIRE

Angiotensine II (Ang II): octapeptide issu du clivage de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine, peptides impliqués dans la maintenance du volume et de la tension artérielle (NISHIMURA, 2001).

Ang- (1-7) III : hormone heptapeptique. Elle dérive de l'angiotensine II par l'action d'une aminopeptidase A (ROBSON et *al.*, 2008).

AT1R : récepteur à l'angiotensine II de type 1 (R-AT1). Le R-AT1, chez l'adulte, est le plus abondant dans la plupart des tissus. Le R-AT1 médie la majorité des effets de l'Ang II : stimulation de la vasoconstriction, prolifération et hypertrophie cellulaire, sécrétion d'aldostérone, régulation de la soif, de l'activité sympathique et inhibition de la relâche de rénine (DE GASPARO et *al.*, 2000).

CCK : Cholécystokinine est une hormone peptidique gastro-intestinale sécrétée par la muqueuse du duodénum (premier segment de l'intestin grêle) et relarguée dans la circulation sanguine. Elle agit en tant que médiateur dans plusieurs procédés physiologiques, comprenant la digestion et le phénomène de satiété (LITTLE et *al.*, 2005).

Glucagon : est une hormone hyperglycémiant (qui provoque une augmentation de la quantité de glucose dans le sang) sécrétée par les cellules alpha des îlots de Langerhans du pancréas, et qui agit principalement sur le foie en provoquant une glycogénolyse. Il possède des propriétés antagonistes de l'insuline, qui est hypoglycémiant (BATAILLE et *al.*, 2003).

Glucagon -37 : appelé aussi l'oxyntomoduline (OXM) est une hormone peptidique de 37 acides aminés sécrétée par l'intestin avec GLP-1 suite à l'ingestion de nutriments. OXM est principalement produite dans les cellules L endocrines intestinales par le précurseur préproglucagon en présence de la prohormone convertase. Ce fragment a été nommé oxyntomoduline pour sa capacité à moduler la sécrétion d'acide gastrique dans les glandes gastriques oxyntiques (POCAI, 2013).

GLP-1 : glucagon-like peptide-1 est une incrétine, c'est-à-dire une hormone intestinale, sécrétée par les cellules L de l'iléon en réponse à un repas (qui stimulent la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est trop élevée (glycémie postprandiale). Le GLP-1 fait parti des hormones de satiété (THORENS, 2003).

GLP-2 : glucagon-like peptide-2 est une incrétine sécrétée par les cellules L de l'iléon qui régule le transport le intestinal des hexoses, inhibe la motilité gastrique et la sécrétion d'acide, et régule la masse de l'intestin épithélium via la stimulation de la croissance de la muqueuse et de l'inhibition de l'apoptose (THORENS, 2003)..

GIP : Le peptide insulinothrompé dépendant du glucose. Le GIP potentialise la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose au niveau du pancréas et participe à la régulation du métabolisme énergétique. De ce fait, le GIP appartient à la famille des incrélines (THORENS, 2003).

Insuline : hormone protéique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas. Elle a un effet important sur le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines en favorisant l'absorption du glucose présent dans le sang par les cellules adipeuses, les cellules du foie et celles des muscles squelettiques (FREYCHET, 1988).

Mas : récepteur fonctionnel de Ang 1-7. Mas est omniprésent dans de nombreux tissus, y compris les reins, le cœur, les vaisseaux sanguins, le cerveau, le foie, la rate, les testicules et les poumons (ROBSON et *al.*, 2008).

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate, également connu sous le nom de : Le 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) est un activateur de la protéine kinase C (PKC). Le PMA est l'ester de phorbol le plus couramment utilisé. Il est actif à concentrations nanomolaires. Le PMA provoque une très large gamme d'effets dans les cellules et les tissus (YAN JIANG et JAMES FLEET, 2012).

LISTE DES FIGURES

Figures	pages
Figure 1 : Évolution de la production mondiale au cours des dernières campagnes oléicoles	3
Figure 2: Évolution de la consommation mondiale au cours des dernières campagnes oléicoles	4
Figure 3 : Évolution de la superficie oléicole nationale	6
Figure 4 : Evolution de la production de l'huile d'olive en (hl) sur le territoire nationale	7
Figure 5 : Diagramme d'extraction de l'huile d'olive par le système de presse	10
Figure 6 : Diagrammes d'extraction de l'huile d'olive par le système de centrifugation « Système à deux phases » et « Système à trois phases »	12
Figure 7 : Différentes filières de valorisation des margines	20
Figure 8: Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques	24
Figure 9: Effets bénéfiques des polyphénols sur la régulation de la glycémie dans le traitement du diabète	27
Figure 10: Schéma général de la biodisponibilité des polyphénols alimentaires chez l'homme	29
Figure 11: Absorption des polyphénols ingérés sous forme de glucosides et d'aglycones	30
Figure 12 : Structures des principaux composés phénoliques retrouvés dans les margines d'olives	34
Figure 13: La micromorphologie du genre <i>Aspergillus</i>	41
Figure 14: Structure chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1, M2	43
Figure 15 : Les gènes responsable de la biosynthèse des aflatoxines chez <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> . (A) Gènes en cluster (les flèches indiquent la direction de la transcription du gène) et (B) la voie de biosynthèse des aflatoxines	46
Figure 16: Représentation schématique des différents modes d'action potentiels des groupes majeurs d'inhibiteurs sur la production des aflatoxines.	53
Figure 17: Régulation de l'absorption intestinale du glucose avant (A) et après un repas (B). Model proposé par KELLETT et BROT-LAROCHE	55
Figure 18: Représentation de quelques facteurs de régulation et des molécules de signalisation (A) et (B) impliquées dans l'absorption intestinale du glucose	59
Figure 19: Diagramme d'extraction des polyphénols à partir des margines	69
Figure 20 : Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH	72
Figure 21: Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le radical ABTS ^{•+}	74
Figure 22: diagramme d'extraction des aflatoxines à partir du milieu liquide (SKMY) contaminés par <i>Aspergillus flavus</i>	78
Figure 23 : Diagramme d'extraction des aflatoxines à partir de la poudre de maïs contaminée par <i>Aspergillus flavus</i> selon le kit ELISA « compétition directe » <i>Celer AFLA B1</i> test kit	81
Figure 24 : Résumé des étapes de l'ELISA type « Compétition Directe »	83

Figure 25: Résumé du protocole du dosage de l'AFB1 extrait à partir du milieu SKMY et du maïs contaminés par <i>Aspergillus</i> selon le kit ELISA «compétition directe» <i>Celer AFLA B1</i> .	85
Figure 26 : Représentation du signal B/Bo (échelle linéaire) en fonction de la concentration en AFB1 (échelle semi-logarithmique)	86
Figure 27: Représentation schématique de la chambre d'Ussing	89
Figure 28 : Photo originale du montage électrophysiologique de la chambre d'Ussing	91
Figure 29: Représentation du prélèvement de la muqueuse intestinale (scraping)	93
Figure 30: photo originale de la morphologie de la lignée cellulaire Mode K, contraste en phase grossissement X20, culture en passage 24	94
Figure 31: Pourcentages de réduction du radical DPPH• en présence des différentes concentrations des standards et de la poudre et de l'extrait phénolique de margines.	105
Figure 32 : Pouvoir anti-radicalaire de la poudre et de l'extrait phénolique des margines, des standards (acide ascorbique et trolox) et des acides phénoliques (acide gallique et acide caféique).	106
Figure 33 : Le pouvoir réducteur du fer en présence des différentes concentrations de la poudre et de l'extrait phénolique des margines et des standards (acide ascorbique et trolox).	107
Figure 34 : évolution de l'activité anti-radicalaire de l'ABTS ^{•+} en présence des standards (acide ascorbique et le trolox), de la poudre de margines et de l'extrait phénolique de marge au cours du temps.	108
Figure 35 : Pourcentage du piégeage du radical ABTS ^{•+} par la poudre et de l'extrait phénolique de marge par rapport aux standards (acide ascorbique et le Trolox) après 6 minutes de la réaction.	108
Figure 36: Inhibition de la croissance d' <i>A. flavus</i> par la poudre de margines après 7 jours d'incubation à 28°C sur milieu SMKY	111
Figure 37: Inhibition de la croissance d' <i>A. flavus</i> par l'extrait phénolique après 7 jours d'incubation à 28 °C sur milieu SMKY	111
Figure 38: Photographie du chromatogramme obtenu sur les extraits d'aflatoxines de la culture d' <i>A. flavus</i> sur milieu SMKY en présence ou absence de la poudre et de l'extrait phénolique de margines (révélation à l'UV à 365 nm)	114
Figure 39: Croissance de la souche <i>Aspergillus flavus</i> (B) sur des grains de maïs humidifiés à 30 % et après 7 jours d'incubation à 28 °C. (A) représente des grains de maïs non contaminés par <i>Aspergillus flavus</i> , humidifiés à 30 % et après 7 jours d'incubation à 28 °C.	115
Figure 40: Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la croissance d' <i>Aspergillus flavus</i> sur maïs broyé et après une incubation de 7 jours à 28°C.	116
Figure 41: Photographie du chromatogramme obtenu des extraits d'aflatoxines de la culture d' <i>A. flavus</i> sur la poudre de maïs en présence ou en absence de la poudre et de l'extrait phénolique de margines (révélation à l'UV à 365 nm).	119
Figure 42: Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la germination des grains de maïs après humidification à 30 % et incubation 7 jours pendant 28 °C par apport au témoin	120
Figure 43: Evolution de la tolérance au glucose chez les souris traités par les margines en présence du glucose (1g/kg)	127

Figure 44 : Evolution de la tolérance au glucose chez les souris traités par l'extrait phénolique des margine (EPM) en présence du glucose (1 g/kg).	128
Figure 45 : Mesures de la tension transépithéliale Glucose/Carbachol (A) et Glucose/Phloridzine (B) en (mV). Les mesures sont réalisées sur l'intestin de souris obtenue en chambre d'Ussing d'une surface de 0,5 cm ² .	131
Figure 46 : Courant de court-circuit (Isc) induit par le glucose en absence ou en présence de concentrations croissantes de PM et mesuré en chambre d'Ussing sur des fragments jéjunaux de souris.	132
Figure 47 : Courant de court-circuit (Isc) induit par le glucose en absence ou en présence de concentrations croissantes d'EPM et mesuré en chambre d'Ussing sur des fragments jéjunaux de souris.	133
Figure 48 : Le courant court-circuit (Isc) en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ traduisant l'effet du glucose (10 mM/l), margines (60 mg/ml) et du Carbachol (100 $\mu\text{M}/\text{l}$). Les mesures sont réalisées sur l'intestin de souris obtenu d'une surface de 0,5 cm ² en chambre d'Ussing.	134
Figure 49 : Le courant court-circuit (Isc) en $\mu\text{A} / \text{cm}^2$ traduisant l'effet du glucose (10 mM/), EPM (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et du Carbachol (100 $\mu\text{M}/\text{l}$). Les mesures sont réalisées sur l'intestin de souris obtenu d'une surface de 0,5 cm ² en chambre d'Ussing.	134
Figure 50 : Test toxicité de la poudre de margines (A) et de l'extrait phénolique de margines (B) sur la lignée cellulaire Mode-K de souris	135
Figure 51 : Expression de la protéine SGLT-1 dans la lignée de cellules intestinales Mode-K de souris en présences de la poudre ou de l'extrait phénolique de margines et en absence du PMA	136
Figure 52 : Expression de la PKC dans la lignée de cellules intestinales Mode K de souris en présences de la poudre ou de l'extrait phénolique de margines et en absence du PMA.	137
Figure 53 : L'expression de la protéine SGLT-1 dans la lignée de cellules intestinales Mode-K de souris en présence de la poudre ou de d'extrait phénolique de margines et en présence du PMA	138
Figure 54 : L'expression de la PKC dans la lignée de cellules intestinales Mode-K de souris en présence de la poudre ou de d'extrait phénolique de margines et en présence du PMA.	139
Figure 55 : L'expression de la protéine SGLT-1 au niveau de cellules intestinales après gavage des souris avec la poudre ou l'extrait phénolique de margines et en absence du glucose	140
Figure 56 : L'expression de la PKC au niveau de cellules intestinales après gavage des souris avec la poudre ou l'extrait phénolique de margines et en absence du glucose	141
Figure 57 : L'expression de la protéine SGLT-1 au niveau de l'intestin de souris après gavage avec la poudre ou de l'extrait phénolique de margines et en présence du glucose.	142
Figure 58 : L'expression de la PKC au niveau de l'intestin de souris après gavage avec la poudre ou de l'extrait phénolique de margines et en présence du glucose	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	pages
Tableau I : Répartition de la production, consommation, exportation et importation de l'huile d'olive des pays méditerranéens en 1000 tonnes.	5
Tableau II : Evaluation de la campagne oléicole 2015/2016 à travers les wilayas potentielles de la Kabylie par rapport au total de la production national d'olive et d'huile d'olive.	8
Tableau III : Composition en matières organiques des margines	15
Tableau IV : Composition en matières minérales des margines	16
Tableau V : Technologies de traitement appliquées sur les margines	18
Tableau VI : Les principales classes de composés phénoliques	23
Tableau VII : Activités biologiques des composés phénoliques	28
Tableau VIII : Les principales activités biologiques des composés phénoliques des margines	35
Tableau IX : Les principaux agents fongiques responsable de la production de mycotoxines dans les denrées agricoles dans le monde	36
Tableau X : Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différentes étapes de la chaîne alimentaire.	38
Tableau XI : Production d'aflatoxines B et G, d'acide cyclopiazonique et d'acide kojique par les principales espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	42
Tableau XII : Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines	44
Tableau XIII : Teneurs maximales pour les aflatoxines dans des denrées alimentaires selon les réglementations de la commission européenne	50
Tableau XIV : Les moyens de lutte pour chaque période définie contre les moisissures et les mycotoxines	51
Tableau XV : Résumé des facteurs régulateurs potentiels qui influencent sur l'absorption intestinale du glucose.	56
Tableau XVI : Liste des importants phytoconstituants à effet hypoglycémiant	61
Tableau XVII : Gradients d'élution pour l'analyse HPLC	70
Tableau XVIII : Echelle de classification des substances toxiques chez les rongeurs selon HODGE et STENER	87
Tableau XIX : Composition de la solution Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB)	90
Tableau XX : Caractéristiques des produits agissant sur les paramètres électriques de l'épithélium intestinal	90
Tableau XXI : Caractérisation physicochimique des margines provenant d'huilerie moderne	98
Tableau XXII : Temps de rétention, concentration et proportion (%) des composés phénoliques identifiés dans l'extrait phénolique des margines	101
Tableau XXIII : Activité anti-radicalaire de la poudre et de l'extrait phénolique des margines	105
Tableau XXIV : Pouvoir réducteur es ions ferriques exprimés en IC50 (µg/ml) en présence de la poudre de margine, de l'extrait phénolique de margine et des standards	107

Tableau XXV: Capacité d'inhibition de la poudre de margine de la biomasse du mycélium (g) de la souche toxigénique <i>A. flavus</i> dans le milieu SMKY	112
Tableau XXVI: Capacité d'inhibition de l'extrait phénolique des margines de la biomasse du mycélium (g) de la souche toxigénique <i>A. flavus</i> dans le milieu SMKY	112
Tableau XXVII: Pourcentages (%) d'inhibition de la poudre des margines et de l'extrait phénolique de margines sur la souche <i>A. flavus</i> après 7 jours d'incubation à 28 °C sur maïs broyé.	118
Tableau XXVIII: Teneur et pourcentage de production de l'AF B1 en présence de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur milieu SMKY	121
Tableau XXIX : Teneur et pourcentage de production de l'AF B1 en présence de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur maïs broyé	122
Tableau XXX : Variation de la glycémie chez les souris traitées en fonction du temps et de la dose de la poudre de margines.	127
Tableau XXXI: Variation de la glycémie chez les souris traitées en fonction du temps et de la dose d'extrait phénolique de margines.	129

Introduction générale

Les pays méditerranéens sont devenus les plus grands consommateurs, producteurs et exportateurs des olives et de l'huile d'olive. La production d'huile d'olive des pays du bassin méditerranéen représente approximativement 90 % de la production mondiale avec une production estimée à 2.874.500 tonnes (COI, 2017). De nos jours, avec la promotion des vertus bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé humaine, la demande ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît aussi. L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile comme produit principal, de grandes quantités de sous-produits solides appelés grignons et l'autre liquide appelé margines. La production mondiale de margines représente un volume de plus de 30 million m³/an (El-ABBASSI *et al.*, 2012).

Les margines sont des eaux de végétation qui sont générées lors de l'extraction de l'huile d'olive vierge. Ce sont des effluents riches en matières organiques (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines...) et en sels minéraux (potassium, sodium, magnésium...). Ces margines sont souvent épandues de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou stockées dans des bassins d'évaporation à proximité des huileries, exposant ainsi les systèmes eau-sol-plante à une pollution inéluctable. Les traitements physico-chimique et biologique des margines, qui consistent à réduire leur impact sur les ressources en eau, restent encore insuffisants et coûteux (YAAKOUBI *et al.*, 2009).

L'Algérie, pays comptant environ $6,2 \times 10^6$ d'oliviers réparties sur une superficie de 471657 ha selon les chiffres provisoires de la direction de la régulation de la production agricole (ANONYME 1, 2016a), compte parmi les pays du bassin méditerranéen où l'olivier trouve son aire d'extension. Elle est le 9^{ème} pays producteur d'huile d'olive à l'échelle mondiale avec une production de 80.000 tonnes en 2017/2018 de la production méditerranéenne. Ainsi, comme tous les pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive, l'Algérie est confrontée à la problématique de l'élimination des margines avec une production de 200.000 tonnes de margines/ an. Dans le souci de réduire les coûts des différents traitements appliqués aux margines et de rationaliser la gestion de leurs rejets, des recherches sont orientées sur leur valorisation dans divers domaines : compostage, agriculture et même dans l'industrie pharmaceutique.

Les molécules d'origine naturelle 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 qui présentent parfois des effets secondaires parfois très graves pour la santé humaine. Dans ce contexte, la valorisation de sous-produits issus de la filière oléicole peut s'avérer intéressante sur le plan environnemental voir même économique. Le but de celle-ci est l'utilisation de ces produits soit sous leurs forme brute avec quelque traitement à moindre coût, mais aussi d'en tirer les extraits et/ou les molécules bioactives. Les composés phénoliques comptent actuellement parmi les molécules les plus largement étudiées de par leurs multiples propriétés biologiques et fonctionnelles. Leur présence à des taux significatifs dans les sous-produits oléicoles notamment les margines justifie le choix de leur valorisation. L'objectif de cette thèse est la caractérisation physicochimique des margines brutes et de l'extrait phénolique des margines. Dans un second temps l'étude de leurs activités biologiques dont l'activité anti-oxydante, antifongique et de leur action hypoglycémiant.

Le présent manuscrit est entamé par une synthèse bibliographique, dans laquelle le sujet des margines et des polyphénols ainsi que leurs activités biologiques notamment l'activité anti-oxydante est discutée. Une partie est consacrée aux contaminations fongiques des

matrices alimentaires et au diabète principalement le diabète de type 2, décrivant ainsi les notions essentielles à la compréhension de notre travail.

Quant à la partie expérimentale, elle est consacrée à une présentation des techniques mises en œuvre pour la caractérisation physicochimique des margines brutes et de l'extrait phénolique des margines ainsi que les méthodes et les techniques d'évaluation de leurs activités biologiques (anti-oxydante, antifongique et hypoglycémiant), pour cela nous avons suivi les étapes suivantes :

Dans un premier temps, nous avons étudié les caractéristiques physicochimiques des margines brutes et de leur extrait phénolique. Dans un second temps, la poudre et l'extrait phénolique des margines ont été préparés pour les tests biologiques ; Ensuite, nous nous sommes intéressés aux tests biologiques, que nous avons entamés par l'évaluation de l'activité anti-oxydante suivie de l'activité antifongique et enfin l'action hypoglycémiant, celle-ci a été entamée par une étude préalable de la toxicité de ces produits sur des souris de laboratoire par administration orale. Le principal but de cette étude est d'évaluer le comportement des souris vis-à-vis de doses élevées de poudre ou de l'extrait phénolique des margines et de déterminer les doses létales. Des expériences ont été entreprises pour évaluer l'activité hypoglycémiant de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur des souris saines (C57BL/6J) de laboratoire et un modèle cellulaire murin d'origine intestinal (cellules Mode-K). Ces expériences, étaient basées sur trois tests : test de tolérance orale au glucose (OGTT), la chambre d'Ussing et l'étude par Western blot de l'inhibition du transporteur de glucose sodium dépendant (SGLT-1) et de la protéine kinase-C (PKC) impliquée dans la voie de signalisation de SGLT-1.

La troisième partie de ce travail consiste en une analyse des résultats obtenus et une discussion qui met en évidence leur signification par rapport aux données de la littérature.

Enfin, le manuscrit se termine par une conclusion générale qui permet de tirer quelques perspectives.

1^{ère} Partie :

Synthèse bibliographique

I. Quelques données sur le secteur oléicole

1.1. Situation mondiale, production et consommation

Le verger oléicole mondial s'étend sur une superficie de près de 11 millions d'hectares localisé essentiellement en Europe (Espagne, Italie et Grèce) avec 50 % du verger mondial et en Afrique avec 30 % situé majoritairement dans les pays du Maghreb (Tunisie, Maroc et l'Algérie) (ANONYME 2, 2014).

La production mondiale d'huile d'olive selon les derniers chiffres prévisionnels communiqués par les pays producteurs, serait supérieur de 14 % en 2017/2018 avec 2.894.000 tonnes par rapport à la campagne oléicole 2016/2017 (2539.000 tonnes), dont 2.717.000 tonnes dans les pays membres du conseil oléicole international (COI) qui représentent 94 % de la production mondiale (COI, 2017). La production européenne a atteint 1.805.000 tonnes, soit plus de 3 % de plus par rapport à la dernière campagne 2016/2017, avec l'Espagne en tête (1.090.500 tonnes), suivie de l'Italie (320.000 tonnes), de la Grèce (300.000 tonnes), du Portugal (220.000 tonnes), de Chypre (6000 tonnes), de la Croatie (5500 tonnes), de la France (5000 tonnes) et de la Slovénie (500 tonnes). La production de l'ensemble des autres pays membres du COI augmenterait fortement de 51 % par rapport à la campagne oléicole 2016/2017. La Turquie, en première position avec 287.000 tonnes, suivie de la Tunisie (220.000 tonnes), du Maroc (140.000 tonnes), de l'Algérie qui poursuit sa tendance à la hausse (80.000 tonnes, + 27 %), de la Jordanie (29.500 tonnes), de l'Égypte (25.000 tonnes), du Liban (23.000 tonnes), de l'Argentine (37.000 tonnes), de la Libye (18.000 tonnes), d'Israël (16.000 tonnes), Les autres pays enregistreraient des volumes inférieurs.

Une fois par an, le COI actualise des séries de statistiques mondiales sur la production et consommation depuis la campagne oléicole 1990/1991. L'évolution de la production mondiale par groupes de pays producteurs : pays producteurs européens membres du COI ; autres pays membres du COI ; et pays non membres du COI est représentée dans la figure 1.

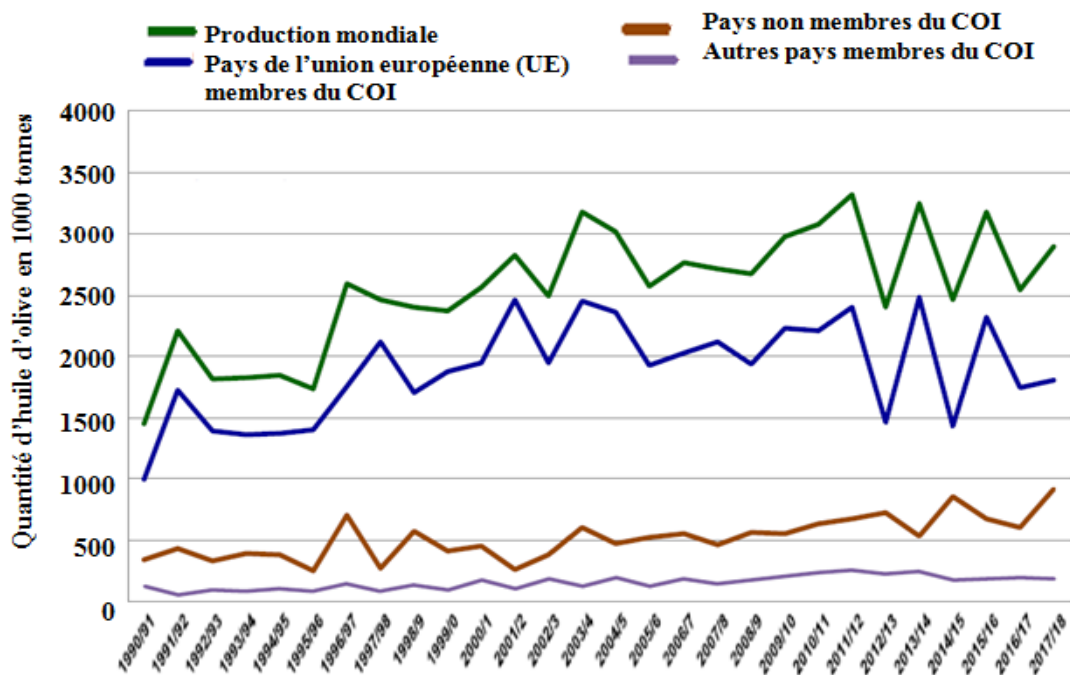


Figure 1 : Évolution de la production mondiale au cours des dernières campagnes oléicoles (COI, 2017).

La consommation mondiale d'huile d'olive selon les derniers chiffres prévisionnels communiqués par les pays producteurs, a augmenté de 5 % en 2017/2018 avec 2.904.000 tonnes par rapport à la campagne oléicole précédant 2016/2017 (2.803.000 tonnes). Le groupe des pays de l'Union européenne a vu sa consommation augmenter de 1 %, avec un total de 1.549.000 tonnes. Les pays qui ont enregistré les plus fortes augmentations sont la Grèce (+ 8 %), l'Espagne et l'Italie (+ 2 % respectivement) et les petits producteurs (Chypre, Croatie et Slovénie), dont la consommation a augmenté globalement de 20 %.

Dans le reste des pays membres du COI, l'augmentation moyenne a été de 7 %, avec en tête de liste l'Iran (+ 33 %) suivie de l'Algérie (+ 25 %), l'Égypte (+ 20 %), la Tunisie (+ 17 %), la Libye (+ 16 %), le Liban (+ 11 %), l'Argentine (+ 8 %) et la Jordanie (+ 4 %), alors que la consommation a diminué en Albanie (- 4 %), en Israël (- 3 %) et en Turquie (- 1 %).

Dans les autres pays, le niveau de consommation a été similaire à celui de la campagne oléicole 2016/2017. Parmi les pays non membres du COI, la consommation a augmenté en Chine (+ 16 %), au Canada (+ 9 %), en Russie (+ 3 %), et aux États- Unis et en Australie (+ 5 % respectivement), alors qu'elle a diminué au Brésil (- 25 %) et au Japon (- 8 %).

L'évolution de la consommation mondiale dans les trois groupes de pays : pays producteurs européens membres du COI ; autres pays membres du COI et pays non membres du COI est représentée dans la figure 2.

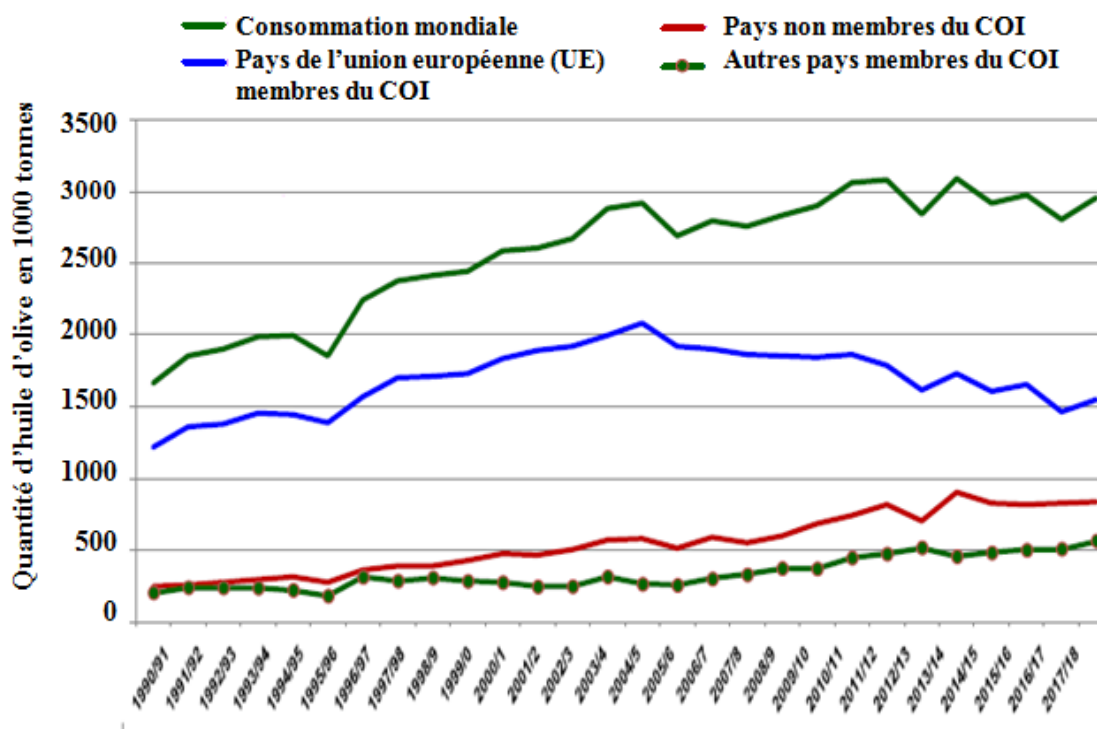


Figure 2: Évolution de la consommation mondiale au cours des dernières campagnes oléicoles (COI, 2017)

1.2. Situation dans le bassin méditerranéen

Le bassin méditerranéen est le cœur productif et commercial de l'huile d'olive avec près de 95 % des oliviers mondiaux qui se concentrent sur 3 millions d'exploitations. En effet l'huile d'olive est enracinée dans la culture alimentaire méditerranéenne depuis plusieurs siècles. Le pourtour méditerranéen demeure le premier producteur et consommateur d'huile d'olive avec une concentration de la production en Espagne suivie de l'Italie, la Grèce, la Syrie, la Turquie, la Tunisie, le Maroc, le Portugal et l'Algérie.

La production mondiale d'huile d'olive selon les derniers chiffres prévisionnels du COI 2017/2018, serait supérieure de 14 % à celle de la campagne oléicole 2016/2017. La production devrait en effet avoisiner les 2.894.000 tonnes. La production la plus importante, selon le prévisionnel du COI 2017/2018, sera celle de l'Espagne avec 1.090.500 tonnes, verrait sa production diminuer de 15 % par rapport à la campagne de 2016/2017, suivie de l'Italie avec 320.000 tonnes (+ 76 %) ; de la Grèce avec 300.000 tonnes (+ 54 %), de la Turquie, avec 287.000 tonnes (+ 62 %), de la Tunisie, avec une production de 220000 tonnes (+ 120 %), du Maroc avec 140.000 tonnes (+ 27 %), de l'Algérie, avec 80.000 tonnes (+ 27 %), de la Jordanie avec une production de 25000 tonnes (soit + 25 %), de la Libye avec 18.000 tonnes(+ 12 %) et d'Israël, avec 16000 tonnes (+ 7 %), alors que la production du Liban diminuerait de 8 %, avec 23.000 tonnes (COI, 2017). La répartition de la production, consommation, exportation et importation de l'huile d'olive des pays méditerranéens en 1000 tonnes est représentée dans le tableau I.

Tableau I : Répartition de la production, consommation, exportation et importation de l'huile d'olive des pays méditerranéens en 1000 tonnes (COI : prévisionnel 2017/2018)

Pays	Production	Consommation	Exportation	importation
Albani	11	12,5	0	1,5
Algérie	80	85	0	0
Egypte	25	22	0	0
Espagne	1090,5	470	255	55,9
Grèce	300	120	9,8	0
Israël	16	21	0	5
Italie	320	557	220,3	85
Jordanie	25	24,5	0,5	0
Liban	23	21	6	3
Lybie	18	18	0	0
Maroc	140	120	20	6
Palestine	19	15	4	0
Syrie	100	100	0	0
Tunisie	220	35	180	0
Turquie	287	170	90	0

1.3. Le secteur oléicole algérien

1.3.1. Potentiel oléicole en Algérie

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens producteurs d'huile d'olives avec une production estimée à 2,22 % de la production mondiale (COI, 2014). En effet le climat de l'Algérie est adapté à la culture de l'olivier. La superficie du verger oléicole au cours de la campagne 2015/2016 ; selon les chiffres provisoires de la direction de la régulation de la production agricole (DRDPA), s'élève à 471.657 ha (figure 3). Cette superficie a connu une augmentation de près de 16 % comparativement à la campagne de 2014/2015 ce qui correspond à la mise en place de plus de 64.000 ha de nouvelles plantations (ANONYME 1, 2016).

La surface oléicole est répartie sur trois régions : le centre (54,3 %) ; l'Est (28,3 %) et l'Ouest (17 %). Selon les données de la COI la plus grande région oléicole algérienne est située au centre nord du pays et particulièrement en Kabylie avec 58,4 % de la surface oléicole totale (LOUADJ et GIUFFRE (2010) cité par NADOUR (2015)). En effet la plus part des oliveraies (environ 80 %) sont plantées dans des zones de montagne, sur des terrains accidentés et caractérisés par une pluviométrie annuelle moyenne comprise entre 400 à 900 millimètres (BENOUAFA, 2014).

Une évolution de 10 % du nombre total d'oliviers a été enregistrée lors de la campagne 2015/2016, pour atteindre près de 6.200.000 oliviers. Cette augmentation a été constatée essentiellement dans les wilayas de Béjaïa, Skikda, Saida, Djelfa et Chlef ce qui correspond à 64 % des oliviers plantés à l'échelle nationale (ANONYME 1, 2016).

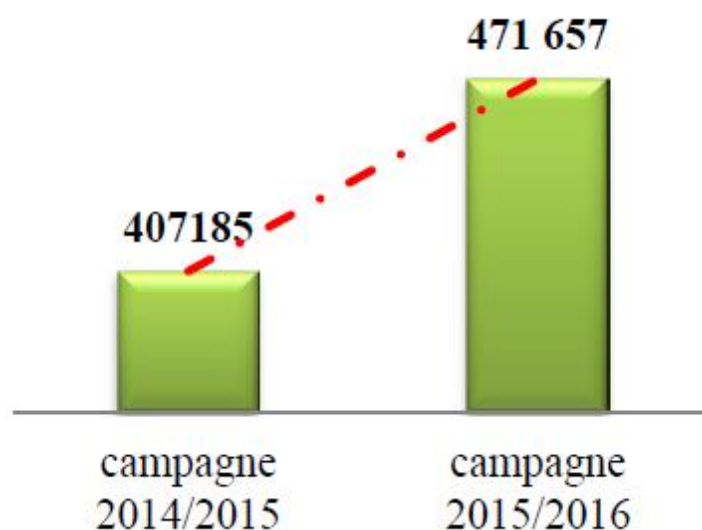


Figure 3 : Évolution de la superficie oléicole nationale (ONFAA, 2016a)

Les variétés d'oliviers cultivées en Algérie sont la variété population chamlal (90 %), la variété population azaradj et la variété population lemli (10 %) (MANSOUR-BENAMAR, 2013).

Selon le bilan de la campagne oléicole 2015/2016 établi par l'observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires. La production nationale de plants d'oliviers au cours de la campagne 2015/2016 a été assurée par 72 unités de multiplication. La gamme variétale

autorisée à la production et à la multiplication, selon le centre national de contrôle et de certification des semences et plants (CNCC), s'étale sur un total de 46 variétés d'olivier ; cependant, les variétés les plus multipliées au cours de la campagne 2015/2016 se limitaient seulement à 14 variétés. Dans le centre et l'est du pays prédominent les variétés populations 'la grosse de Hamma' , 'Chemlal', 'Azeradj', 'Bouchouk', 'Rougette', 'Blanquette' et 'Limli'.

Malgré les conditions climatiques la production d'olives a connu une évolution de 7 % comparativement à la campagne de 2014/2015. Quant à la production d'olives destinées à l'huile, l'évolution a été plus considérable puisque la production passe de 420 mille tonnes au cours de la campagne écoulée à plus de 470 mille tonnes au cours de cette campagne, soit un accroissement de 13 % (ANONYME 1, 2016).

La production de l'huile d'olive a enregistré le niveau le plus élevé des 15 dernières années en atteignant plus de 900.000 hl à travers le territoire national soit une croissance de 25 % comparativement à la campagne écoulée 2014/2015 (figure 4). Ce résultat s'explique par l'entrée en production de près de 2,5 millions d'oliviers au cours de cette campagne.

Il existe à l'échelle nationale 1705 huileries, dont 85 % sont des huileries traditionnelles et 10 % des huileries modernes, et 45 unités de conditionnement d'olives de table selon les données du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rurale et de la pêche (ANONYME 1, 2016).

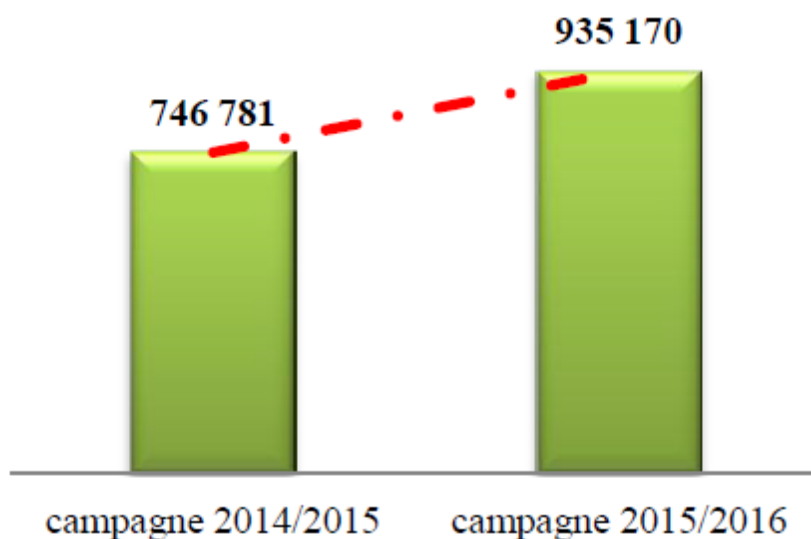


Figure 4 : Evolution de la production de l'huile d'olive en (hl) sur le territoire nationale (ANONYME 1, 2016a)

Les prévisions de production pour la campagne 2016/2017 faites par la direction des services agricoles des wilayas potentiellement oléicoles laissent apparaître une régression de la production comparativement à la campagne écoulée 2015/2016 (-11 %). Cependant, les oléiculteurs espèrent des pluies avant les récoltes, ce qui pourrait améliorer la situation actuelle (ANONYME 3, 2016).

1.3.2. Potentiel oléicole dans la région de Kabylie

En Kabylie, les vergers oléicoles se caractérisent par une densité inégale et sont conduits en sec ou en irrigué (SAHLI, 2009).

Les terres agricoles de Kabylie sont connues pour leur production importante d'olives. Le Centre-Nord du pays est une région potentielle : 90 % du verger oléicole est détenu par les wilayas de Bejaïa, Tizi-Ouzou et Bouira (ANONYME 1, 2016). L'oléiculture orientée vers la production d'huile d'olive domine la quasi-totalité de la région de Bejaïa, avec près de 70 % de la surface arboricole totale. Elle s'étend sur une superficie de plus de 60.000 ha (BOUDI et al., 2013). Le tableau II ci-dessous donne une évaluation de la campagne oléicole 2015/2016 à travers les wilayas potentielles de la Kabylie.

Tableau II: Evaluation de la campagne oléicole 2015/2016 à travers les wilayas potentielles de la Kabylie par rapport au total de la production national d'olive et d'huile d'olive (ANONYME 1, 2016)

Wilaya*	Bejaïa		Tizi-Ouzou		Bouira		Total national	
	2014/ 2015	2015/ 2016	2014/ 2015	2015/ 2016	2014/ 2015	2015/ 2016	2014/ 2015	2015/ 2016
Superficie (ha)	52.798	55.518	35.608	36.290	35.098	35.809	407.185	424.028
Production d'olive en quintaux (Qx)	893.428	999.835	382.457	534.642	671.257	302.780	420.431	4.747.306
Production d'huile d'olive en hectolitre (hl)	193.312	212.896	75.862	100.947	118.710	56.700	746.781	935.170
Rendement en olive en quintal par hectare (q/ha).	21,1	19	13,3	15	29,2	12	20,2	23
Rendement en huile en litres par quintal (l/q)	21,6	21	19,8	19	17,7	19	17,8	15

* : les wilayas potentielles ont été choisies à partir de la moyenne de production de l'huile d'olive sur une période de 5 campagnes

Les prévisions de production pour la campagne 2016/2017 faites par la direction des services agricoles des wilayas potentiellement oléicoles sur le territoire national laissent apparaître une régression de la production comparativement à la campagne de 2015/2016. La plus grande baisse, selon les prévisions, est enregistrée dans la wilaya de Bejaïa avec 160.954 hl (-15%) de production des olives à huile (ANONYME 3, 2016).

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

Le processus d'extraction d'huile d'olives se base sur quatre opérations principales :

- les opérations préliminaires qui consistent en l'effeuillage des olives ;
- le lavage ;
- le broyage- malaxage ;
- et la séparation des phases.

La séparation du mout huileux et du grignon, réalisée par divers systèmes, font appel à des principes mécaniques de conception différente (CHIMI, 1997 ; ZBAKH et EL ABBASSI, 2012).

2.1. Système de presse (Procédé en discontinu)

C'est le système traditionnel le plus utilisé pour extraire l'huile des olives. Le broyage des olives suivi du malaxage se font sous des meules. Une pâte est obtenue au bout d'une demi-heure environ. Elle est composée de grignon et d'un moût contenant l'huile et les margines. Cette pâte est ensuite étendue sur des disques de fibre qui sont empilés les uns sur les autres et placés dans la presse hydraulique.

La séparation des deux phases solide-liquide se fait par simple pression, alors que l'huile est séparée des margines par décantation naturelle ou par centrifugation dans des centrifugeuses verticales (ROIG et *al.*, 2006).

Il existe aussi des huileries équipées de super presses (huileries semi-modernes) qui travaillent à des pressions pouvant atteindre 400 kg/cm². Le grignon produit dans ce cas présente un taux d'humidité d'environ 28 %. Le rendement de l'extraction est de 86 à 90 % par rapport à l'huile contenue dans le fruit (PETRAKIS, 2006). Il y a aussi un gain de temps appréciable par suite de l'utilisation de chariots qui servent à charger et décharger les scourtins (CHIMI, 2006).

La séparation des phases liquides s'effectue toujours dans des bacs de décantation. Le diagramme du système de presse est illustré dans la figure 5.

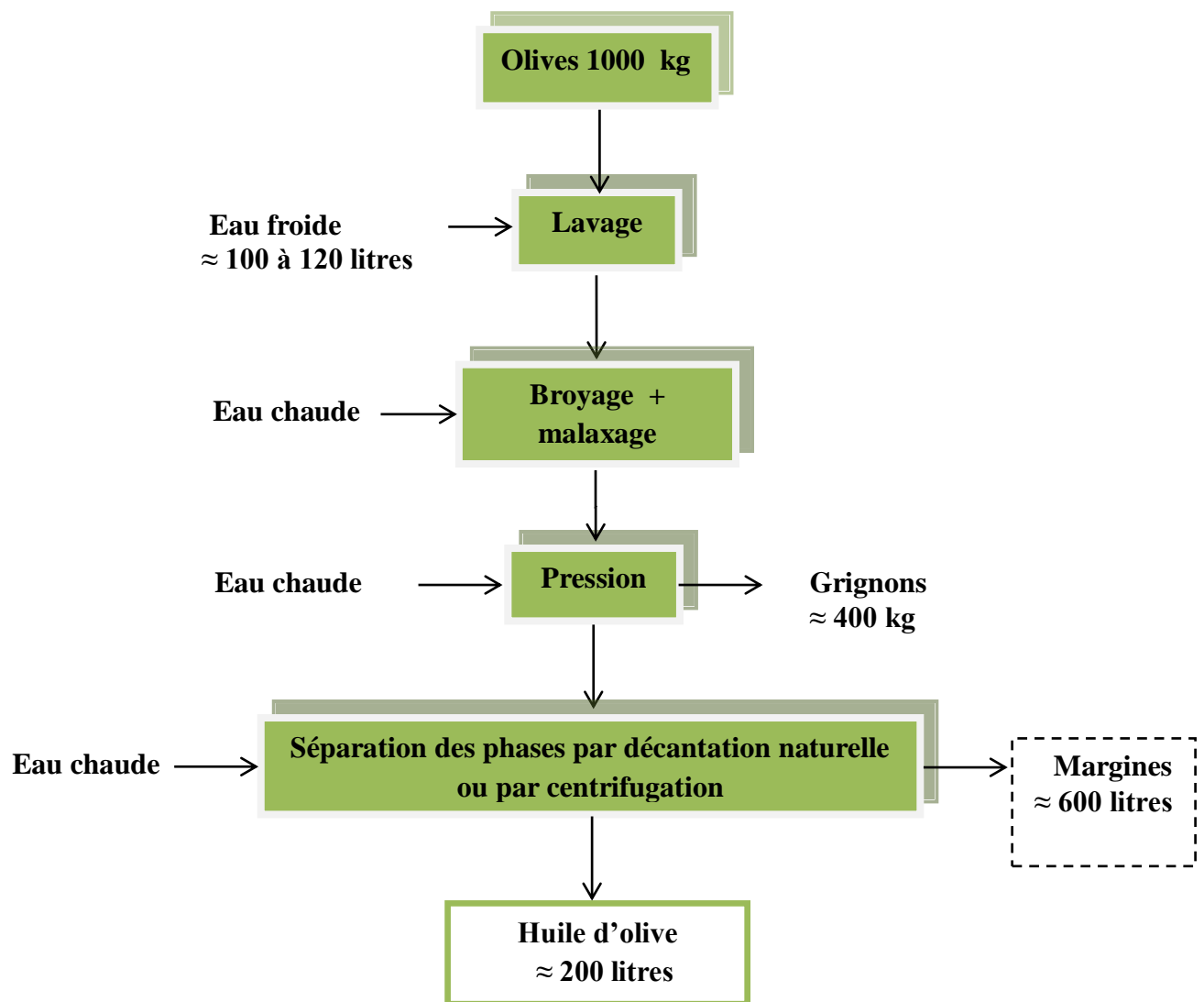


Figure 5 : Diagramme d'extraction de l'huile d'olive par le système de presse (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012).

2.2. Système de centrifugation (Procédé en continu)

C'est le système moderne dont on distingue deux types : Système de centrifugation à trois phases et système de centrifugation à deux phases.

* Système de centrifugation à trois phases

Ce système permet la séparation de trois matières : L'huile d'olive, le grignon et les margines (ZBAKH et EL ABASSI, 2012).

Il exige l'ajout de l'eau chaude à la pâte d'olive issue du malaxage avant d'entrer dans le décanteur centrifuge, afin que les différentes phases se séparent selon leur densité, en appliquant des forces centrifuges élevées à l'intérieur des machines appelées centrifugeuses horizontales pour la séparation des phases solide-liquide, ou centrifugeuses verticales pour la séparation des phases liquide-liquide qui tournent à des vitesses élevées environ 3500 tours/min (EL HADJJOUI, 2007 ; ZBAKH et EL ABASSI, 2012).

* Système de centrifugation à deux phases

Ce système permet la séparation de deux matières : L'huile d'olive et le grignon humide.

Les olives subissent les mêmes étapes que celles du système à trois phases. Cependant, ce présent procédé d'extraction d'huile d'olive fonctionne avec un nouveau décanteur de centrifugation à deux phases (huile et grignons d'olives humides) qui ne nécessite pas l'adjonction d'eau pour la séparation des phases huileuses et solides contenant les grignons et les margines. Ce décanteur à deux phases permet l'obtention de rendements en huile légèrement plus élevés que ceux obtenus par le décanteur conventionnel à trois phases et le système de presse. Ainsi qu'une production d'un grignon humide avec une proportion d'eau comprise entre 65 % et 70 % (CHOUCHENE et *al.*, 2010 ; ZBAKH et EL ABASSI, 2012).

Les diagrammes du système de centrifugation à deux et à trois phases sont illustrés dans la figure 6.

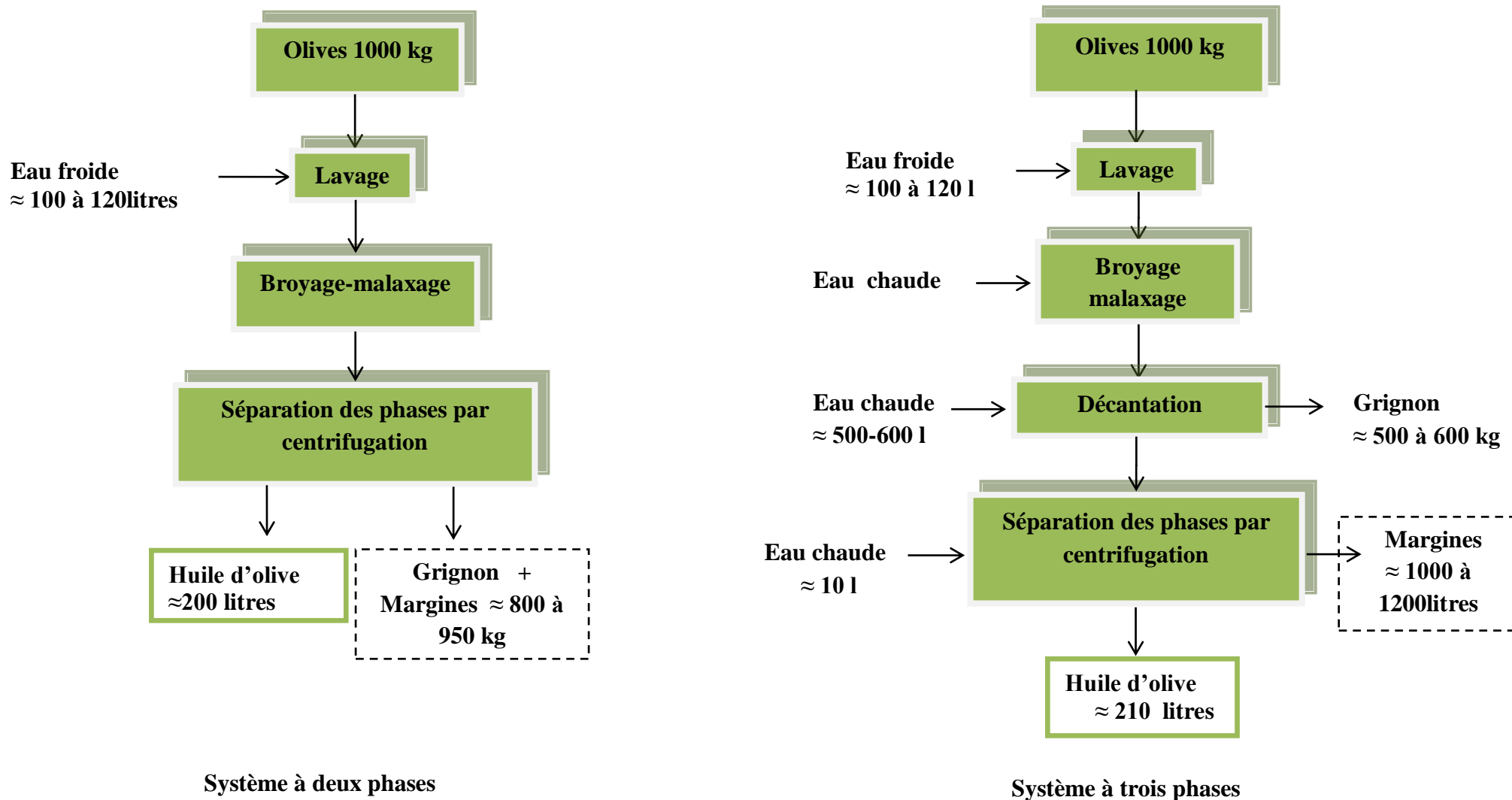


Figure 6 : Diagrammes d'extraction de l'huile d'olive par le système de centrifugation « Système à deux phases » et « Système à trois phases » (ALBURQUERQUE et al., 2004 ; ZBAKH et EL ABBASSI, 2012).

2.3. Comparaison entre le système de presse et le système de centrifugation

La différence substantielle entre les deux systèmes réside dans la durée des opérations et les rendements en termes de quantité et de qualité de l'huile par quintal d'olives traitées.

Les installations à cycle continu présentent les avantages suivants : Un faible degré d'encombrement, une grande puissance de travail, un faible besoin en main d'œuvre (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2006), ainsi qu'une automatisation complète et une obtention d'une huile de bonne qualité (CHOUCHENE et *al.*, 2012). Néanmoins, ces installations présentent des inconvénients dus principalement à la consommation élevée d'eau et d'énergie, une production accrue de margines (système de centrifugation à trois phases) et l'installation est plus coûteuse (ROIG et *al.*, 2006).

Dans les unités traditionnelles, la technologie employée est rudimentaire. En effet, le broyage grossier et l'insuffisance du pressage se traduisent par de faibles rendements d'extraction, soit une perte d'huile estimée à 7000 tonnes/campagne (RANNALI et *al.*, 2003a). Par contre, l'addition non significative d'eau lors de l'extraction se répercute sur la charge des margines en matières organiques en suspension. En effet, les margines des unités traditionnelles sont plus chargées et plus concentrées que ceux des unités modernes (MOUNCIF et *al.*, 1993 ; BEN SASSI et *al.*, 2006). De plus, le stockage prolongé des olives, l'absence de lavage et l'insuffisance de nettoyage des scourtins font que les huiles obtenues au niveau des unités traditionnelles sont de mauvaise qualité organoleptique. En effet, l'huile obtenue est plus sujette à l'oxydation, c'est essentiellement la présence de feuilles, de brindilles en trop grandes quantités qui donnent des huiles amères et de couleur verdâtre suite à une concentration élevée en pigments chlorophylliens, ceux-ci possèdent des propriétés pro-oxydantes en présence de la lumière et accélèrent la rancidité de l'huile qui les contient (RANNALI et *al.*, 2003b).

Les huiles d'olives extraites par centrifugation à trois phases contiennent 40 à 50 % moins de polyphénols totaux que les huiles extraites à partir des mêmes olives par les systèmes de presse ou de centrifugation à deux phases. En effet, les polyphénols relativement hydrosolubles passent partiellement dans les margines, ce qui se traduit par une faible résistance de l'huile à l'oxydation. Néanmoins, le système de presse peut donner une huile riche en polyphénols permettant sa propre conservation à la consommation selon les caractéristiques physicochimiques mises en œuvre par la réglementation en vigueur (CHIMI, 2006).

Certains auteurs rapportent que la demande chimique en oxygène (DCO) des margines, qui est considérée comme la mesure de la totalité des matières organiques contenues dans les margines, provenant d'un système de centrifugation varie entre 20 et 200 g d'O₂/l de margines (HAMDI, 1993 ; DHOUIB et *al.*, 2005 ; YAAKOUBI et *al.*, 2009). Celle des margines produites par les systèmes de presse varie entre 100 et 390 g d'O₂/l de margines (MOUNCIF et *al.*, 1993 ; BLIKA et *al.*, 2009).

III. Les sous- produits de l'olivier et les margines en particulier

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile, laisse deux résidus l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons) qui représentent 30 et 50 % du poids total des olives traitées. De plus, l'olivier, à travers la taille engendre des feuilles, des brindilles et du gros bois (CHOUCHENE et *al.*, 2012).

3.1. Feuilles et brindilles

Ce ne sont pas les produits de la taille mais des feuilles recueillies après le lavage et le nettoyage des olives à l'entrée de l'huilerie. Leur quantité est estimée de 5 à 6 kg de matières sèches par arbre et par an (NEFZAUI, 1991). Les feuilles peuvent être valorisées comme des antioxydants naturels (HERRERO et *al.*, 2011) destinés aux industries agroalimentaires et pharmaceutiques (LEE et *al.*, 2009), comme des agents antibactériens grâce à leur richesse en polyphénols (LIU Y et *al.*, 2017).

3.2. Grignons ou tourteaux d'olive

Les grignons sont des résidus solides issus de la première pression ou centrifugation, ils sont formés de pulpes et de noyaux d'olives. Ce sous-produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite « huile du grignon d'olive » après extraction chimique (CHIOFALO et *al.*, 2004).

3.3. Margines ou eaux de végétation

Les margines, parfois dénommées alpechine, sont des résidus liquides bruns séparés de l'huile d'olive à partir de l'eau contenue dans le fruit, et celle ajoutée au cours des étapes de trituration par sédimentation après le pressage ou par centrifugation. Elles contiennent un pourcentage d'huile résiduelle et de matières solides provenant de la pâte, qui varie en fonction de la technologie d'extraction (RAMOS-CORMENZANA et *al.*, 1995 ; TAKAÇ et KARAKAYA, 2009). Ces effluents constituent un important facteur de pollution dans l'aire méditerranéenne à cause de leur charge élevée et toxique en matières organiques, ainsi que leur acidité moyennement élevée (JEGUIRIMA et *al.*, 2012).

Les huileries dotées d'équipements relativement modernes ont des productions de margine pouvant atteindre 150 kg/100 kg d'olives dont la quantité d'eau ajoutée est de 110 kg. Tandis qu'avec des dispositifs d'extraction traditionnels, la quantité de margines produites est de 40 kg/ 100 kg d'olives (ACHAK et *al.*, 2008).

3.3.1. Caractéristiques physico-chimique et microbiologique des margines

3.3.1.1. Caractéristiques physicochimiques des margines

La composition des margines résulte de la dégradation des tissus des olives au cours de la trituration et de l'extraction de l'huile (COSSU et *al.*, 1993), et elle varie qualitativement et quantitativement selon la variété et le stade de maturation des olives, les conditions pédoclimatiques, la durée et les conditions de stockage avant la trituration et le processus de l'extraction de l'huile d'olive (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012 ; GÜNAY et ÇETIN, 2013 ; AGGOUN et *al.*, 2016).

Les margines sont caractérisées par une charge organique élevée qui est représentée essentiellement par les sucres (raffinose, mannose, saccharose, glucose, arabinose et xylose), les tanins, les polyalcools, les composés phénoliques, les acides organiques (l'acide fumarique, glycérique, lactique et malonique), les lipides et les acides aminés principalement les acides : Aspartique, glutamique, proline et glycine (JAOUANI et *al.*, 2003 ; ZBAKH et EL ABBASSI, 2012), et par une légère acidité, une couleur brune rougeâtre à noire et une conductivité élevée (tableau I).

Tableau III : Composition en matières organiques des margines (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012).

Paramètres	Gamme des valeurs
pH	4,7 - 5,7
Conductivité (mS/cm)	5 - 41
DCO (g/l)	16,5 - 190
DBO ₅ (g/l)	41,3 - 46
Résidus sec (g/l)	11,5 - 102,5
Matières organiques (g/l)	16,7 - 81,6
Lipides (g/l)	1,64 - 9,8
Polyphénols (g/l)	0,002 - 11,5
Sucres (g/l)	1,3 - 8,79
Acides organiques (g/l)	0,78 - 1
Azote total (g/l)	0,06 - 0,95

Les travaux effectués par NOUBIH et *al.* (2007) ont montré que les margines ayant fait l'objet de leurs études, sont constituées de 83 à 94 % d'eau, 4 à 16 % de matières organiques et 0,4 à 2,5 % de sels minéraux.

Jusqu'à présent, plus de 50 composés phénoliques différents ont été identifiés dans les margines (OBIED et *al.*, 2005). Les principaux composés phénoliques des margines sont l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol. Ces composés possèdent de nombreuses activités biologiques y compris des fonctions antibactériennes, antivirales, anti-oxydantes et anti-inflammatoires. En plus de ces composés phénoliques, les margines contiennent beaucoup d'éléments nutritifs précieux comme les sucres, les protéines et le phosphore (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012), ainsi que des fibres alimentaires solubles en particulier la pectine qui possède une excellente capacité de gélification (GALANAKIS et *al.*, 2010).

Les margines contiennent aussi des ressources précieuses tels que les éléments minéraux, surtout le potassium qui pourrait être réutilisé comme un engrais potentiel, cité par DERMECHE et *al.* (2013). Elles contiennent aussi quelques ions métalliques importants comme le calcium (Ca), le magnésium (Mg), ainsi que certains métaux notamment les métaux lourds, tels que le plomb (Pb) et le cadmium (Cd), qui sont bien connus en tant qu'éléments potentiellement toxiques (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012) (Tableau IV).

Tableau IV : Composition en matières minérales des margines (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012).

Eléments	Gamme des valeurs
Plomb (Pb) (µg/l)	6,7 - 10
Cadmium (Cd) (µg/l)	0,03 - 10
Fer (Fe) (mg/l)	0,45 - 20
Zinc (Zn) (mg/l)	1,7 - 4,98
Cuivre (Cu) (mg/l)	0,49 - 2,96
Manganese(Mn) (mg/l)	0,46 - 20
Magnesium(Mg) (g/l)	0,03 - 0,17
Calcium (Ca) (g/l)	0,03 - 0,29
Potassium (K) (g/l)	0,73 - 6,1
Chlore (Cl) (g/l)	0,76 - 1
Sodium (Na) (g/l)	0,03 - 0,13

3.3.1.2. Caractéristiques microbiologiques des margines

Dans les effluents d'huileries d'olive, seuls quelques microorganismes arrivent à se développer dont les champignons et les levures. Parmi les levures, on trouve : *Trichosporium cutaneium*, *Cryptococcus albidius* ainsi que les genres *Rhodotorula sp.*, *Candida sp.* et *Saccharomyces sp.* La flore fongique se compose essentiellement d'*Aspergillus candidus*, *Penicillium negricans*, et *Alternaria sp.* (AISSAM et al., 2003). Dans la plupart des cas, il y a absence de microorganismes pathogènes et ils ne posent alors aucun problème de point de vue sanitaire. En effet, ces effluents possèdent un pouvoir antimicrobien lié essentiellement à l'action exercée par les phénols monomériques et les pigments bruns ou catéchol-mélaninique (HAMDI et ELLOUZ, 1993). Ces composés agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (RANALLI, 1992). Ils peuvent également inhiber l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en inhibant l'activité des enzymes (et/ou) en précipitant les protéines nutritionnelles (HATTENSCHWILER et VITOUSEK, 2000).

3.3.2. Impact des margines sur l'environnement

3.3.2.1. Impact sur le sol

L'épandage directe des margines sur le sol a des effets déterminants non seulement sur la croissance des plantes et l'activité microbienne mais aussi sur la composition physico-chimique du sol, et par conséquent l'épandage contrôlé des volumes de margines peut réduire leurs impact négatif et être un bon amendement organique des sols (YAAKOUBI et al., 2009).

Le principal inconvénient de l'utilisation directe des margines pour l'irrigation du sol est leurs concentration élevée en composés phénoliques qui sont phytotoxiques (SAYADI et

al., 2000 ; ZENJARI *et al.*, 2006) et peuvent inhiber la germination des graines. De plus, les margines contiennent des résidus huileux, ce qui conduit à une augmentation de l'hydrophobicité du sol et une diminution de la rétention d'eau et le taux d'infiltration (RANNALI *et al.*, 2003 ; KAVVADIAS *et al.*, 2010).

3.3.2.2. Impact sur les eaux

La très forte charge en demande chimique en oxygène (DCO) et surtout en demande biochimique en oxygène mesurée au bout de 5 jours (DBO₅) des margines empêche l'autoépuration des eaux et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances (JUSTINO *et al.*, 2012). Du fait de la richesse des margines en sucres réducteurs, leur rejet dans les milieux aquatiques provoque la prolifération des microorganismes et une diminution de la disponibilité de l'oxygène pour d'autres organismes vivants ainsi un déséquilibre de l'écosystème aquatique (KAPELLAKIS *et al.*, 2006).

Les margines possèdent aussi un impact sur les eaux de surfaces car les fortes concentrations en composés phénoliques sombres peuvent colorer les eaux naturelles (les ruisseaux et les rivières) (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2006). De plus, les lipides des margines forment un film imperméable à la surface de l'eau ce qui empêche le passage de l'oxygène et de la lumière et par conséquent limiter le développement des plantes (KAPELLAKIS *et al.*, 2006). L'accumulation du phosphore provoque l'eutrophisation des eaux et favorise la multiplication de microorganismes pathogènes. Ainsi, l'épandage des margines très riches en éléments azotés, peut causer une pollution par les nitrates des nappes situées (dans /ou) à proximité de la zone d'épandage et souiller la qualité de l'eau potable (BEN YAHIA et ZEIN, 2003).

3.3.2.3. Impact sur les plantes

L'application des margines à des doses commodes pourrait être bénéfique pour les plantes du fait de la richesse de ces effluents en matières organiques et en éléments nutritifs (SAADI *et al.*, 2007). De l'autre côté, l'application incontrôlée des margines pourrait inhiber la germination des graines, la croissance des plantes ainsi que la synthèse de chlorophylle (MEKKI *et al.*, 2013).

3.3.3. Traitements des margines

Le traitement des margines est l'un des plus importants problèmes environnementaux des pays méditerranéens à cause de leur DCO élevée ainsi que leur teneur élevée en composés phénoliques, qui les rendent difficiles à traiter (JEGUIRIM *et al.*, 2012).

Différents procédés de traitement ont été proposés, tels que les traitements aérobies et les traitements anaérobies. Cependant ces méthodes présentent plusieurs inconvénients qui rendent leur mise en œuvre très difficile et très coûteuse (KAPELLAKIS *et al.*, 2008).

Les processus thermiques sont les moyens principaux pour le traitement de grandes quantités de margines. Néanmoins, du fait que ces effluents contiennent des quantités élevées en eau, leur traitement thermique n'est pas économiquement viable bien que la combustion des margines concentrées avec du grignon d'olive a été étudiée (MIRANDA *et al.*, 2008).

Les différents procédés de traitement proposés peuvent être subdivisés en trois grands groupes, utilisés seuls ou combinés. Ils sont représentés dans le tableau V.

Tableau V : Technologies de traitement appliquées sur les margines

Type de traitement	Procédé	Principe.	Références
Traitements physiques	Evaporation naturelle ou (lagunage).	Autoépuration naturelle des margines dans des bassins de profondeur (0,7 à 1, 5m) par des processus de fermentation aérobies et anaérobies.	ROIG et <i>al.</i> (2006)
	Evaporation forcée	Faciliter l'évaporation des margines grâce aux panneaux évaporateurs.	EI HAJJOUJI (2007)
	Concentration thermique	Elévation du taux de matières sèches des margines à environ 70 %.	RANALLI et <i>al.</i> (2003)
	Séchage	Assuré par les fumées issues de la combustion de noyaux broyés ou de grignons asséchés.	CELMA et <i>al.</i> (2007)
	Incineration	Evaporation de la phase aqueuse des margines dans un four ; et la transformation du résidu solide en cendres.	RANALLI et <i>al.</i> (2003)
Traitements physicochimiques	Coagulation-floculation	Agglomération et décantation des particules en suspension des margines par l'injection de produits tensioactifs ou certains coagulants.	ACHAK et <i>al.</i> (2008) VUPPALA et <i>al.</i> (2017)
	Electrocoagulation	Elimination de certaines pollutions des margines par utilisation des électrodes en fer ou en aluminium avec addition de H ₂ O ₂ et de chlorure polyaluminium (PAC) comme un aide coagulant.	KHOUFI et <i>al.</i> (2007) HANAFI et <i>al.</i> (2010)
	Adsorption sur le charbon actif	Eliminer une grande proportion de la demande chimique résiduelle.	GALIATSATOU et <i>al.</i> (2002) ZIATI et <i>al.</i> (2017)
Traitements biologiques	Traitements anaérobies	Transformation des substances organiques présentes dans les margines en méthane par des bactéries anaérobies en limitant les dégagements de mauvaises odeurs.	ARDA et <i>al.</i> (2010) KHOUFI et <i>al.</i> (2015)
	Traitements aérobies	Dégradation de la matière organique des margines par les microorganismes en présence d'oxygène en la transformant en CO ₂ , H ₂ O et en masse cellulaire.	EL HAJJOUJI et <i>al.</i> (2007) MICHAILEDIS et <i>al.</i> (2011)

3.3.4. Valorisation des margines

Les margines sont riches en éléments nutritifs minéraux et organiques. Ce critère a amené les chercheurs à mettre au point de nombreux procédés de leur valorisation aussi bien à l'échelle de laboratoire qu'à l'échelle industrielle (ABU KHAYER *et al.*, 2013). Cette valorisation d'une part, a pour objectif d'éliminer les composés phénoliques et d'autre part, d'utiliser les margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie, de l'agriculture et voire même du génie civil (DE LA CASA *et al.*, 2009 ; El-ABBASSI *et al.*, 2017).

L'importance quantitative de ces effluents reflète la diversité des domaines de leur valorisation comme le montre la figure 4. L'utilisation des margines comme fertilisant pour les sols et les cultures est une pratique courante qui permet de résoudre partiellement le problème de leurs élimination (ROIG *et al.*, 2006).

La valorisation agricole des margines par compostage a pour but essentiel de fixer les éléments fertilisants sur un substrat carboné au cours d'un processus aérobie, pour les restituer au sol en fonction des besoins des plantes (ROIG *et al.*, 2006).

Les margines peuvent servir aussi comme milieu favorable pour la production d'enzymes par des micro-organismes (AGUILERA *et al.*, 2008),

Plusieurs techniques de traitement des margines par voie anaérobie peuvent être améliorées pour permettre la valorisation des sous-produits de traitement. Cependant, l'effet antioxydant des polyphénols reste le facteur limitant pour ces procédés de valorisation, ce qui nécessite une étape de prétraitement afin d'extraire les composés phénoliques (HAMDI, 1996 ; DE MARCO *et al.*, 2007). Par ces procédés, les margines peuvent donc être revalorisées en eau d'irrigation (eau traitée), en bioénergie tels que la production de biométhane (BLIKA *et al.*, 2009), de bioéthanol (SARRIS *et al.*, 2014), de biohydrogène (EROGLU *et al.*, 2009), et en alimentation de bétail (MOLINA ALCAIDE et NEFZAOUI , 1996).

Certains d'entre eux sont très récents, il s'agit en particulier de la récupération des composés aromatiques et phénoliques, et des polysaccharides pour leur utilisation comme source de fibres alimentaires, ainsi que l'étude des propriétés biologiques de composés phénoliques tels que l'activité antibactérienne (OBIED *et al.*, 2007), l'activité anti-oxydante de l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol (LAFKA *et al.*, 2011). Les champignons comestibles comme *Pleurotus ostreatus* et *Lentinula edodes* sont capables de se développer en utilisant les margines comme source de nutriments (LAKHTAR *et al.*, 2010)

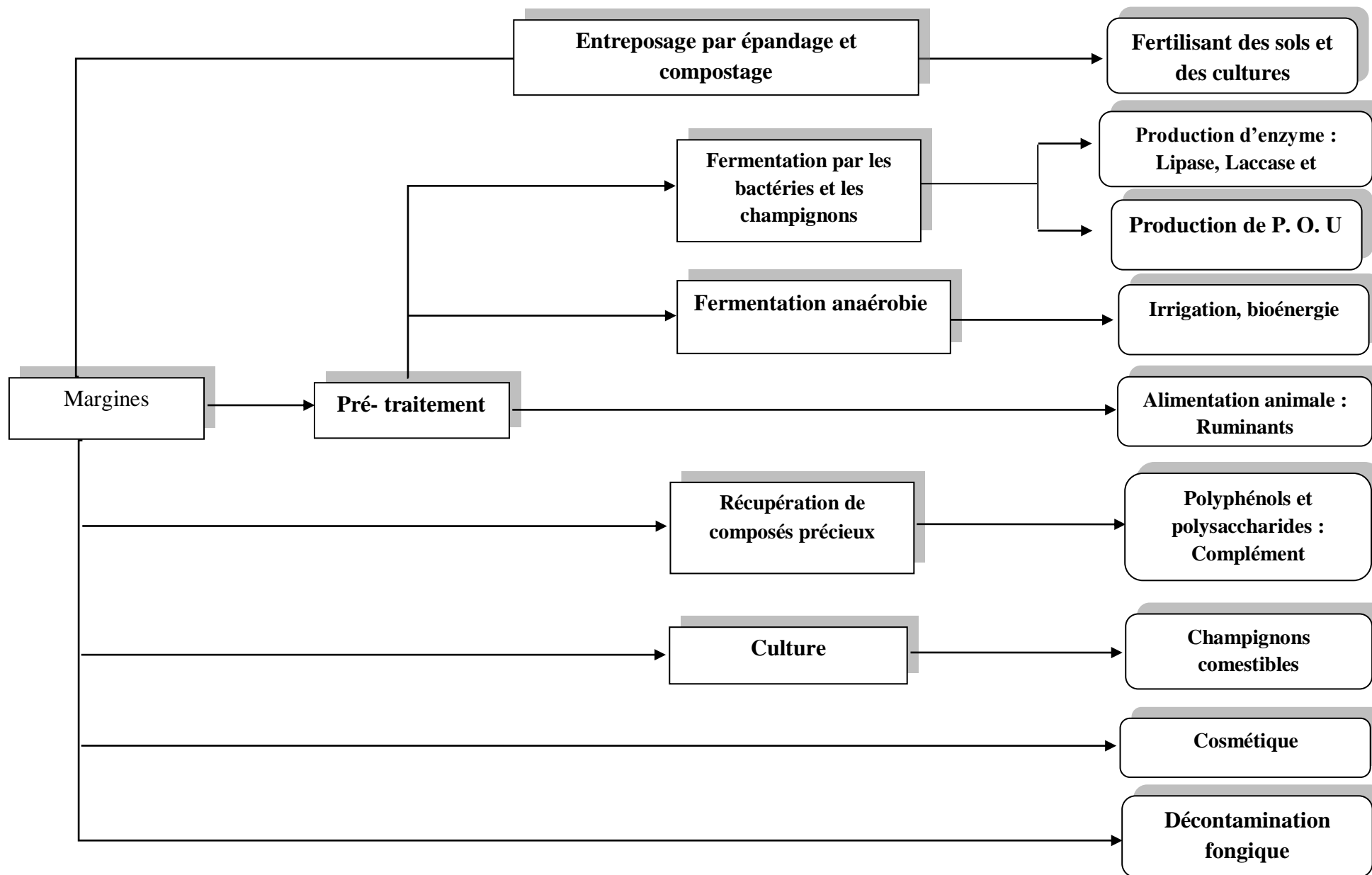


Figure 7 : Différentes filières de valorisation des margines (cité par CHOUCHE, 2010 ; DERMECHE et al., 2013 ; RODRIGUES et al., 2015 ; EL-ABBASSI et al., 2017).

3.3.4.1. Extraction de composés à haute valeur ajoutée

La récupération ou l'extraction des composés bioactifs, et spécialement les composés phénoliques à partir des margines reste un moyen de valorisation très prometteur du fait qu'il présente un double avantage. Premièrement, la récupération des composés phénoliques des margines constitue une dépollution de ces dernières par réduction et/ou élimination de leur toxicité et deuxièmement la valeur ajoutée de ces composés phénoliques réputés bioactifs justifiera et rendra probablement rentable tout investissement dans un tel procédé de traitement. Il est bien connu que les margines renferment un certain nombre d'antioxydants phénoliques naturels et en particulier les ortho-diphénols. Parmi ces produits naturels figurent l'acide caféique et plus particulièrement l'hydroxytyrosol (ALLOUCHE et *al.*, 2004). Ces molécules anti-oxydantes interviennent dans la protection des corps gras insaturés contre l'auto-oxydation qui est responsable des phénomènes de rancissement (FKI et *al.*, 2005). Les antioxydants ont donc un rôle conservateur en limitant l'altération des produits alimentaires. L'intérêt de ces antioxydants naturels est double : en plus de bénéficier du « label naturel » très apprécié par les consommateurs, ils constituent une alternative appropriée pour les additifs artificiels impliquant parfois des risques de cancérogenèse (CASTERA-ROSSIGNOL et BOSQUE, 1994). Durant les deux dernières décennies, plusieurs études ont été publiées concernant l'évaluation de la faisabilité technique et économique de la récupération des composés phénoliques à partir des margines (ROMERO et *al.*, 2002 ; CASA et *al.*, 2003 ; FKI et *al.*, 2005 ; SCOMA et *al.*, 2011). Les principaux systèmes proposés sont : l'extraction par solvants ; la chromatographie sur résine ; la concentration sélective par ultrafiltration (TURANO et *al.*, 2002) et l'osmose inverse ; l'extraction solide-liquide ou liquide-liquide et l'extraction par fluide supercritique (GONZALEZ-MUNOZ et *al.*, 2003). BRIANTE et *al.* (2004) proposent un bioréacteur pour la production d'antioxydants hautement purifiés. D'autres systèmes, plus simples et plus économiques, pour la purification des antioxydants des margines ont été développés, mais sont tous sous protection par des brevets internationaux (FERNANDEZ-BOLANOS et *al.*, 2006). Les polysaccharides solubles, des matériaux pectiques et des fibres ont été aussi identifiés dans les margines. Ces molécules ont connues un grand intérêt ces dernières années et pourraient constituer une source potentielle d'agents de gélification pour l'industrie agroalimentaire (GALANAKIS et *al.*, 2010a). GALANAKIS et *al.* (2010b) ont rapporté que les fibres de margines pourraient être utilisées comme additif alimentaire. En effet l'importance des fibres diététiques en nutrition a conduit au développement d'un marché potentiel pour les produits alimentaires enrichis en fibres (GALANAKIS, 2012).

IV. Les composés phénoliques

4.1. Caractéristiques physicochimiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques (CP) appelés souvent les polyphénols (PP), sont des métabolites secondaires des végétaux. Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues (HENNEBELLE *et al.*, 2004).

Il existe en réalité une extrême diversité de répartition de ces composés selon les espèces et en fonction des différents organes et tissus d'une plante (ROBARDS *et al.*, 1999). L'élément structurel fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau aromatique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé (VISIOLI et HAGEN, 2007).

Selon BRUNETON (2001), une définition purement chimique semble être insuffisante, d'où la nécessité de faire intervenir un critère biosynthétique, pour mieux cerner les limites du groupe. Il propose « dérivé non azoté dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacétate.

La voie du shikimate présente de nombreux points de branchement, constitués des métabolites intermédiaires de la voie principale pouvant conduire à la production d'autres composés (WILDERMUTH *et al.*, 2001). Les profils d'expression des gènes de cette voie varient, d'un tissu à l'autre, au cours du développement et en réponse à des stimuli environnementaux. La production de composés phénoliques via l'induction simultanée des enzymes de la voie du shikimate et celles du métabolisme des phénylpropanoïdes constitue une réponse générale au stress (GÖRLACH *et al.*, 1995).

Les composés phénoliques (acide phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment les groupes des composés phytochimiques les plus importants des plantes (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

4.2. Structure et classification des composés phénoliques

Compte tenu de la diversité, de la complexité des CP, RIBUREAU-GAYON (1968) a adapté un mode de présentation des polyphénols selon leur répartition dans la nature en trois familles : famille des CP largement répandue (acides phénoliques, flavonoïdes et anthocyanes), famille peu répandue (Composés en C₆, C₆-C₁, C₆-C₂, C₆-C₃, C₆-C₁-C₆, C₆-C₂-C₆, benzoquinones, naphthoquinones et antraquinones, biflavonyles, β-cyanine et bétaxanthine) et enfin, famille des CP présents dans la nature sous forme de polymères (lignines et tanins) (Tableau VI).

Selon HARBORNE (1989) et MACHEIX *et al.* (2005), les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité de leur squelette de base allant de simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par leur degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques). Il est par ailleurs toujours difficile d'utiliser une nomenclature simple et homogène pour désigner les différents composés phénoliques (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

Tableau VI: Les principales classes de composés phénoliques d'après HARBORNE (1989); MACHEIX (2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C6 C6-C1	Phénols simples Acides hydroxybenzoïques	Catéchol <i>p</i> -Hydroxybenzoïque, acide gallique	Pomme de terre, pomme Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acide caféïque, férulique Scopolétine, esculétine	Pomme de terre, pomme Citrus
C6-C4 C6-C2-C6 C6-C3-C6	Naphtoquinones Stilbènes Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Juglone Resvératrol Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Daidzéine	Noix Vigne Fruit, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C6-C3) ₂ (C6-C3) _n (C15) _n	Lignanes Lignines Tannins	Pinorésinol	Pin Bois, noyau des fruits Raisin rouge, kaki

4.3. Les grandes lignes de la biosynthèse des polyphénols

Les deux voies d'aromagenèse qui permettent au végétal de construire le noyau aromatique sont d'après BRUNETON (1999), la voie de l'acide shikimique et la voie acétate :

- **La voie du shikimate** est présente uniquement chez les bactéries, les champignons et les plantes. Les animaux ne possèdent pas cette voie métabolique, ceci ayant pour conséquence que les acides aminés aromatiques doivent faire partie intégrante de leur alimentation (HERRMANN et WEAVER, 1999). La voie du shikimate est une voie multi-branches qui peut être divisée en trois parties. La voie qui part de phosphoénol pyruvate (PEP) et erythrose-4-phosphate (E4P) pour arriver au chorismate est appelée voie préchorismate, celle-ci est à l'origine de la synthèse de l'acide quinique et de l'acide gallique, via l'isochorismate, ce métabolisme conduit également à l'acide salicylique dont l'implication dans les réponses de défense en tant que molécule signal a été démontrée (WILDERMUTH et *al*, 2001 ; LIM et *al*, 2002) (figure 8). Puis la voie du shikimate se sépare en deux branches : l'une conduit à la phénylalanine et la tyrosine et l'autre au tryptophane (SCHMID et AMRHEIN, 1995) ;
- **La voie d'acétate** qui conduit par cyclisation d'un polyacétate aux chromones et autres quinones ; la participation simultanée de ces deux précurseurs conduit par sa part aux stilbènes, flavonoïdes, anthocyanosides et autres proanthocyanidols.

Ainsi, à côté de son rôle majeur dans le métabolisme primaire, la voie du shikimate constitue un lien essentiel avec le métabolisme secondaire (SAKIHAMA et *al.*, 2002). En plus de la phénylalanine, tous les intermédiaires de la voie peuvent être considérés comme des points de branchements vers d'autres voies métaboliques (SCHMID et AMRHEIN, 1995). Cette voie conduit aux acides cinnamiques et leurs dérivés, acides benzoïques, lignanes, lignines et les coumarines.

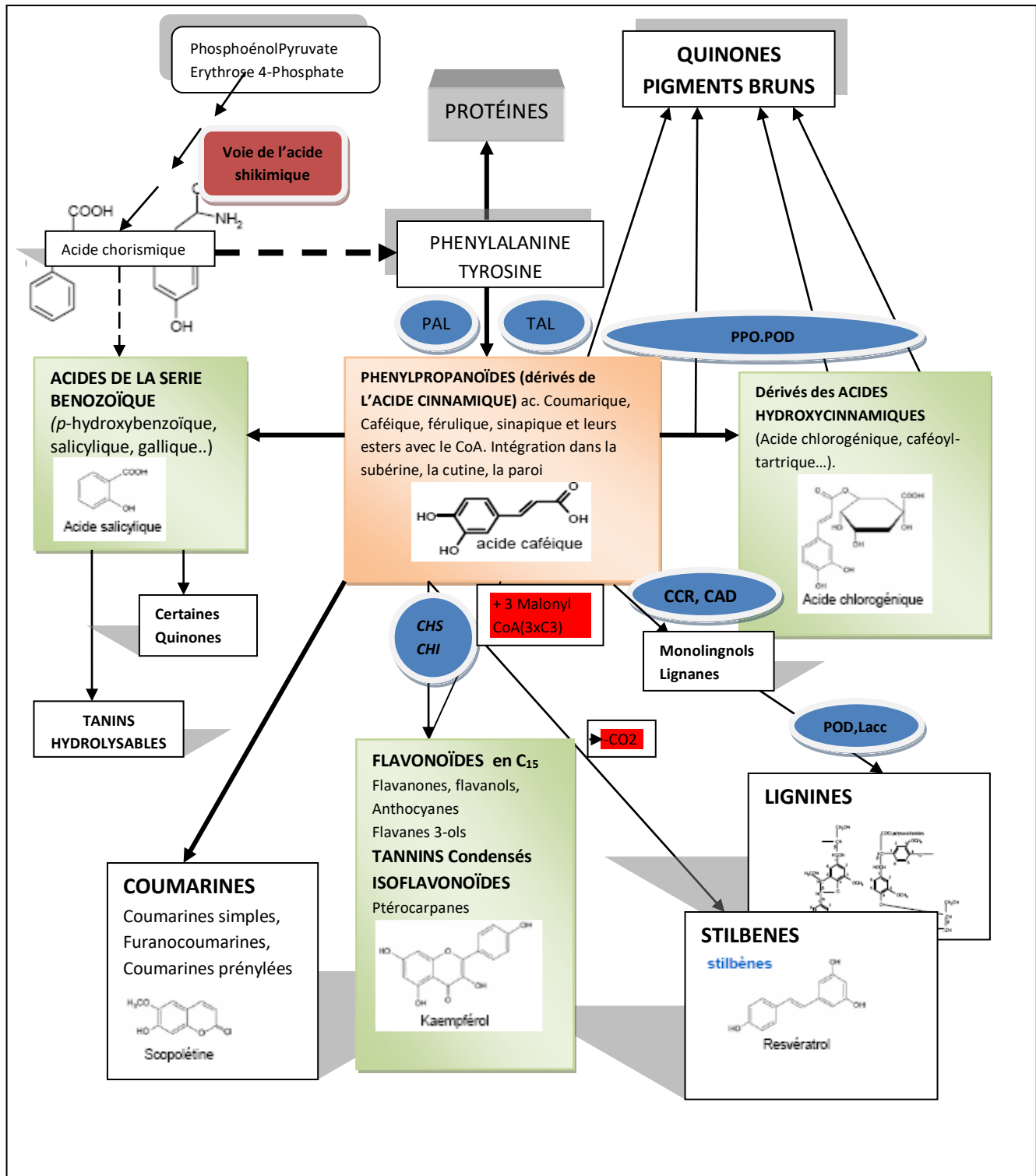


Figure 8: Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

PAL : phénylalanine ammonialyase ; **TAL** : tyrosine ammonialyase ; **CCR** : cinnamate CoA réductase ; **CAD** : cinnamyl alcool déshydrogénase ; **CHS** : chalcone synthase ; **CHI** : chalcone flavone isomérase ; **PPO** : polyphénoloxydases ; **POD** : peroxydase ; **Lacc** : laccases.

4.4. Intérêt biologique des composés phénoliques

L'intérêt biologique des polyphénols a pris de l'ampleur depuis que certaines de ces substances se voient attribuer un certain nombre d'activités bénéfiques que ce soit pour les plantes (sources de ces polyphénols) que pour l'Homme (consommateur de ces polyphénols).

4.4.1. Importance des polyphénols dans les plantes

Les polyphénols sont importants pour la physiologie de la plante, ils sont impliqués dans des fonctions diverses telles que la fertilité, la pigmentation, la lignification, la protection contre des agents biotiques ou abiotiques, ou encore la signalisation (WEISSHAAR et JENKINS, 1998). Des travaux plus anciens (NITSCH et NITSCH, 1961 ; ALIBERT *et al.*, 1977) ont montré que les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogénèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation. L'intervention des composés phénoliques dans de nombreux autres domaines de la physiologie de la plante a également été suggérée. En fait ces composés peuvent être facilement oxydés, quelquefois de manière réversible et ils participent à ce titre à l'équilibre redox des cellules (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006). Pour cette raison les polyphénols sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques et quelques-uns sont caractéristiques de certaines espèces ou variétés (ABAD GARCIA *et al.*, 2007). L'intervention des composés phénoliques dans les interactions entre plantes et microorganismes est également un autre domaine où les connaissances ont progressé de manière spectaculaire. Il a été classiquement montré que beaucoup de phénols ou quinones qui en dérivent par oxydation sont des inhibiteurs du développement de certains microorganismes saprophytes (dans les litières végétales) ou parasites, champignons ou bactéries (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

4.2.2. Importance nutritionnelle et propriétés thérapeutique des polyphénols

Ingérés par l'Homme, les polyphénols sont absorbés à travers la barrière intestinale et parviennent au niveau des tissus cibles où ils peuvent exercer des effets protecteurs. L'ingestion de ces composés dans la ration journalière est alors un facteur nutritionnel considéré comme positif par les nutritionnistes et bénéfique à la santé, selon les habitudes alimentaire, nous pouvons en ingérer jusqu'à 1 g par jour (LANDETE, 2013). Cela est particulièrement vrai dans les régimes dits « méditerranéens » où la consommation de fruits, de légumes et d'huile d'olive est importante (MACHEIX *et al.*, 2005; BALASUNDRAM *et al.*, 2006 ; PFAENDTNER et BROADBELT, 2008).

La découverte du rôle des radicaux libres dans divers processus pathologiques a relancé l'intérêt des chercheurs envers les polyphénols dont les propriétés anti-oxydantes sont remarquables. C'est ainsi que les bienfaits des polyphénols semblent être étroitement liés à leur exceptionnelle capacité à piéger et à neutraliser les radicaux libres. Générés par le stress oxydant ces espèces sont extrêmement réactives et fortement néfastes pour l'organisme induisant ainsi des effets délétères sur les tissus et une augmentation du risque de cancers, des maladies cardio-vasculaires, le diabète, d'ostéoporose, maladies et maladies inflammatoires (ICHIISHI *et al.*, 2016). La consommation des polyphénols contenus dans les aliments contribue à limiter ce stress oxydant et probablement à réduire les risques de développer ces pathologies (MAO *et al.*, 2017).

Les effets bénéfiques des polyphénols vis-à-vis de l'organisme vont au-delà de leurs propriétés anti-oxydantes, comme le signalent un grand nombre de travaux aussi bien *in vitro*

qu'*in vivo*. Les polyphénols inhiberaient notamment l'agrégation plaquettaire, réduisant ainsi les risques de thrombose et diminueraient la perméabilité des vaisseaux ouvrant ainsi la voie à la prévention des maladies cardio-vasculaires (PETRONI et *al.*, 1995). Par ailleurs, les polyphénols joueraient un rôle clé dans la protection cancéreuse en stimulant les enzymes de détoxification et en inhibant la division des cellules malignes (VISIOLI et *al.*, 1998). De plus, il a été établi que les polyphénols pourraient prévenir les maladies neuro-dégénératives tels que la maladie de parkinson et d'alzheimer (SHAHPIRI et *al.*, 2016).

Les effets hypoglycémiantes des polyphénols ont été largement discutés dans la littérature (BAHADORAN et *al.*, 2013 ; CARVALHOA et *al.*, 2016). Depuis quelques années, les connaissances sur la modulation de l'absorption intestinale et la réabsorption rénale du glucose s'intensifient. Les deux processus sont réalisés par des transporteurs de glucose dépendants du Na⁺ (SGLTs). Le SGLT-1 et le SGLT-2 représentent des cibles potentielles dans le développement des médicaments pour normaliser la glycémie chez les patients diabétiques (ASANO, 2004). Le composé le plus étudié à l'heure actuelle est la phloridzine (EHRENKRANZ, 2005), un flavonoïde glucoside extrait des pommes. En 1922, il a été montré pour la première fois que le transport intestinal du glucose au niveau de l'intestin grêle du lapin est diminué suite à une exposition à la phloridzine (NAKAZAWA, 1922) et en 1967, ALVARADO démontre que cette diminution est due à une inhibition compétitive du transport du glucose dépendant du sodium à travers la membrane en brosse des entérocytes. Selon BAHADORAN et *al.*(2013) les effets des polyphénols sont principalement attribués à la réduction de l'absorption intestinale des glucides alimentaires, la modulation des enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose, l'amélioration de la fonction des cellules β et l'action de l'insuline, la stimulation de la sécrétion d'insuline et les propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires de ces composés. La figure 9 résume les différents modes d'action des polyphénols sur la régulation du taux du glucose sanguin dans le cas du diabète.

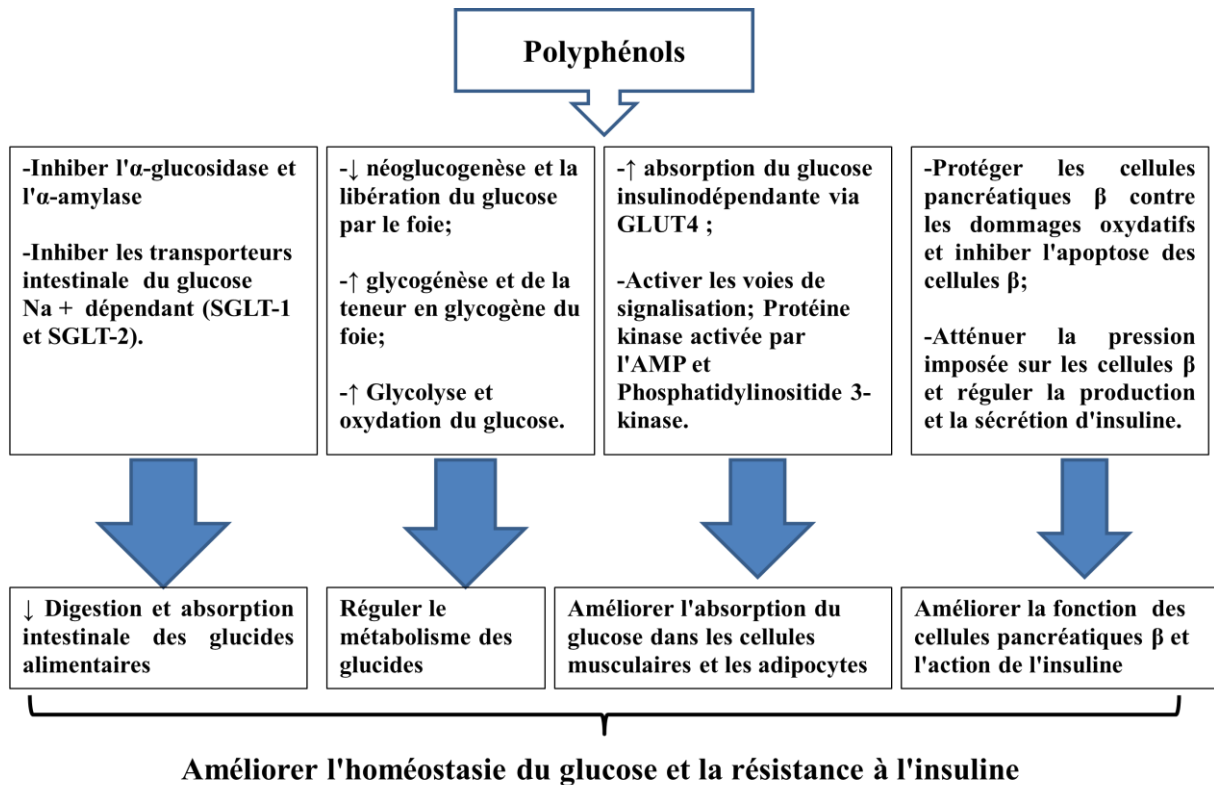


Figure 9: Effets bénéfiques des polyphénols sur la régulation de la glycémie dans le cas du diabète (BAHADORAN et *al.*, 2013).

Les polyphénols sont promus à un avenir thérapeutique envers toutes les pathologies engendrées par les radicaux libres (tableau VIII).

Tableau VII : Activités biologiques des composés phénoliques

Phénols	activités	Auteurs
Acides phénoliques (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériens Antifongiques antioxydants	DIDRY <i>et al.</i> (1982) ; HAYASE et KATO (1984) ; MACHEIX <i>et al.</i> (2005) ; GESSNER <i>et al.</i> (2017) SHAO <i>et al.</i> (2018)
Coumarines	Vasoprotectrices Antioédémateuses Antitumorales Anticarcinogène anti-inflammatoires	MABRY et ULUBELEN (1980) ; MATOS <i>et al.</i> (2015).
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogène anti-inflammatoires hypotenseurs et diurétiques antioxydants	STAVRIC et MATULA (1992) ; KRAVCHENKO <i>et al.</i> (2003) ; STIPCEVIC <i>et al.</i> (2006) ; DJERIDANE <i>et al.</i> (2007) ; ZEGGWAGH <i>et al.</i> (2014) ; GUENDOUZE-BOUCHEFA <i>et al.</i> (2015).
Anthocyanes	Protection des veines et capillaire Antitumorales Anticarcinogène anti-inflammatoires antioxydants	LI <i>et al.</i> (2015) ; RIAZ <i>et al.</i> (2015) ; SHAO <i>et al.</i> (2018).
Proanthocyanidines	Effet stabilisant sur le collagène. Antitumorales Antifongiques Antioxydants Anti-inflammatoire	MASQUELIER <i>et al.</i> (1979); BROWNLEE <i>et al.</i> (1992) ; BAHORUN <i>et al.</i> (1996) ; COS <i>et al.</i> (2004) ; PINENT <i>et al.</i> (2016) ; SHAO <i>et al.</i> (2018).
Tannins galliques (hydrolysable) et catéchiques (condensés)	Antioxydants Antibactérienne	OKUDA <i>et al.</i> (1983) ; OKAMURA <i>et al.</i> (1993) ; N'TCHA <i>et al.</i> (2017).

4.5. Mécanismes d'absorption des polyphénols chez l'Homme

Les effets des polyphénols sur la santé sont indissociables de la notion de biodisponibilité, qui intègre un grand nombre de paramètres comme: l'absorption intestinale, l'excrétion des métabolites dans la lumière intestinale, le métabolisme par la microflore, le métabolisme intestinal et hépatique, les propriétés des métabolites circulants (structures, cinétiques d'apparition et d'élimination, liaison à la sérum albumine et autres protéines du plasma), la captation cellulaire, le métabolisme dans les tissus cibles, la sécrétion biliaire et l'excrétion urinaire (D'ARCHIVIO *et al.*, 2010).

Il est important de rappeler qu'il est extrêmement rare de trouver des polyphénols sous forme non glycosylée ou non estérifiée dans les aliments. Ils sont par ailleurs glycosylés par différents sucres ou estérifiés et peuvent aussi être présents sous forme de polymères. Cette grande variabilité dans la nature des formes alimentaires de polyphénols s'accompagne d'une grande variabilité des mécanismes et des sites de leur absorption. En effet, si les polyphénols non glycosylés ni estérifiés, qui sont présents surtout dans les suppléments, peuvent être absorbés directement par l'intestin grêle, ce n'est pas le cas des formes glycosylées ou estérifiées qui doivent être hydrolysées par des enzymes sécrétées par l'intestin, ou par le microbiote avant d'être absorbées (GONTHIER *et al.*, 2003 ; BOREL, 2014).

Le principal lieu d'absorption des CP est l'intestin grêle, mais ceux-ci peuvent également être absorbés au niveau de l'estomac et du côlon (HOLLMAN *et al.*, 2011). Suite à leur ingestion, certains polyphénols (forme libres ou aglycone) vont être absorbés dans l'intestin grêle. Les polyphénols non absorbés par l'intestin grêle atteignent le colon et vont subir des modifications structurales médiées par la flore microbienne : hydrolyse des glycosides et dégradation de l'aglycone en acides phénols simples. Cette étape pourrait être décisive pour l'action biologique des polyphénols car elle produirait certains métabolites actifs. Avant leur passage dans la circulation systémique, les polyphénols qui sont maintenant sous forme d'aglycones vont encore voir leur structure modifiée par les processus de conjugaisons qui prennent place à la fois dans l'intestin grêle mais aussi et surtout dans le foie (figure 10).

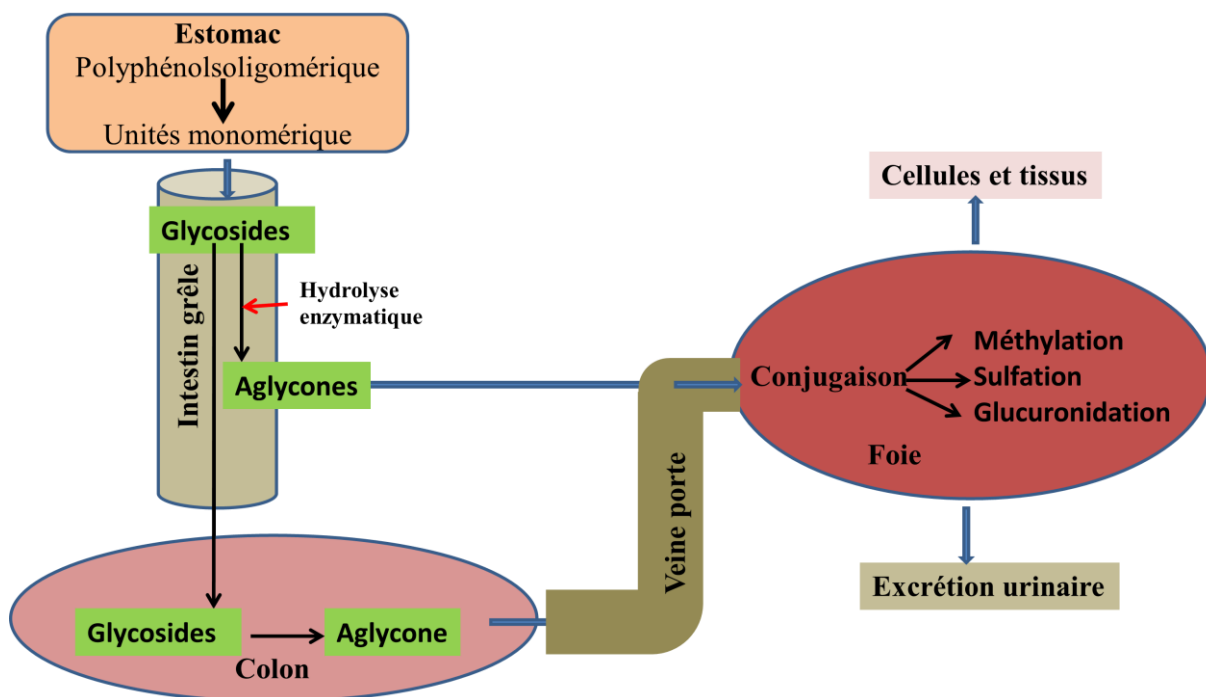


Figure 10 : Schéma général de la biodisponibilité des polyphénols alimentaires chez l'homme (D'ARCHIVIO *et al.*, 2010).

4.5.1. L'absorption intestinale des polyphénols

Les polyphénols sont métabolisés dans les entérocytes sous l'action d'enzymes de conjugaison (glucuronidation, sulfatation et méthylation) (MANACH *et al.*, 2004). Il s'agit d'un métabolisme de détoxication commun à beaucoup de xénobiotiques, qui a pour but de

limiter leurs éventuels effets toxiques et de faciliter leur élimination en diminuant leur hydrophobicité. L'importance relative des trois types de conjugaison est variable selon la nature du polyphénol, la dose ingérée et le tissu. Les polyphénols conjugués produits dans la muqueuse intestinale peuvent être ré-excrétés dans la lumière intestinale (CRESPY et *al.*, 2003). Selon l'importance de ce processus, très variable en fonction des molécules, l'absorption nette peut être fortement réduite (CRESPY et *al.*, 2003). Compte tenu de leur diversité de structure, il ne semble pas exister une voie unique d'absorption des polyphénols, mais plusieurs mécanismes impliquant des processus de transports actifs et/ou passifs. Ainsi, l'implication du transporteur de l'acide monocarboxylique a été mise en évidence dans le transport des acides phénoliques et de l'épicatéchine gallate de la lumière intestinale vers les entérocytes. L'internalisation des glucosides de flavonoïdes dans l'entérocyte pourrait mettre en jeu des transporteurs du glucose dépendant du sodium (SGLT-1) situés sur la bordure en brosse (figure 11). Au sein de l'entérocyte, ces glucosides seraient alors hydrolysés par des glucosidases cytosoliques comme la β -glucosidase. D'autres systèmes de transports, comme la glycoprotéine-P (P-Gp) et le transporteur des anions organiques (OAT), semblent également intervenir dans l'efflux des polyphénols conjugués vers la lumière intestinale. Le rôle de la large famille des protéines de résistance aux drogues (MRP ou Multi drug Resistance-associated Proteins) dans l'export des métabolites conjugués des polyphénols de l'entérocyte vers le sang a également été montré. L'intervention de la protéine BCRP1 (Breast Cancer Resistant Protein 1) dans la ré-excrétion des glucuronides de quercétine vers la lumière intestinale a aussi été rapportée.

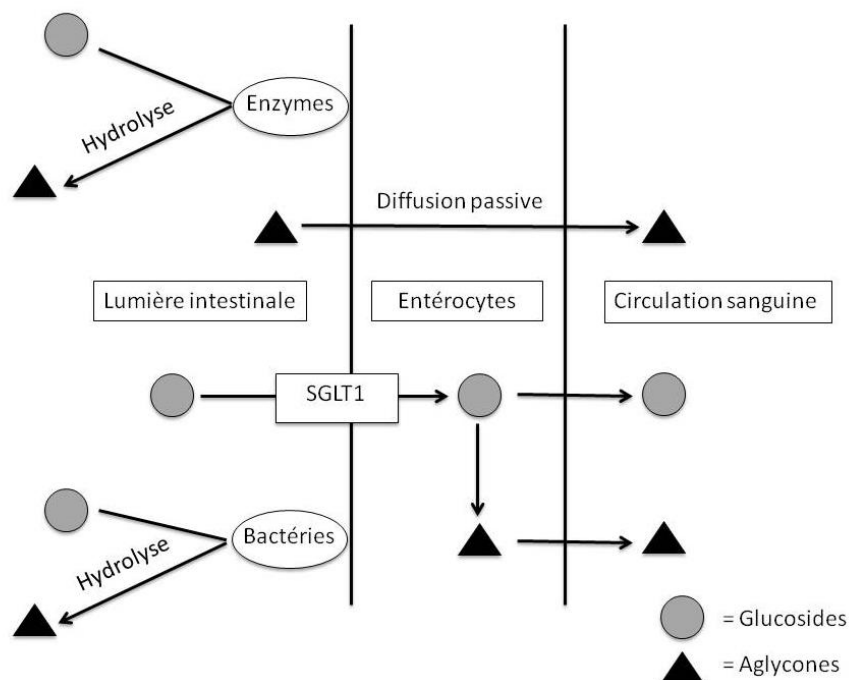


Figure 11 : Absorption des polyphénols ingérés sous forme de glucosides et d'aglycones (PAQUETTE, 2015).

Glucoside : polyphénol lié à un glucide simple (glucose), **Aglycone** : Composé non glucidique formé au cours de l'hydrolyse du glucoside, **SGLT-1** : Transporteur du glucose dépendant du sodium.

4.6. Modes d'action des composés phénoliques

Ces dernières années une importance particulière a été accordée aux propriétés anti oxydantes des CP, en effet l'homme n'est pas capable d'assurer la biosynthèse de la plupart des antioxydants, en particulier ceux de nature phénolique à forte activité anti-oxydante.

En règle générale, les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ERO (espèces oxygénées réactives) ou l'effet « scavenger » ;
- La protection des systèmes de défense antioxydants (en majorité des systèmes enzymatiques) ;
- L'inhibition ou activation d'enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO (HALLIWELL, 1994).

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS) endogènes ou exogènes sont une des causes potentielles de diverses maladies humaines. Leurs concentrations intracellulaires sont généralement régulées par les systèmes de défense antioxydants des cellules. Toutefois, la production de grandes quantités d'ERO peut déborder les systèmes de défense antioxydant intracellulaires et provoquer l'activation des neutrophiles, la peroxydation des lipides, la modification des protéines, ou même des altérations au niveau de l'ADN. Les polyphénols peuvent agir comme un tampon et capter les électrons des ERO, les rendant moins actives (COTELLE et *al.*, 2001). En outre, certains composés phénoliques peuvent agir comme des chélateurs de métaux (ex. le fer) qui peuvent être impliqués dans la formation de radicaux libres (NIJVELDT et *al.*, 2001). Les polyphénols peuvent aussi interférer avec les systèmes cellulaires de désintoxication tels que le superoxyde dismutase, les catalases, peroxydases ou le glutathion (KRINSKY, 1992). Les composés phénoliques peuvent inhiber ainsi les enzymes génératrices des ERO comme la xanthine oxydase et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (KRINSKY, 1992).

4.6.1. Relation structure-activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante d'un CP est liée à la structure chimique de sa molécule (nombre et position des groupements hydroxyles dans la molécule, rattachement d'un ou plusieurs glucides aux groupements hydroxyles dans la molécule, forme tridimensionnelle de la molécule). En effet la structure des CP est la clef déterminante de leurs activités. Dans le cas des acides phénoliques, l'activité anti-oxydante dépend du nombre et la position des groupements hydroxyles présents dans leur structure (ROBARDS et *al.*, 1999 ; RICES-EVANS, 2001). En effet l'activité anti-oxydante augmente avec l'augmentation du degré d'hydroxylation c'est le cas de l'acide gallique tri hydroxylé qui a démontré une remarquable activité anti-oxydante alors que la substitution des groupement hydroxyles en position 3 et 5 de l'acide syringique par des groupements méthoxyles réduit son activité (BALASUNDRAM et *al.*, 2006). Des recherches ont démontré que les substituants en position ortho- et para- sont plus stables que ceux en position méta- (BALASUNDRAM et *al.*, 2006). BENDINI *et al.* (2007) ont démontré que les ortho diphénols assurent une activité anti-oxydante la plus significative.

Les acides hydroxycinnamiques montrent une activité anti-oxydante plus élevée que les acides hydroxybenzoïques (ANDREASEN et *al.*, 2001). Cette activité est peut être due au groupement $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ qui cède plus facilement l'hydrogène que le groupe carboxylique des acides hydrobenzoïques (RICE-EVANS et *al.*, 1996).

Pour les flavonoïdes la relation structure- activité est beaucoup plus complexe et ceci est en relation directe avec la complexité de leur structure. La disposition des structures et la nature des substitutions sur le cycle B et C déterminent l'activité anti-oxydante de ces derniers (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres (RICE-EVANS *et al.*, 1996 ; COTELLE, 1996 ; COS, 1998 ; SEYOUM *et al.*, 2006; BENDARYR *et al.* 2013). Ces travaux ont pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- La structure ortho-dihydroxy du cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons (la substitution de ces groupements hydroxyles sur le cycle B par des groupements méthoxyles altère le potentiel redox et donc la capacité radical scavenger des flavonoïdes) (BALASUNDRAM *et al.*, 2006) ;
- la double liaison entre C2 et C3 conjugués à la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité radical scavenger des flavonoïdes (BALASUNDRAM *et al.*, 2006) ;
- la présence du groupement 3-OH combiné à une double liaison entre C2 et C3 augmente également la capacité radical scavenger des flavonoïdes (la substitution du groupement 3-OH conduit à l'augmentation de l'angle de torsion et une perte de la coplanarité conduisant ainsi à la réduction de l'activité anti-oxydante (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

4.7. Les composés phénoliques de l'huile d'olive, grignon et des margines en particulier

4.7.1. L'huile d'olive

Les phénols de l'huile d'olive constituent comme dans le fruit un mélange complexe, certaines différences dans la composition chimique entre les deux sont attribuées aux séries d'altération chimiques et enzymatiques de quelques phénols durant l'extraction de l'huile. Ces modifications incluent l'hydrolyse des glucosides par les glucosidases, l'oxydation des CP par les phénols oxydases et la polymérisation des phénols libres (BENDINI *et al.*, 2007). Ainsi l'huile contient les formes aglyconiques des phénols, qui sont plus liposolubles (VISIOLI et GALLI, 2002). Les phénols hydrophiles sont les plus abondants des antioxydants de l'huile d'olive vierge (SERVILI et MONTEDORO, 2002). S'étendant sur une centaine de CP, ils sont répartis en plusieurs classes, on retrouve les acides phénoliques (gallique, protocatechique, *p*-hydroxybenzoïque, vanillique, caféique, syringique, *p*-coumarique, ferulique et cinnamique), les flavonoïdes, les phényle éthyle alcool (tyrosol (*p*-HPEA) et hydroxytyrosol (3,4-DHPEA)), les sercoïridoïdes aglycone et leurs dérivés dont l'oleuropéine (3,4-DHPEA-EA), le pinorésinol et le 1-acétoxypinorésinol sont deux lignanes identifiés pour la première fois dans l'huile lors de l'étude de BRENES *et al.* (2000). Les secoïridoïdes et lignanes en sont les plus concentrés dans l'huile (SERVILI *et al.*, 2004). Leurs structures sont consignées dans les figures 6 et 8 (BENDINI *et al.*, 2007 ; SERVILI *et al.*, 2009).

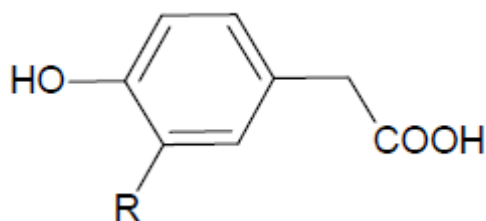
4.7.2. Les grignons

Une petite partie de la fraction phénolique est retenue dans ce sous-produit. Certains acides phénoliques sont identifiés, notamment les acides galliques, protocatéchiques, *p*-hydroxybenzoïques, vanilliques, caféiques et féruliques (ÜNAL, 1994).

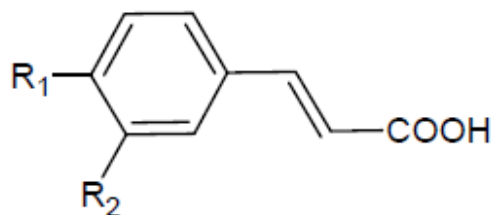
Il est à noter que les noyaux ne contiennent que de faibles concentrations en oleuropéine, ils sont dépourvus de flavonoïdes. Le (+)-1-pinorésinol est le prédominant lignane dans le noyau (SERVILI et *al.*, 2007) et le nüzhenide est le principal CP caractérisé par HPLC couplé à la spectroscopie de masse en utilisant la technique dite d'ionisation electrospray (SILVA et *al.*, 2010).

4.7.3. Les margines

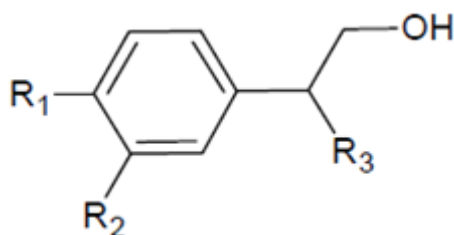
Les margines ou eaux de végétation présentent une quantité appréciable de polyphenols totaux (5,5 à 12 g.L⁻¹ de margines) (BEN SASSI et *al.*, 2006). L'hydroxytyrosol, est le plus abondant des monomères phénoliques retrouvé dans les margines (FKI et *al.*, 2005 ; DE MARCO et *al.*, 2007 ; AMARAL et *al.*, 2008). Dans la littérature la composition phénolique des margines varie en fonction de plusieurs paramètres (procédé de trituration, variété d'olives, l'âge des margines), du procédé d'extraction et des techniques d'analyses qualitative et quantitative des monomères phénoliques (HAMDI 1996; FKI et *al.*, 2005 ; DE MARCO et *al.*, 2007). Plus de 20 CP ont été identifiés. Dans plusieurs travaux les profils chromatographiques des extraits phénoliques des margine établies par HPLC ont démontré la présence: des acides phénoliques (vanillique, gallique, caféique, *p*-coumarique, férulique), des alcools phényles (tyrosol, hydroxytyrosol), les dérivés de secoiridoïdes (la forme dialdéhydrique de décarboxyméthyloleuropéine aglycone, ligstroside, verbascoside) et les flavonoïdes (luteoline, luteoline -7-glucoside) (FKI et *al.*, 2005 ; DE MARCO et *al.*, 2007 ; AIT BADDI et *al.*, 2009). La figure 12 représente les structures des principaux composés phénoliques retrouvés dans les margines d'olives.



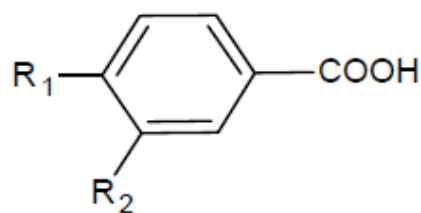
R = H : Acide 4-hydroxyphenyl acétique
R = OH : Acide 3,4-dihydroxyphenyl acétique



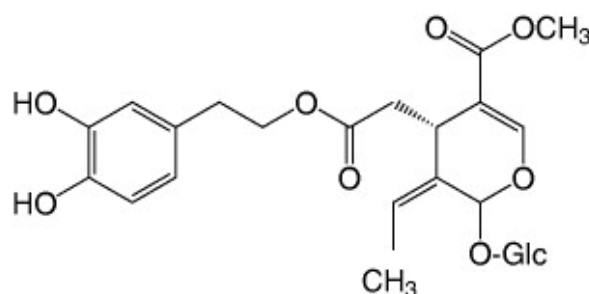
R1 = H, -R2 = H: Acide cinnamique
R1 = OH, -R2 = H : Acide *p*-coumarique
R1 = OH, -R2 = OH : Acide caféique
R1 = OH, -R2 = OCH3 : Acide férulique



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

Figure 12 : Structures des principaux composés phénoliques retrouvés dans les margines d'olives. Glc: Glucose (DERMECHE et al., 2013).

4.8. Les activités biologiques des margines et des composés phénoliques des margines en particulier

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux propriétés biologiques des margines, notamment l'activité anti-oxydante des composés phénoliques de ces derniers (CAYUELA et al., 2008 ; REDRIGEZ et al., 2009 ; KALOGERAKIS et al., 2013 ; ARAÚJO et al., 2015). Les composés qui partagent une structure orthodiphénolique (catécholique) possèdent une activité anti-oxydante. Dans les margines, plusieurs constituants phénoliques possèdent cette structure, à savoir l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine qui sont parmi les constituants phénoliques majeurs des margines et de l'huile d'olive (TUCK et HAYBALL, 2002). Une évaluation *in vitro* des activités anti-oxydantes de ces constituants phénoliques séparés a été

réalisée dans de nombreux travaux. Le tableau ci-après (Tableau IX) résume les principales activités biologiques des quatre composés phénoliques majeurs des margines

Tableau VIII: Les principales activités biologiques des composés phénoliques des margines

Composés phénolique	Activités	Auteurs
Hydroxytyrosol	Antioxydants	MANNA <i>et al.</i> (1999) VISIOLI <i>et al.</i> (2001) CASALINO <i>et al.</i> (2002) HAMDEN <i>et al.</i> (2009) ZRELLI <i>et al.</i> (2011) GERASOPOULOS <i>et al.</i> (2015) BEDOUHENE <i>et al.</i> (2017)
	Cardioprotectif et anti-Athérogénique	VISIOLI <i>et al.</i> (1997) VISIOLI <i>et al.</i> (2002) LEGER <i>et al.</i> (2000)
	Chemopréventif (cancer)	DEIANA <i>et al.</i> (1999) DELLA- RAGIONE <i>et al.</i> (2000) FABIANI <i>et al.</i> (2002) BASSANI <i>et al.</i> (2016)
	Antimicrobien et Antifongique	OBIED <i>et al.</i> (2007) YANGUI <i>et al.</i> (2010) ESMAIL <i>et al.</i> (2015) EL-ABBASSI <i>et al.</i> (2017)
	Anti-inflammatoire	RICHARD <i>et al.</i> (2011)
Oleuropéine	antioxydant	AMRO <i>et al.</i> (2002) BEDOUHENE <i>et al.</i> (2017)
	Cardioprotectif et anti-Athérogénique	VISIOLI <i>et al.</i> (1998)
	hypoglycémiant	TROVATO <i>et al.</i> (1993)
	Anti-hypertensif	DURATE <i>et al.</i> (1993)
	Anti-microbien et antivirale	AZIZ <i>et al.</i> (1998)
	Anti-inflammatoire	LEE- HUANG <i>et al.</i> (2003) BEDOUHENE <i>et al.</i> (2017)
Régulation des enzymes	POLZONETTI <i>et al.</i> (2004)	
Oleuropéine aglycone	antioxydant Antimicrobien	AMIOT <i>et al.</i> (1989) BRIANTE <i>et al.</i> (2001)
Tyrosol	Antioxydant Anti-inflammatoire Cardioprotectif et Anti-athérogénique	BRIANTE <i>et al.</i> (2001)

V. La contamination fongique des matrices alimentaires

5.1. Mycotoxines et moisissures dans les matrices alimentaires

Les mycotoxines, produits du métabolisme secondaire des champignons filamenteux, sont potentiellement présentes dans toutes les denrées alimentaires susceptibles d'être des supports de la croissance de champignons toxigènes. Le maïs est l'une des denrées les plus prédisposées à la contamination par les mycotoxines (OLDENBURG et al., 2017). Les groupes de mycotoxines qui se retrouvent le plus souvent dans les produits agricoles sont les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines (KUMAR et al, 2008). Les champignons responsables de la contamination pendant le stockage des denrées sont en général des organismes saprophytes dont la croissance peut être évitée par modification de leur environnement hydrique : de nombreuses techniques de séchage et de stockage permettant de limiter le développement des champignons dans les récoltes (MURPHY et al, 2006). En revanche, la contamination au champ des produits récoltés dépend de l'association des champignons avec les plantes et repose donc sur une relation écologique symbiotique, commensale ou parasitique (PITT, 2006). Les champignons producteurs de mycotoxines les plus courants appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (KABAK et al, 2006). Le genre *Fusarium* inclut un nombre important d'espèces pathogènes responsables de maladies destructives notamment chez les céréales. Quant aux champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, sont le plus souvent associés aux récoltes stockées, certaines de ces espèces peuvent aussi être pathogènes ou commensaux dans les plantes cultivées (PITT et al., 2000 ; MURPHY et al., 2006). Les principaux agents fongiques responsables de la production de mycotoxines dans les denrées agricoles dans le monde sont représentés dans le tableau X.

Tableau IX : Les principaux agents fongiques responsable de la production de mycotoxines dans les denrées agricoles dans le monde (MURPHY et al., 2006).

Mycotoxines	Principaux agents responsables	Denrées alimentaires				
		Céréales à paille	Maïs	Coton	Arachide	Fruits à coque
Trichothécènes et Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum</i>	X	X			
	<i>Fusarium culmorum</i>	X	X			
Fumonisines	<i>Fusarium verticillioides</i>		X			
	<i>Fusarium proliferatum</i>		X			
Aflatoxines	<i>Aspergillus flavus</i>	X	X	X	X	X
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	X			X	

Au champ, la contamination par les mycotoxines est consécutive à l'infection des plantes par les agents pathogènes. Il est cependant reconnu qu'il n'existe pas de relations stables entre niveaux de symptômes sur les organes atteints et niveaux de contamination par les toxines. Deux éléments expliquent ce constat. Le premier est la variabilité génétique (inter et intra-spécifique) des agents pathogènes : un niveau de symptôme donné peut être provoqué par des espèces ou souches ayant des capacités de production des mycotoxines très différentes (XU et al, 2008). Le second correspond au fait que la production de toxines est liée à un processus

métabolique à multiples fonctions, dont l'existence n'est pas vitale pour l'agent pathogène, et dont l'activation répond à des caractéristiques de son environnement (incluant l'interaction avec la plante hôte) (CARY et CALVO, 2008). L'infection comme la production des toxines dépendent de deux grands types de déterminants agissant en interaction : les caractéristiques climatiques, d'une part, et les pratiques agricoles, d'autre part (CHAMPEIL et *al.*, 2004).

Du fait de leur production et concentration dans les produits alimentaires, les mycotoxines ne constituent pas une classe chimique, mais peuvent se classer selon leur voie de biosynthèse en trois grands groupes d'après TURNER (1971) :

- **les composés dérivés des acides aminés** : l'alcaloïde de l'ergot (ergotamine), la requefortine, l'acide cyclopiazonique...etc.
- **les composés dérivés des terpènes** : la toxine T2, fusarénone, diacétoxyscirpénol...etc.
- **les composés dérivés des polcétacides (polyactétates)** : les ochratoxines, les aflatoxines, la zéaralénone, les fumonisines, la citrinine, la patuline... etc.

Leur structure chimique est très diversifiée, ce qui explique leurs effets biologiques différents : cancérigène, mutagène, tératogène, œstrogénique, neurotoxique et immunosuppressif (AFSSA, 2009).

5.2. Facteurs influençant la production des mycotoxines dans les aliments

5.2.1. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux affectant la production de mycotoxine sont d'origine physique, chimique ou biologique (MITCHELL et *al.*, 2004). Cependant, ces facteurs agissent rarement d'une façon indépendante ; en effet leurs interactions sont habituellement plus importantes que l'effet d'un seul facteur (LACEY, 1986).

Les deux facteurs physiques essentiels qui influencent sur la croissance des moisissures et la production de mycotoxines sont la température et l'humidité (PANAGOUE et *al.*, 2003 ; KOSEGARTEN et *al.*, 2016). En effet, les champignons de champs exigent typiquement une haute teneur en humidité dans le substrat (22-30 %) par rapport aux champignons de stockage (13-18 %) (SAMSON et *al.*, 2005). Chaque espèce ou isolat a son niveau optimal d'humidité ou activité de l'eau (a_w) et de température pour la production de mycotoxines. Ces optima peuvent différer sensiblement de leurs optima pour la croissance. A côté de l' a_w et la température, le pH peut avoir un effet critique pour la croissance fongique et la production de mycotoxine (GARCIA et *al.*, 2012). La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 5,5 à 9 avec une a_w entre 0,85 à 0,98 à une température optimale comprise entre 20°C et 30 °C (REBOUX, 2006).

Le tableau XI ci-dessous représente quelques facteurs environnementaux qui peuvent influencer la production de mycotoxines à différentes étapes de la chaîne alimentaire (HESSELTINE, 1976).

Tableau X: Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différentes étapes de la chaîne alimentaire (HESSELTINE, 1976).

Facteurs	Au champ	À la récolte	Pendant le Stockage
Physique			
- Humidité	+	+	+
Rapidité de séchage	-	+	+
Ré humidification	-	+	+
Humidité relative	+	+	+
- Température	+	+	+
- Damage mécanique	+	+	+
- Mélange de grains	-	+	+
- Temps	+	+	+
Chimique			
- CO ₂	-	-	+
- O ₂	-	-	+
- Nature du substrat	+	-	+
- Nutrition minérale	+	-	+
- Traitement chimique	-	-	+
Biologique			
- Stress de plante	+	-	+
- Vecteurs invertébrés	+	-	+
- Infection fongique	+	-	+
- Différences entre les variétés des plantes	+	-	+
- Différences entre les souches fongiques	+	-	+
- Charge en spores	+	+	+
- Ecosystème microbiologique	+	-	+

+ : effet

- : pas d'effet

5.2.2. Influence du substrat

La toxigenèse dépend de la croissance du champignon et de la composition chimique du substrat. En effet, les céréales et les oléagineux, plus riches en hydrates de carbone et en lipides, sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines (MAGAN et ALDRED, 2007 ; DA CRUZ CABRAL et *al*, 2013). Ainsi, la biogénèse des aflatoxines, de l'ochratoxine A, de la stérigmatocystine et de l'acide pénicillique (c'est-à-dire les dérivés de la voie des polycétoacides), est plus importante dans les milieux riches en glucides et en lipides que dans les milieux à forte teneur en protides (MURPHY et *al*, 2006 ; SULTANA et *al*, 2015). La production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* est favorisée par certains sucres: le glucose, le mannose, le fructose et le saccharose. En outre, *Aspergillus parasiticus* ne produit pas d'aflatoxines dans un milieu peptoné riche en sel (PAPP et *al*, 2002). Mais il peut y avoir des interactions plus ou moins spécifiques entre certains composés d'origine végétale ou fongique. Ainsi, le fait que le soja ne se prête pas à

l'accumulation d'aflatoxine peut s'expliquer par la présence d'acide phytique qui complexe le zinc, indispensable à la biosynthèse des aflatoxines (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999).

5.2.2.1. La contamination du maïs

Introduit dans les années 1500 en Afrique de l'Ouest, le maïs est devenu depuis, l'une des principales cultures de céréales d'Afrique. Il représente plus de 25 % des dépenses des ménages à faibles revenus en Afrique de l'Ouest. Le maïs est riche en vitamines A, C et E et il constitue une source abondante de glucides, minéraux essentiels et de fibres. En moyenne, le maïs contient 9 % de protéines. La plupart du maïs cultivé dans le monde provient des variétés blanches et jaunes. Le maïs blanc est le maïs préféré pour la consommation humaine et le jaune sert à alimenter les animaux en raison de son contenu supérieur en bêta-carotène ce qui permet d'obtenir des jaunes d'œufs plus solides et oranges, et donne plus de couleur à la viande des poulets de chair LEO (2016).

Les aflatoxines sont signalées dans plusieurs cultures agricoles, principalement le maïs, les arachides, les pistaches et les graines de coton. En effet le maïs peut être contaminé par plus d'une mycotoxine et en contient parfois jusqu'à cinq ou six en même temps et il est très facilement contaminé par l'aflatoxine (FAO, 2004).

La contamination du maïs est très préoccupante car cette culture joue un rôle majeur à la fois dans l'alimentation humaine et animale dans le monde. Il y'a quelques années, les aflatoxines n'avaient pas été signalées comme une source de préoccupation au niveau des céréales en Europe. Toutefois, des contaminations du maïs alarmantes ont été signalées en 2003 et en 2012, respectivement pour l'Italie et l'Europe du Sud. Une très faible contamination par les aflatoxines a été publiée sur le blé, ce qui suggère que, jusqu'à présent, la contamination par les aflatoxines est moins préoccupante dans cette culture et ses produits dérivés (BATTILANI et *al.*, 2016).

5.2.2.1.1. Le maïs en Algérie

Bien que considéré comme principal intrant dans la fabrication d'aliments de bétail et de volaille, les besoins de l'Algérie en maïs sont couverts exclusivement par l'importation. La production en Algérie de cette matière première, qui a pourtant bénéficié d'un programme d'aide national important, semble insuffisante pour satisfaire la demande locale. L'Argentine est le principal pays fournisseur de l'Algérie en maïs avec 3,1 millions de tonnes en 2014 et 2,7 millions de tonnes en 2015 suivi par le Brésil 667.560 de tonnes en 2014 et 1 million de tonnes en 2015. Quatre pays fournissant la quasi-totalité du maïs à l'Algérie, il s'agit de : l'Argentine, l'Ukraine, le Brésil et les USA (ANONYME 4, 2016).

La demande des secteurs des produits laitiers et de la viande bovine ainsi que l'augmentation des efforts de modernisation dans le secteur céréalier ont entraîné une augmentation des importations de maïs au cours des cinq dernières années. Les importations de maïs en 2015 / 2016 ont été principalement réalisées par le secteur privé (90 %), les 10 % restant sont couverts par l'office national des aliments du bétail (ONAB) (HALES, 2016).

Pour le maïs, une hausse des importations de 4,7 % a été enregistrée durant les trois premiers mois de l'année 2017 (0,94 millions de tonnes) comparativement à la même période de l'année 2016 (0,90 millions de tonnes) (ANONYME 5, 2017).

5.2.3. Autres facteurs

Les micro-organismes « de concurrence » peuvent affecter la production des mycotoxines sur les produits agricoles. Ils peuvent augmenter ou gêner la formation des mycotoxines en changeant le métabolisme de l'organisme producteur, par la concurrence vis à vis du substrat et la production des composés inhibiteurs (LACEY, 1986). Les interactions avec d'autres microorganismes peuvent également être différentes dans les différentes conditions environnementales (MARIN et *al.*, 1998 ; CAIRNS et *al.*, 2003).

Plusieurs facteurs additionnels peuvent influencer la production des mycotoxines dans le champ. Ils peuvent s'agir des pratiques agricoles comme le labour et la rotation de récolte (LIPPS et DEEP, 1991), les fongicides utilisés (MOSS et FRANK, 1985), la variété de la plante (GOLINSKI et *al.*, 1996) et les différences géographiques (LANGSETH et *al.*, 1995). En outre la culture biologique peut poser un risque pour la production accrue de mycotoxines (EDWARDS, 2003).

5.3. Le genre *Aspergillus* et la section *Flavi* en particulier

Les espèces d'*Aspergillus* spp. sont très répandues dans la nature et tout particulièrement dans le sol où ils contribuent à la biodégradation et le recyclage des matières organiques (SCHEIDEGGER et PAYNE, 2003 ; BLUMA et *al.*, 2008a). Ils sont par ailleurs utilisés dans plusieurs domaines (agriculture, biotechnologie et santé) en exerçant des rôles bénéfiques comme la production de métabolites utiles (enzymes, protéines et acides).

En revanche, les *Aspergillus* sont capables de provoquer des dégâts importants, notamment ceux liés aux contaminations des denrées alimentaires (PITT et *al.*, 2000). Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de coloniser de nombreux produits d'origine végétale et de produire des mycotoxines (SCHEIDEGGER et PAYNE, 2003).

Etant donné son importance économique extrême liée à ses effets utiles et nuisibles, plusieurs ouvrages ont été consacrés au genre *Aspergillus* en général et à sa taxonomie et sa phylogénie en particulier (SAMSON et *al.*, 2006).

L'identification morphologique des espèces appartenant au genre *Aspergillus* est basée sur l'observation des caractères macroscopiques et microscopiques suivants:

- L'aspect de la colonie: la couleur de la partie aérienne est le critère de base qui permet de distinguer les espèces du genre *Aspergillus*. L'autre aspect est la texture de la colonie qui peut être floconneuse, veloutée, etc. ;
- l'aspect et la couleur du revers de la colonie qui peut parfois être caractéristique d'une espèce ;
- la production des sclérotés (amas mycéliens durs), de forme, de taille et de couleur caractéristiques ;
- la vitesse de croissance du mycélium ;
- la taille, l'ornementation, la couleur et la forme des conidies ;
- la forme et la taille des vésicules ;
- la présence ou l'absence des stérigmates (métules) ;
- la longueur des conidiophores et leur aspect.

Les espèces de ce genre présentent un thalle cloisonné portant de nombreux conidiophores longs, érigés vers le haut, non ramifiés, qui se terminent par une tête sphérique

appelée vésicule, de forme globuleuse. Les phialides, ou cellules conidiogènes en forme de bouteille, sont formées soit, directement sur la vésicule, on parle alors de tête unisériée, soit sur des cellules spécialisées appelées métules (stérigmates), on parle de tête bisériée (figure 13) conidiophores sont produites en quantité très abondante. Certaines espèces d'*Aspergillus* ont la capacité de former des amas mycéliens durs, appelés sclérotes, qui aident le champignon à survivre dans des conditions hostiles (WICKLOW et SHOTWELL, 1983 ; NESCI et *al.*, 2009).

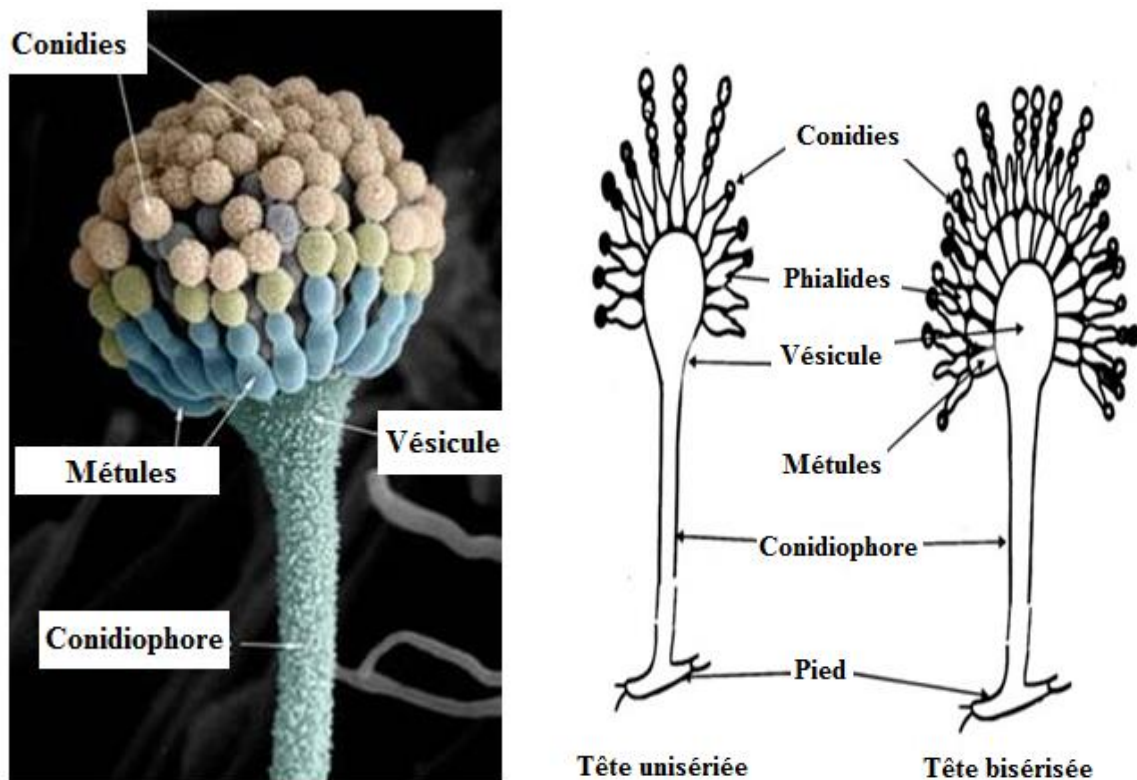


Figure 13 : La micromorphologie du genre *Aspergillus*
www.thegourdreserve.com/mold/into.shtml.

5.3.1. *Aspergillus* section *Flavi*

Les membres d'*Aspergillus* section *Flavi* (groupe d'*A. flavus*) occupent des niches écologiques très diverses. Les espèces de cette section peuvent être présentes dans la nature soit comme des saprophytes dans le sol ou comme des parasites des plantes, des insectes et des animaux (HORN et DORNER, 1998). Dans cette section, *A. flavus* et *A. parasiticus* retiennent le plus d'attention car elles sont non seulement pathogènes pour certaines plantes (arachides, maïs et coton), mais elles produisent aussi des aflatoxines (SMITH et MOSS, 1986 ; SULTANA et *al.*, 2015).

5.3. 2. Les espèces de la section *Flavi* et leurs mycotoxines

Dans la clé synoptique publiée en 1981 par CHRISTENSEN, 18 espèces ont été décrites. Cette clé est basée sur l'étude des caractères cultureux et morphologiques, dont la couleur des têtes conidiennes, la croissance à 37 °C et les dimensions des conidiophores, des vésicules et des conidies. De très nombreuses études ont été menées sur ce groupe. D'après SAMSON et *al.* (2006), il y'a 18 espèces appartenant à la section *Flavi*.

Ces espèces développent des couleurs allant du jaune-vert à brun (BHATNAGAR-MATHUR et *al.*, 2015). Les critères d'identification des espèces de la section *Flavi* sont actuellement basés sur la morphologie, le profil des mycotoxines produites et l'analyse des séquences de l'ADNr (SAMSON et *al.*, 2014). *Aspergillus flavus* est une espèce génétiquement très complexe et a été subdivisée en deux catégories, selon les caractères morphologiques et génétiques, et le profil de production des mycotoxines (SAMSON et *al.*, 2006).

Morphologiquement, on peut distinguer deux catégories d'isolats. La première catégorie produit de grands sclérotés, de type « L » (Large) de diamètre supérieur à 400 µm. La seconde catégorie produit de nombreux petits sclérotés, de type « S » (Small), de diamètre inférieur à 400 µm (COTTY, 1989). Selon GEISER et *al.* (2000) et NESCI et *al.* (2008), *A. flavus* est divisé morphologiquement en deux groupes. Le premier groupe comprend les types « L » et « S » producteur d'aflatoxine B et le second groupe comprend uniquement le type « S » capable de produire les aflatoxines B et G. D'après HUA (2002) et NESCI et *al.* (2008), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le type « L » comprend des producteurs et des non producteurs. Le tableau XII résume les principales espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* productrices d'aflatoxines (VARGA et *al.*, 2003).

Tableau XI: Production d'aflatoxines B et G, d'acide cyclopiazonique et d'acide kojique par les principales espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (VARGA et *al.*, 2003).

Espèce	Aflatoxines		Acide Cyclopiazonique	Acide Kojique
	B	G		
<i>A. flavus</i> groupe I	+	-	±	+
<i>A. flavus</i> groupe II	+	±	+	+
<i>A. oryzae</i>	-	-	±	+
<i>A. parasiticus</i>	+	+	-	+
<i>A. sojae</i>	-	-	-	+
<i>A. nomius</i>	+	+	-	+
<i>A. bombycis</i>	+	+	-	+
<i>A. tamaritii</i>	-	-	+	+
<i>A. caelatus</i>	-	-	-	+
<i>A. pseudotamaritii</i>	+	-	+	+

+ : producteur. - : non producteur. ± : production variable selon les souches.

5.4. Les aflatoxines

5.4.1. Propriété physico-chimiques

On connaît, du point de vue structural, au moins 16 aflatoxines (COLE et COX, 1981 ; PAPP *et al.*, 2002) dont les principales sont l'AfB1, l'AfB2, l'AfG1, l'AfG2 et l'AfM1 (Figure 14). Elles sont produites principalement par les espèces du genre *Aspergillus* dont, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* et *A. pseudotamarii*. Les quatre principales aflatoxines détectées dans les produits végétaux contaminés sont l'AfB1, l'AfB2, l'AfG1 et l'AfG2. L'AfB1 est partiellement métabolisée en un dérivé hydroxylé, communément appelé "Milk Aflatoxin 1" ou aflatoxine M1 (AfM1), lors de l'ingestion de produits contaminés. Les aflatoxines posent un risque pour la santé humaine et animale (PARK et LIANG, 1993). Le Centre international de la recherche sur le cancer a classé l'aflatoxine B1 dans le groupe 1 (cancérogène humain) et l'AfM1 dans le groupe 2 (cancérogène humain probable) (IARC, 1993).

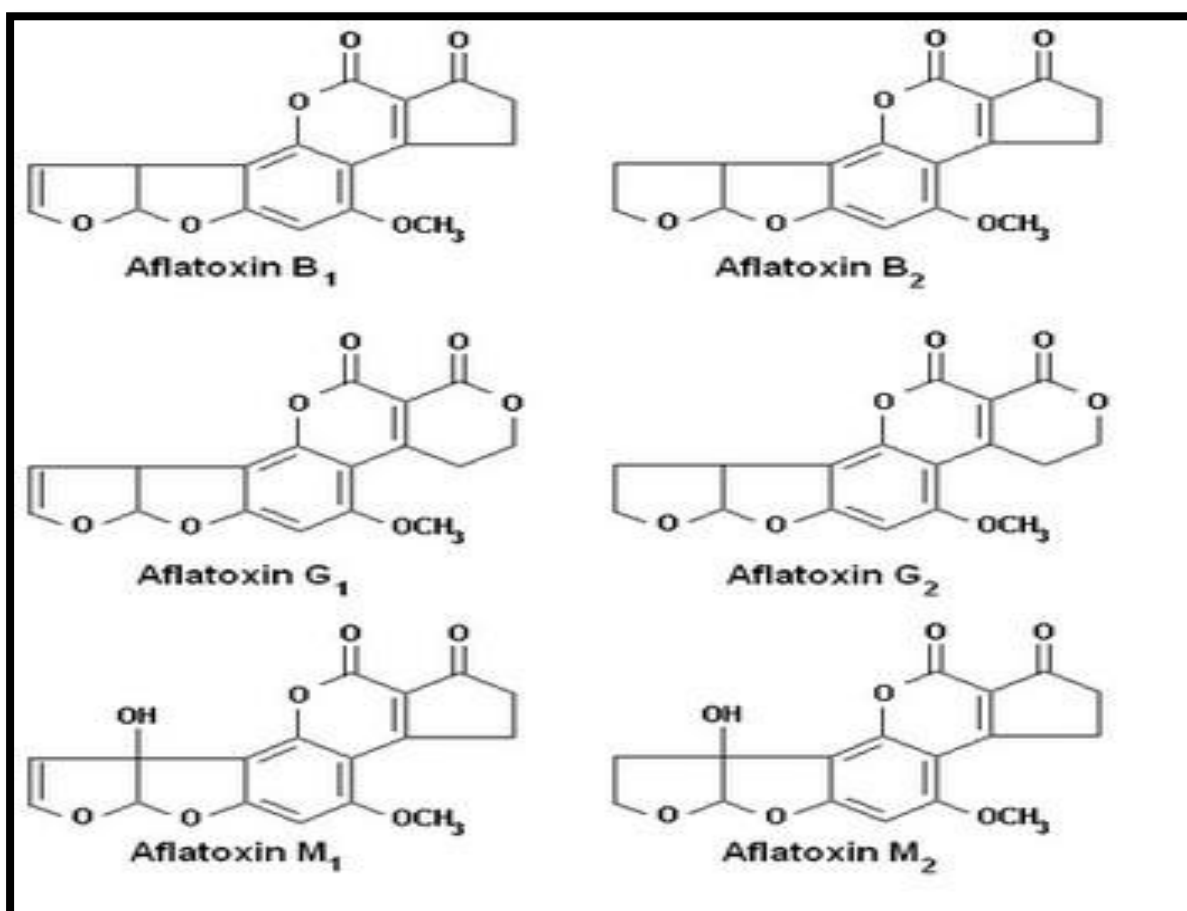


Figure 14 : Structure chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1, M2 (DUTTON *et al.*, 1985).

Les aflatoxines sont caractérisées au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (Aflatoxine B) ou des lactones hexatomiques (Aflatoxine G) (ASTORECA *et al.*, 2011). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur les noyaux. Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire

(312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau (10-20 mg/litre), insolubles dans les solvants non polaires et très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires à polaires (chloroforme et méthanol). La fluorescence intense des aflatoxines, une fois exposées à des longueurs d'ondes ($\lambda = 365$ nm) de la lumière ultra-violette (U.V.), a pour avantage de détecter ces composés à des niveaux extrêmement bas (de l'ordre du nanogramme). L'aflatoxine de type B (AFB = AF « Blue ») donne une fluorescence bleue et l'aflatoxine de type G (AFG = AF « Green »), donne une fluorescence verte (KURTZMAN et *al.*, 1987). L'AFM1 donne une fluorescence bleu-mauve. Cette fluorescence fournit la base pour pratiquement toutes les méthodes physico-chimiques de leur détection et leur quantification.

Les propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines sont résumées dans le tableau XII.

Tableau XII: Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines (COLE et COX, 1981 ; DUTTON et *al.*, 1985 ; COLE et SCHWEIKERT, 2003)

Aflatoxines	Formule brute	Masse moléculaire g/mol	Point de fusion (° C)	Absorption maximale à la lumière UV (λ max) et Coefficient d'extinction molaire (ϵ) dans le méthanol	
				λ max (nm)	ϵ
B1	C₁₇H₁₂O₆	312,3	268-269 (Cristallisation dans le chloroforme)	265 360-362	12 400 21 800
B2	C₁₇H₁₄O₆	314,3	286-289 (Cristallisation dans un mélange de chloroforme et de pentane)	265 360-362	12 100 24 000
G1	C₁₇H₁₄O₆	328,3	244-246 (cristallisation dans un mélange de chloroforme et de méthanol)	265 360-362	9 600 17 700
G2	C₁₇H₁₄O₇	330,3	237-240 (Cristallisation dans une solution d'acétate d'éthyle)	265 360-362	8 200 17 100
M1	C₁₇H₁₂O₇	328,3	299 (cristallisation dans une solution de méthanol)	265 357	14 150 21 250
M2	C₁₇H₁₄O₇	330,29	293	264 357	12 100 22 00

5.4.2. Facteurs influençant la production d'aflatoxines

La prolifération des moisissures et la synthèse des mycotoxines peuvent avoir lieu avant ou après la récolte, durant l'entreposage, le transport ou la transformation du produit (ATAS et *al.*, 2012 ; MARIN et *al.*, 2013). Il s'agit d'un phénomène d'une grande complexité qui dépend d'une combinaison des facteurs température et humidité ainsi que de l'oxygénation au niveau du substrat. Les stress thermique, hydrique (sècheresse) et physique (lésions causées par les insectes) favorisent la contamination par les moisissures et la synthèse de mycotoxines (DOWD, 1998 ; MARIN et *al.*, 2013). Les conditions les plus favorables pour le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines sont :

- *Activité de l'eau (a_w) supérieure à 0,83;*
- *température comprise entre 25 et 40°C ;*
- *la présence d'oxygène ;*
- *le développement du champignon sur des plantes stressées ;*
- *la présence d'insecte et de graines abimées ;*
- *le stockage en milieu chaud et humide ;*
- *la Composition du substrat : en effet la composition qualitative et quantitative des substances nutritives (des glucides, principalement) peut influencer la production de mycotoxines. La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus*. En effet la présence de l'acide phytique complexe le zinc indispensable à la biosynthèse des aflatoxines, alors que la proline stimule cette production (TABUC, 2007).*

5.4.3. Biosynthèse des aflatoxines

Les voies de biosynthèse des AFs sont longues et complexes et les réactions sont catalysés par des enzymes de spécificité différentes de celle du métabolisme primaire. La détermination des schémas métaboliques de biosynthèse de certaines mycotoxines comme les aflatoxines a été rendu possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques et de précurseurs métaboliques (BHATNAGAR et *al.*, 2006)

Comme le montre la figure 15, l'étape initiale dans la production du squelette polycétide des aflatoxines dans le schéma proposé par YU et *al.*(2004) implique la polymérisation d'unités d'acétate et de neuf malonates (avec une perte de CO₂) par une polycétide synthétase (Pks) d'une manière analogue au processus de biosynthèse des acides gras. L'acétyl-CoA sera l'unité de départ (Starter Unit) tandis que les acyl-coenzymesA, généralement le malonyl-CoA, feront figure d'unité d'élongation (BHATNAGAR et *al.*, 2006).

Les gènes impliqués dans la synthèse des AFs sont regroupés en cluster (ensemble de gènes regroupés en une zone de l'ADN). La fonction de la plupart des produits des gènes codants pour les AFs a été déduite par des moyens génétiques ou biochimiques. Différentes expériences de clonage des gènes impliqués dans la biosynthèse des aflatoxines ont permis de situer 25 gènes dans une région de l'ADN de 70 kb du chromosome III chez *A. flavus*. Sur les 25 gènes identifiés dans la voie de biosynthèse des AFs, seuls quatre gènes (norA, norB, aflT et ordB) dont la fonction de leur produit protéique n'ont pas encore été déterminé expérimentalement (BHATNAGAR et *al.*, 2006).

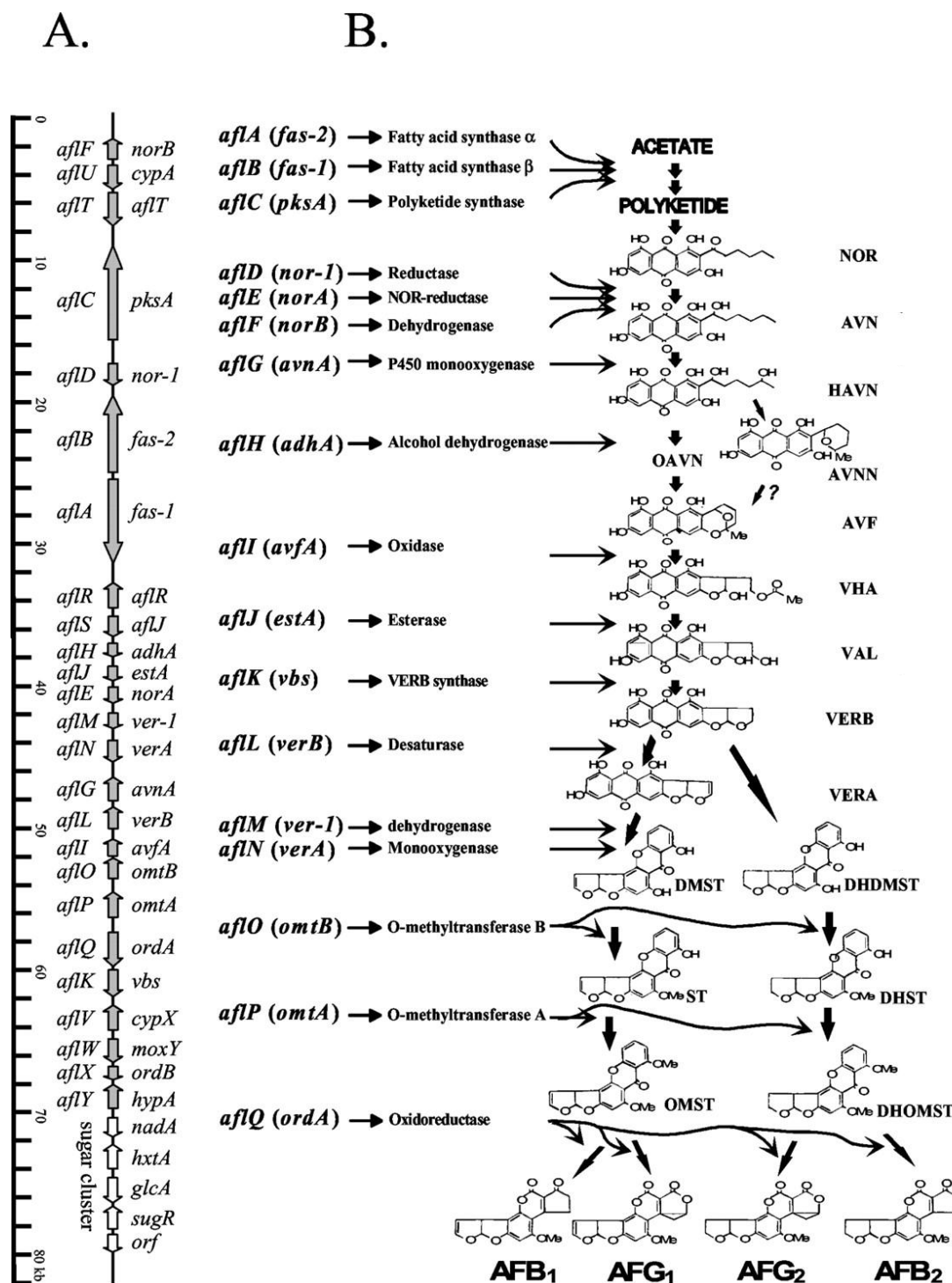


Figure 15 : Les gènes responsables de la biosynthèse des aflatoxines chez *A. flavus* et *A. parasiticus*. (A) Gènes en cluster (les flèches indiquent la direction de la transcription du gène) et (B) la voie de biosynthèse des aflatoxines (YU *et al.*, 2004).

NOR : l'acide norsolorinique; AVN : averantine; HAVN : 5'-hydroxy-averantine; AVNN : averufanine; AVF : averufine; VHA : versiconal hémiacétal acétate; VAL : versiconal; VERB : versicolorineB; VERA : versicolorineA; DMST : déméthylstérigmatocystine; DHDMST : dihydrodéméthylstérigmatocystine; ST : stérigmatocystine; DHST : dihydrostérigmatocystine; OMST : O-méthylstérigmatocystine; DHOMST : dihydro-O-méthylstérigmatocystine; AFB₁, aflatoxine B1; AFB₂, aflatoxine B2; AFG₁ : aflatoxine G1; AFG₂ : aflatoxine G2.

5.4.4. Effets toxiques des aflatoxines

L'effet toxique des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique, le mode d'administration, la composition de l'alimentation. L'AFB1 est la plus toxique suivie, par ordre décroissant de toxicité, par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2. La toxicité des aflatoxines G1, B2 et G2 est respectivement de 50, 80 et 90 % moindre que celle de l'AFB1 (COLE et COX, 1981). Ainsi la DL50 par voie orale varie de 0,3 mg/kg de poids corporel chez le caneton et 9 mg/kg de poids corporel chez la souris. Ingérée en grande quantité, l'aflatoxine peut être responsable de toxicités aiguës. Elle se caractérise généralement par la mort rapide des animaux. Ils présentent alors un foie décoloré et augmenté de volume (hépatotoxicité) ; les reins présentent des signes de glomérulonéphrite et les poumons sont congestionnés (BROCHARD et LE BACLE, 2009).

Les aflatoxines sont tératogènes et mutagènes (LIANG *et al.*, 2008 ; GEORGIADOU *et al.*, 2012). L'effet tératogène est bien décrit chez les embryons de poulet pour lesquels on note un retard de développement, une microcéphalie, une anophtalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires (VESELY *et al.*, 1983 ; SUNG-HYE *et al.*, 2008).

Toutefois, la propriété toxique majeure de l'AFB1 est son pouvoir cancérigène (DAOHONG *et al.*, 2009). En effet, cette molécule est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes chez les hommes et les animaux (CURTIS *et al.*, 2009). Pour cette raison, elle est classée dans le groupe I des molécules cancérigènes chez l'homme par l'IARC (IARC, 1993; REDDY *et al.*, 2010).

5.4.5. Métabolisme et mécanisme d'action des aflatoxines

Lors de l'exposition orale chez les mammifères, les aflatoxines sont adsorbées au niveau du duodénum. Les aflatoxines sont véhiculées dans l'organisme à partir d'une fixation sur les protéines plasmatiques (BROCHARD et LE BACLE, 2009). Elles subissent un métabolisme hépatique intense principalement réalisé par l'intervention des cytochromes P450 hépatiques. Les autres voies de métabolisme de l'AF B1 comprennent la voie de la prostaglandine H-synthétase et la voie de la lipo-oxygénase. Deux enzymes présentes à des concentrations élevées dans le tissu pulmonaire.

Sous contrôle des cytochromes P450, l'AFB1 est transformée dans l'organisme en plusieurs métabolites dont un dérivé époxyde (AFB1-8,9- époxyde), principal responsable de l'effet mutagène et cancérigène de l'AFB1 et AFM1, communément appelé «Milk Aflatoxin1 » (LI *et al.*, 2010). Les autres métabolites comprennent notamment l'AFQ1, l'AFP1, l'Aflatoxicol. La détoxification de l'AFB1-8,9- époxyde se fait essentiellement via la conjugaison au glutathion assurée par la glutathion-S-transférase (GST). Une partie de l'AFB1 est éliminée dans la bile sous forme conjuguée au glutathion ou de glucuro-conjugué. L'AFB1 est aussi éliminé par voie urinaire sous forme inchangée ou sous forme métabolisée, notamment AFM1, ou sous forme de dérivés conjugués ou adduits à l'ADN (BROCHARD et LE BACLE, 2009).L'exposition des nourrissons à l'AFM1 à partir du lait maternel a été notée dans les pays en développement (MAGOHA *et al.*, 2014).

Les effets toxiques aigus ainsi que les effets cancérigènes et mutagènes de l'AFB1, implique une liaison covalente de l'AFB1-8,9- époxyde avec l'ADN, l'ARN et les protéines. Cela se répercute au niveau de la synthèse d'enzymes clés impliquées dans des réactions métaboliques essentielles (STARK, 2001). L'AFB1-8,9- époxyde a une affinité très marquée

pour l'ADN avec lequel il produit des adduits préférentiellement avec la guanine en position N7 (PAPP et *al.*, 2002). L'AFB1 est époxydé soit en dérivé exo, soit en dérivé endo. Seule la forme exo se fixe sur la guanine pour donner un adduit. La présence des adduits à l'ADN est à l'origine de mutation. Il s'agit essentiellement de transversions G et T où la guanine est remplacée par la thymine. C'est ainsi que l'on observe un effet immunosuppresseur, des troubles de la coagulation, une diminution de la digestion de graisses et de la cellulose ainsi que de la nécrose et de la stéatose hépatique (LEBLANC et SAINT-HILAIRE, 2002 ; LI et *al.*, 2016).

Il existe des preuves suffisantes de la cancérrogénicité de ses molécules chez l'homme et l'animal. Certains scientifiques considèrent que chez l'homme, les aflatoxines n'agiraient pas comme cancérogènes primaires, mais plutôt comme suppresseur des réactions immunitaires à médiation cellulaire favorisant le nombre de porteurs de virus de l'hépatite B (VHB). Les effets immunotoxiques semble être due à l'altération de la synthèse des acides nucléiques et de protéines accompagnée d'une diminution de la prolifération et de la production de cytokines. Parmi d'autres effets néfastes des AFs, on retrouve un découplage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (BROCHARD et LE BACLE, 2009; PFOHL-LESZKOWICZ, 2009).

De nombreuses études épidémiologiques et les tests de génotoxicité ont confirmé le rôle déterminant des aflatoxines, en particulier AFB1 et dans une moindre mesure AFM1, dans l'induction du cancer hépatique. Des études plus poussées sont en cours pour en déterminer plus précisément les mécanismes d'action (PFOHL-LESZKOWICZ, 2009). Le risque de cancer lié aux aflatoxines peut être accru jusqu'à 60 fois en présence du virus de l'hépatite B et en cas de malnutrition (LEBLANC et SAINT-HILAIRE, 2002). Cela laisse supposer une sensibilité particulière des couches les plus pauvres des populations (PERAICA et *al.*, 1999). En effet plusieurs mécanismes moléculaires contribuent à expliquer le risque élevé de développement de carcinomes hépatocellulaire lors de l'exposition simultanée au VHB et aux aflatoxines (CURTIS et *al.*, 2009). D'après WILD et *al.* (1992) une ingestion de 1,4 µg d'AFB1 associée au virus d'hépatite B constitue un risque de développement de cancer.

5.4.6. Méthodes d'extraction et de caractérisation des aflatoxines

Les mycotoxines spécifiquement les aflatoxines se retrouvent dans de nombreux aliments, ce qui en terme d'analyse correspond à une multitude de matrices complexes. Les protocoles destinés à la quantification des aflatoxines renferment systématiquement des étapes préliminaires de préparation des échantillons (broyage, centrifugation, extraction en milieu organique). Souvent longues et manuelles, ces étapes doivent être optimisées pour chaque type de matrice (échantillon). Dans les aliments les aflatoxines sont souvent sous forme de traces, exprimés souvent en ppb ou en µg/kg. Des méthodes analytiques conventionnelles et émergentes reposant sur les avancées technologiques récentes dans l'analyse de mycotoxines ont été mises au point par plusieurs chercheurs à travers le monde. Ainsi il existe toute une panoplie de méthodes d'analyses ; on peut citer la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ou la limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) rapporté par MARTINEZ-MIRANDA et *al.* (2015) de l'AFB1 de la somme des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ pour le maïs est inférieur à 0,10 µg/kg (ppb). Cette dernière peut être couplée à différentes méthodes de détection qui permettent aussi bien

l'identification que la quantification des aflatoxines. Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'electrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui permettent l'analyse de très faibles quantités d'échantillons. Ces techniques sensibles sont excessivement coûteuses et elles nécessitent un personnel qualifié (SAQER, 2009). D'autres méthodes plus récentes appelées aussi « méthodes rapides de criblage » utilisent le principe de l'immunoanalyse type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) autorisent selon leur configuration soit une détection de type présence ou absence (résultat qualitatif), soit une détection semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine ou immunochimique type LFD (Lateral flow devices) ou la LOD et la LOQ des aflatoxines par exemple pour le maïs est égale à 1 µg/kg (ppb)(ZHENG et *al.*, 2006). Des « tiges » immunochimiques permettent une détection rapide basée sur l'interaction entre les anticorps spécifiques, immobilisés sur une bande de membrane et des récepteurs anticorps, qui réagissent avec l'analyte pour former un complexe d'analyte-récepteur (SUNG-HYE et *al.*, 2008 ; TAN et *al.*, 2009 ; HUYBRECHTS et *al.*, 2013 ; HUONG et *al.*, 2016). Cependant, des recherches sont en cours pour disposer de méthodes plus rapides et fiables et moins coûteuses pour des contrôles de routine sur le terrain.

5.4.7. Réglementation

Les aflatoxines sont les mycotoxines les plus réglementées. Dans le cadre du règlement 1881/2006, 1126/2007, 105/2010CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) portant sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires destinées à l'homme, des teneurs maximales ont été fixées pour les aflatoxines B1, B2, G1, G2 sont présentées dans le Tableau XIII.

Tableau XIII: Teneurs maximales pour les aflatoxines dans des denrées alimentaires selon les réglementations de la commission européenne (1881/2006/CE ; 1126/2007/CE ; 105/2010/CE).

Denrées alimentaires	Teneurs maximal en Aflatoxines (µg/kg)	
	B1	B1+B2+G1+G2
Fruits séchés et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2	4
Toutes les céréales et tous les produits dérivés des céréales, y compris les produits de céréales transformés	2	4
Maïs destiné à être soumis à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	5	10
Arachides destinées à être soumises à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	8	15
Arachides, fruits à coque et produits dérivés de leur transformation, destinée à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2	4

5.5. Approche de décontamination

5.5.1. Procédés de lutte contre la production de mycotoxines et des aflatoxines en particulier dans les matrices alimentaires

Les mycotoxines posent un problème universel important et de santé publique, ainsi que pour l'agriculture et l'économie (KOSEGARTEN et *al.*, 2016). La contamination par les aflatoxines des cultures aboutit à des effets économiques directs, tels que la perte du produit ou de sa valeur marchande, des problèmes de santé et les coûts associés, ainsi que des effets économiques indirects tels que la baisse des performances d'animaux d'élevage due à l'ingestion d'aliments contaminés par ces derniers, les coûts du suivi des maladies d'origine alimentaire, etc. L'Agence américaine des produits alimentaires et des médicaments, appelé FDA (Food and Drug Administration) a imposé des réglementations importantes sur les niveaux de contamination d'aflatoxine à 20 ppb (partie par milliard, désignant une concentration d'aflatoxines égale à 10^{-9}) dans les aliments et les aliments pour les animaux et 0,5 ppb dans le lait, l'Union européenne (UE) a fixé la limite de 2 à 4 ppb (BHATNAGAR-MATHUR et *al.*, 2015).

Le maïs et les céréales sont susceptibles d'être contaminés par les moisissures et les mycotoxines (SCHMIDT et ESSER, 1985 ; HUONG *et al.*, 2016). Pour pouvoir lutter contre ces contaminations, il faut savoir à quel moment elles se développent au cours de l'élaboration d'un produit. Ainsi, il est possible de définir six moments privilégiés: lors de la culture, de la récolte, du stockage, de la transformation, de l'alimentation des animaux et enfin lors de la consommation par l'Homme. Les moyens de lutte pour chaque période sont consignés dans le tableau XIV (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999).

Tableau XIV: Les moyens de lutte pour chaque période définie contre les moisissures et les mycotoxines (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)

Période définie	Solutions proposées
Au champ	- créer des plantes résistantes ; - limiter le développement par l'emploi de fongicides ; - arrosage adapté ; - apport en minéraux.
À la récolte	- veiller à la maturité du grain ; - inspection visuelle pour éliminer les éléments abîmés ; - éviter les récoltes par temps humide.
Au stockage	- contrôle périodique ; - maintenir une bonne température ; - contrôler l'humidité ; - détruire les produits contaminés ; - une bonne aération des silos.
À la transformation	- contrôle maïs, plus au niveau des mycotoxines que des moisissures.
Dans l'alimentation des animaux	- tests de contamination, puis décontamination si nécessaire.
À la consommation	- éliminer les aliments contaminés ; - cuisson des aliments.

5.5.2. Les différents modes de décontamination

Un procédé de décontamination des aliments destinés à l'alimentation humaine ou animale doit être efficace sans les rendre impropres à la consommation. Il doit être simple d'utilisation et peu coûteux car la décontamination peut concerner des quantités importantes. Le processus est d'autant plus difficile à appliquer à cause de la contamination qui est souvent très hétérogène. Il n'existe pas de méthode universelle qui puisse convenir pour traiter l'ensemble des mycotoxines. En effet les procédés de conservation (stérilisation, pasteurisation, lyophilisation, congélation, etc.) détruisent peu ou pas les mycotoxines (HARRIS et STAPLES, 1992).

Les méthodes de détoxification connues à ce jour sont d'ordre :

- **Physique** : La décontamination physique inclut plusieurs pratiques notamment le lavage, séchage, tri et séparation des poussières, des coques ou des peaux qui sont le lieu essentiel de la contamination (YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002) ;

- **Chimique** : Les inhibiteurs chimiques de moisissures correspondent aux traitements à l'ammoniaque sous pression, addition de propionate, de formaldéhyde, d'hydrure de calcium, d'hydroxyde de sodium, de chlorure de sodium, hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène ou de tout autre inhibiteur de moisissures (YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002 ; REDDY et al., 2009a)

Les fongicides sont largement utilisés dans la lutte chimique contre les champignons phytopathogènes, avec des résultats avérés sur l'incidence des maladies ; en revanche, les effets de l'application de fongicides sur la production de mycotoxines sont contradictoires et parfois irréguliers. Plusieurs fongicides sont utilisés spécifiquement contre des champignons producteurs de mycotoxines : carbendazim, hexaconazole, propiconazole, tébuconazole ; se sont avérés efficaces contre la croissance et la production de l'AFB1 de la souche *Aspergillus flavus in situ* sur les grains de riz. Cette inhibition est totale à la concentration de 1 g/kg de riz (REDDY et REDDY, 2010). L'application des associations mixtes de fongicides azolés : carbendazim-mancozeb et le prochloraz-tébuconazole se sont aussi avérés efficaces contre la croissance, la sporulation et la production de l'AFB1 de la souche *Aspergillus flavus, in vitro* sur milieu YES (Yeast Extract Sucrose) et *in situ* sur les grains de maïs (MATEO et al., 2017).

Le moment de l'application des fongicides semble jouer un rôle crucial dans l'efficacité du traitement : pour les céréales, l'efficacité est maximale au début de l'anthèse et décroît rapidement avant et après ce stade (BEYER et al., 2006). Pour ce qui est des aflatoxines, l'effet des fongicides est plus incertain, de sorte qu'actuellement il n'y a aucune recommandation de fongicide pour lutter contre la contamination.

- **Microbiologique** : Le procédé de détoxification microbiologique par le biais d'agents biologiques qui consiste en l'ajout de certaines bactéries comme exemple *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma virens* et *Bacillus subtilis* (REDDY et al., 2009b ; BHATNAGAR-MATHUR et al., 2015) et certaines souches de bactéries lactiques (bifidobactéries) sont capables de se lier et de détoxifier les mycotoxines (biodégradation) et réduire leur production, ces agents ont aussi un effet sur la croissance des espèces productrices (HASKARD et al., 2000 ; CHINAPHUTI et AUKKASARAKUL, 2008). En effet les espèces citées ci-dessus ont démontré respectivement 93 %, 80 % et 68 % de réduction de la croissance d'*A. flavus* et de 83,7 %, 72,2 % et 58 % de réduction d'AFB1 (REDDY et al., 2009b). Des recherches sont actuellement effectuées afin de développer de nouvelles classes de ligands naturels des mycotoxines. Ainsi, les glucomannanes issus de la partie externe des parois des levures *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de lier *in vitro* certaines mycotoxines (LI et al., 2010).

- **Biologique** : Le statut actuel de la recherche sur les stratégies de gestion des aflatoxines et les possibilités futures ont été examinées de manière exhaustive. Des progrès significatifs ont été accomplis pour expliquer les voies et les intermédiaires des voies de biosynthèse, les gènes impliqués, les enzymes correspondantes et mécanismes de régulation des aflatoxines. Des études sur la manipulation des gènes ont été largement portées sur le mécanisme de régulation moléculaire de la synthèse des aflatoxines à l'intérieur du champignon. Des succès importants ont été obtenus dans l'identification des gènes impliqués dans la biosynthèse des aflatoxines notamment les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 et la possibilité de leurs clonages pour une utilisation ultérieure comme "outils moléculaires" pour identifier les agents et les

composés qui peuvent agir comme inhibiteurs naturels dans les voies de la biosynthèse des aflatoxines (YU, 2012 ; BHATNAGAR-MATHUR *et al.*, 2015).

Enfin, on sait depuis longtemps que de nombreux produits naturels, notamment des huiles essentielles et extraits de plantes comestibles ou médicinales, ont des propriétés antifongiques. Ces plantes représentent une source inépuisable de composés naturels bioactifs. La littérature est riche en exemples d'inhibitions de la croissance ou de la synthèse de toxines par des produits d'origine végétale, particulièrement en ce qui concerne *Aspergillus*. Le girofle, l'ail, le gingembre, le poivre, les plantes aromatiques (menthe, sauge, laurier, origan), la moutarde, l'anis, le cumin et l'oignon sont des exemples de plantes produisant des substances antifongiques. Actuellement, ces produits ne sont pas utilisés à grande échelle pour protéger les cultures ; leur utilisation pour la protection des récoltes contre les toxines de stockage est un peu plus répandue (REDDY *et al.*, 2010).

Selon HOLMES *et al* (2008), les inhibiteurs de la biosynthèse des AFs agissent à trois niveaux: (1) modulent les facteurs physiologiques et environnementales affectant la biosynthèse de l'aflatoxine, (2) inhibent les circuits de signalisation des voies biosynthétiques, (3) inhibent directement l'expression des gènes ou l'activité des enzymes (figure 16)

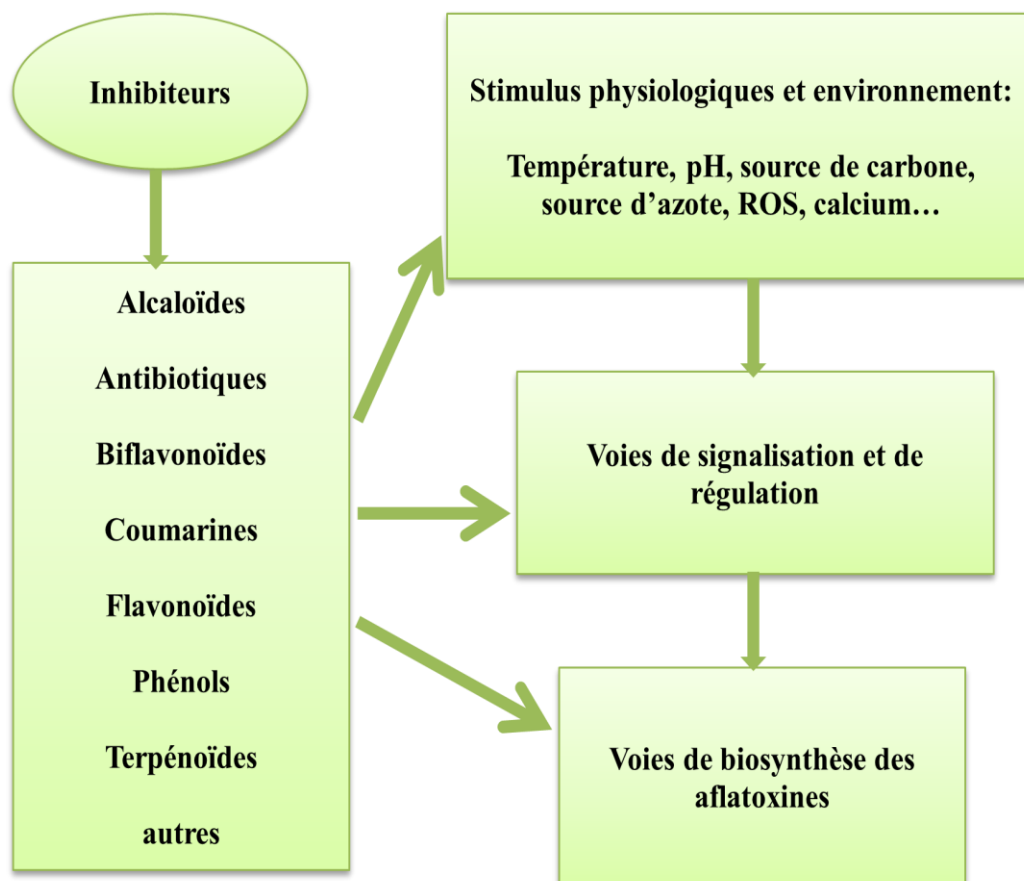


Figure 16: Représentation schématique des différents modes d'action potentiels des groupes majeurs d'inhibiteurs sur la production des aflatoxines (HOLMES *et al.*, 2008).

VI. Le diabète sucré

Il existe deux principaux types de diabète caractérisés par une mort progressive des cellules β du pancréas. Le diabète de type 1 connu sous le nom de diabète insulino-dépendant, et il est caractérisé par une production insuffisante d'insuline ce qui nécessite une substitution quotidienne par l'administration d'insuline. Ceci résulte d'un épuisement des cellules β du pancréas qui peut être la conséquence de plusieurs mécanismes physiopathologiques dont l'auto-immunité...etc. Le diabète sucré ou de type 2 (DT2) connu aussi sous le nom de diabète non-insulino-dépendant ou d'apparition adulte et il résulte de l'utilisation inefficace de l'insuline par l'organisme. Plusieurs facteurs de risque sont impliqués dans le développement du DT2: facteurs génétiques (antécédents familiaux), obésité, mauvaise alimentation, activité physique insuffisante, âge avancé, glycémie élevée pendant la grossesse, hypertension et dyslipidémie (OTA et ULRIH, 2017).

6.1. Caractéristiques du diabète de type 2

Le DT2 est une maladie métabolique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou que l'organisme ne peut utiliser de manière efficace l'insuline qui est produite. Il en résulte un état d'hyperglycémie chronique accompagné d'une perturbation du métabolisme glucidique, lipidique et protéique. Cette hyperglycémie chronique est associée, à des degrés divers, à des complications à long terme, touchant en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (CHAN et LEUNG, 2015). On peut diagnostiquer un individu comme étant diabétique lorsque sa glycémie à jeun est $\geq 7,0$ mmol/L (1,26 g/L) ou $\geq 11,1$ mmol/L (2 g/L) à 120 minutes suivant le test de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO). Une valeur d'hémoglobine glyquée (HbA1c) ≥ 6 % est également un critère de diagnostic de ce type de diabète (ADA,2010).

Cette maladie représente un problème de santé publique majeur de par ses proportions épidémiques ainsi que l'ampleur des complications microvasculaires et macrovasculaires associées à l'hyperglycémie chronique. Des complications microvasculaires (rétinopathie, néphropathie et neuropathie) sont déjà présentes chez environ 50 % des individus au moment du diagnostic (RIOBO SERVAN, 2013). Au niveau macrovasculaire, le risque d'infarctus du myocarde (JANSSON et *al.*, 2016), d'insuffisance cardiaque congestive, de maladies artérielles périphériques et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) est de 2 à 4 fois plus élevé chez les gens atteints de DT2 que chez les non-diabétiques (KELLY et *al.*, 2014). Les maladies cardiovasculaires représentent donc la principale cause de décès chez les patients atteints de diabète (LEON et MADDOX, 2015). Selon les projections de la fédération internationale du diabète (FID) 1 adulte sur 12 dans le monde est atteint de diabète, soit 425 millions d'individus. Cette proportion atteindra probablement 1 adulte sur 10 en 2040, soit 622 millions d'individus (FID, 2017). Le DT2 représente environ 90 % de tous les cas de diabète et l'augmentation de sa prévalence est liée à l'augmentation de la prévalence de l'obésité à travers le monde (OMS, 2016).

6.2. Mécanismes de l'absorption intestinale du glucose

Au cours d'un repas, les concentrations en glucose dans la lumière intestinale sont très élevées. SGLT-1 va ainsi permettre l'entrée du glucose (et du galactose) dans l'entérocyte, grâce au gradient électrochimique généré par le sodium fournissant l'énergie nécessaire (WRIGHT et *al.*, 2011). Cependant, des concentrations intra-luminales élevées de glucose

(30-50mM) entraînent une saturation de ce transporteur. Au-delà de ces concentrations, le glucose est alors absorbé par le transporteur GLUT2 (KELLETT et BROT-LAROCHE, 2005) (figure 16). La localisation apicale de GLUT2 est en partie contrôlée par l'activation d'une protéine kinase C (PKC), elle-même dépendante de SGLT-1 (MORGAN et *al.*, 2007). GLUT2 possède une grande capacité de transport, mais une affinité modérée pour le glucose (de l'ordre de 15 à 20 mmol/L et permet ainsi une absorption passive importante de glucose à des concentrations intra lumenales élevées (KELLETT et BROT-LAROCHE, 2005). Dans l'entérocyte, le glucose ainsi absorbé traverse ensuite la membrane basolatérale pour passer dans la circulation sanguine soit directement par diffusion facilitée grâce à GLUT2, soit à l'intérieur de vésicules du réticulum endoplasmique (KELLETT et BROT-LAROCHE, 2005) (figure 17).

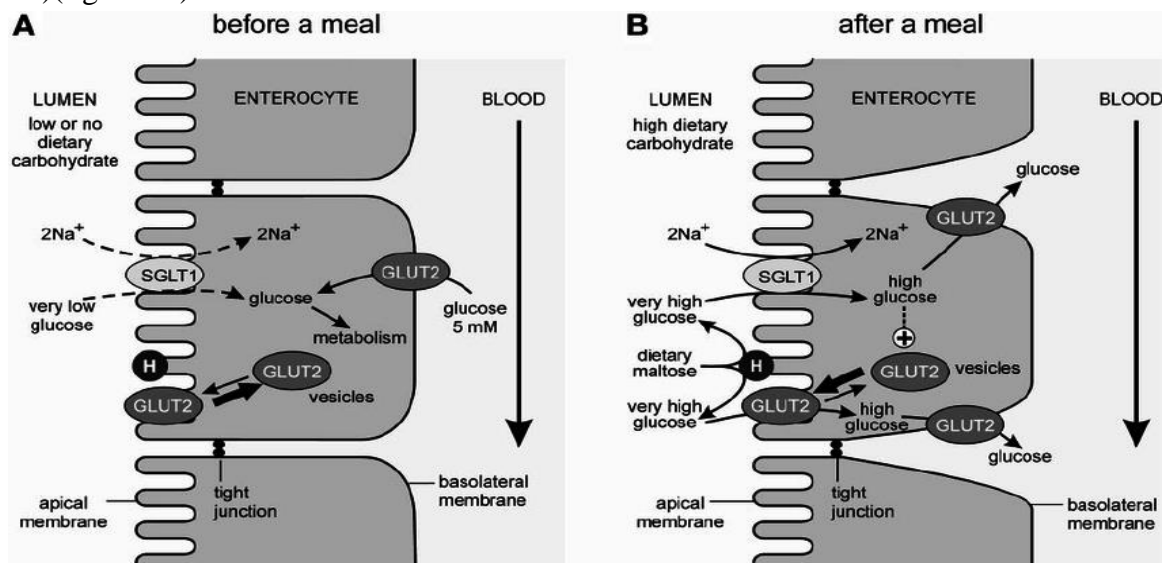


Figure 17: Régulation de l'absorption intestinale du glucose avant (A) et après un repas (B). Model proposé par KELLETT et BROT-LAROCHE (2005).

6.3. Modulation de l'absorption intestinale du glucose

L'existence de deux transporteurs de glucose intestinaux SGLT-1 et GLUT2 a été démontrée pour la première fois en 1934 par WERTHEIMER et *al.* Grâce à l'action de la phloridzine (ou phlorizine) un flavonoïde glucoside extrait des pommes inhibiteur de SGLT-1. Durant des épisodes de haute charge en glucose (par exemple, après un repas), les niveaux d'expression et d'activité de SGLT-1 et de GLUT2 sont élevés dans le cas du diabète, suggérant ainsi qu'ils pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse du diabète, car l'hyperglycémie postprandiale est associée à un risque accru de DT2 (CHAN et LEUNG, 2015). L'identification et la caractérisation des modulateurs ou régulateurs des transporteurs du glucose et leurs effets sur l'absorption de ce dernier au niveau intestinal est donc utiles pour le développement d'agents thérapeutiques potentiels ciblant spécifiquement ces modulateurs, visant ainsi l'amélioration de l'hyperglycémie diabétique au niveau de l'intestin grêle et de ce fait contribuer à la diminution de la charge du glucose postprandiale. En effet, il existe une large gamme d'hormones sécrétées par l'intestin et le pancréas qui modulent l'absorption intestinale du glucose. Les régulateurs potentiels identifiés et leurs mécanismes d'action proposés au niveau intestinal sont résumés dans le tableau XV et la figure 18.

Tableau XV : Résumé des facteurs régulateurs potentiels qui influencent sur l'absorption intestinale du glucose.

Facteurs régulateurs	Synthèse	Effets sur absorption de glucose	Implication du SGLT-1	Implication du GLUT2	Mécanismes proposés
Peptidiques:					
Insuline	les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas	$\uparrow\downarrow$	+	?	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression de SGLT-1 (SERHAN et KREYDIYYEH, 2010) et [?]GLUT2 <i>in vivo</i> chez les souris et <i>in vitro</i> avec les cellules intestinales humaines Caco2/TC7 (TOBIN et <i>al.</i>, 2008) ; • L'insuline diminue la régulation de l'activité du SGLT-1 chez les rats diabétiques induits par la streptozotocine (STZ) (KUROKAWA et ISHIBASHI, 1991) et [?] Inhibition de la voie de signalisation AMPc-PKA et expression de SGLT-1 chez les rats (WRIGHT et <i>al.</i>, 1997 ; WILLIAMS et SHARP, 2002).
Glucagon	Cellules α des îlots de Langerhans du pancréas et dans les cellules-L de l'intestin grêle.	\uparrow	+	N/A	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation de la libération de l'insuline, qui augmente l'absorption de glucose par SGLT-1 (QUESADA et <i>al.</i>, 2008) et augmentation du gradient électrochimique pour l'ion Na^+ (FOURNEL et <i>al.</i>, 2016). • Elévation de l'AMPc (BATAILLE et <i>al.</i> , 2004);

Glucagon-37 (l'oxyntomoduline)	synthétisé et sécrété par les cellules L. enteroendocrine	↑	+	N/A	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression des transporteurs intestinale du glucose. Mécanisme dépendant de l'AMPc (STÜMPEL et <i>al.</i>, 1997).
GLP-1 (glucagon-like peptide-1)	synthétisé et sécrété par les cellules L. enteroendocrine	↑	+	+/?	<ul style="list-style-type: none"> • La stimulation de l'absorption du glucose induite par le GLP-1 pourrait être médiée par des voies neuronales ou hormonales (SEINO et <i>al.</i>, 2016) • dépendantes de SGLT-1 et GLUT2 (SEINO et <i>al.</i>, 2016).
GLP-2 (glucagon-like peptide-1)	synthétisé et sécrété par les cellules-L enteroendocrine	↑	N/A	+/?	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression de GLUT2 au niveau iléale et de son activité chez le porc (CHEESEMAN et O'NEILL, 1998); • Voie dépendante du monoxyde d'azote ou l'oxyde nitrique (NO) (GUAN et <i>al.</i>, 2003).
GIP (gastric inhibitory polypeptide)	Cellules- K duodénales	↓	+/?	N/A	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la motilité intestinale (OGAWA et <i>al.</i>, 2011).
CCK (Cholécystokinine)	muqueuse du duodénum et jéjunale de l'intestin	↓	+	+	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction de l'expression de la protéine SGLT-1 indépendant de GLUT2 (HIRSH et CHEESEMAN, 1998); • Mécanisme dépendant de l'inhibition de la phosphorylation de PKA (COTE et <i>al.</i>, 2014).
Leptine	cellules adipeuses	↓	+	+	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la translocation du SGLT-1 cytosolique au niveau de MBB (DUCROC et <i>al.</i>, 2005); • Inhibition médiée par des isoformes de la PKC (DUCROC et <i>al.</i>, 2005); • Indirectement par stimulation de la sécrétion intestinale de CCK et de GLP1 (ANINI et BRUBAKER, 2003; GUILMEAU et <i>al.</i>, 2003).

Ang II (Angiotensine II)	synthétisée à partir de l'angiotensine I plasmatique	↓	+	+	<ul style="list-style-type: none"> • AngII se lie au récepteur de l'angiotensine I "AT1R" exprimé sur la MBB pour inhiber SGLT-1 via un mécanisme indépendant de GLUT2 (CASSELBRANT <i>et al.</i>, 2015) ; • Inhibition de SGLT-1 via l'inhibition de l'échangeur sodium-hydrogène 3 (NHE3) (CHAN et LEUNG, 2015).
Ang-(1-7) (Angiotensine III)	synthétisée à partir de l'angiotensine II plasmatique	↓	+	+	<ul style="list-style-type: none"> • Ang- (1-7) inhibe SGLT-1 (mais pas GLUT2) ; • ? Mécanisme dépendant de l'inhibition de la voie de signalisation de PKC via son récepteur membranaire "Mas" (WONG <i>et al.</i>, 2012).
Non-peptidiques:					
Epinephrine (adrénaline)	système nerveux central et les glandes surrénales	↑	N/A	N/A	<ul style="list-style-type: none"> • Action sur les β-adrénocepteurs (OYEBOLA <i>et al.</i>, 2011).
Norepinephrine (noradrénaline)	système nerveux central et les glandes surrénales	↑	N/A	N/A	<ul style="list-style-type: none"> • Mécanisme non exploré.
Niacine (vitamine B3 ou l'acide nicotinique)	se trouve principalement dans les volailles, le foie de veau et les céréales	↑	+	+	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'absorption intestinale du glucose dépendant de SGLT-1 et GLUT2 ? voie dépendante de l'AMPc (WONG <i>et al.</i>, 2015).
Polyphénols	Les plantes	↓	+	+	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition compétitive de SGLT-1 et de GLUT2 au niveau de la MBB (KOBAYASHI <i>et al.</i>, 2000 ; MARTEL <i>et al.</i>, 2010 ; CHAN et LEUNG, 2015)

? Des indices potentiels non confirmés pour une enquête plus approfondie ; **N/A** : Non étudié ; **NHE3** : L'échangeur sodium-hydrogène 3 (sodium-hydrogen exchanger 3) : transporteur membranaire antiport côté apical des entérocytes de l'intestin permettant l'entrée de Na^+ et la sortie de H^+ de la cellule ; **MBB** : Membrane intestinale en bordure en brosse

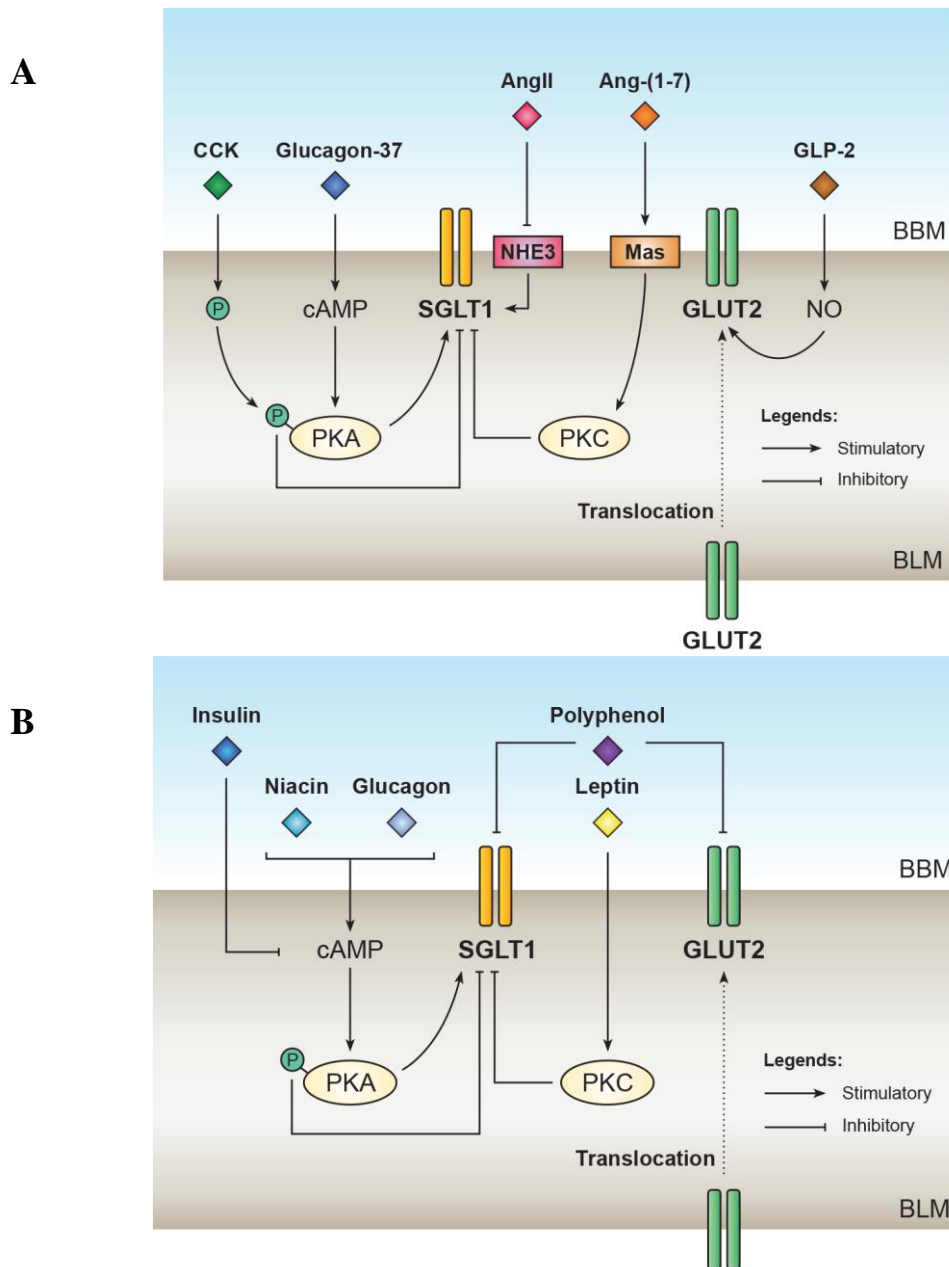


Figure 18: Représentation de quelques facteurs de régulation et des molécules de signalisation (A) et (B) impliquées dans l'absorption intestinale du glucose (CHAN et LEUNG, 2015). **BBM**: membrane de la bordure en brosse intestinale, **BLM** : membrane basolateral; **cAMP**, adénosine monophosphate cyclique ; **GLUT2** : transporteur du glucose 2, **PKA** : protéine kinase A : **PKC** : protéine kinase C; **SGLT-1** :co-transporteurs glucose sodium dépendant -1, **NHE3** : L'échangeur sodium-hydrogène 3 (sodium-hydrogen exchanger3), **CCK** :Cholécystokinine, **AngII**: Angiotensine II , **Ang (1-7)** : Angiotensine III, **GLP2** : glucagon-like peptide-1, **NO** : monoxyde d'azote , **Mas** : récepteur de Ang (1-7).

6.4. Traitements du diabète de type 2

Un bon contrôle glycémique du DT2 est recommandé pour retarder, voir prévenir la survenue et ralentir la progression des complications. Pour atteindre ces objectifs, plusieurs thérapies sont à notre disposition. Un régime alimentaire bien équilibré en glucides, en protéines et en lipides ainsi que l'exercice physique sont des composantes essentielles du traitement du diabète sucré (LEY et *al.*, 2014). Encore, l'insulinothérapie occupe une place importante dans l'arsenal thérapeutique du diabète de type 1 (GIN et REGALLEAU, 1999) et du DT2 (DIRCKX, 1998). Ce dernier nécessite chez la majorité des patients et surtout pendant les premiers stades, une prise en charge médicamenteuse et cela par l'intervention des hypoglycémiantes oraux qui sont classés selon leur mode d'action en trois catégories :

- Les sulfamides hypoglycémiantes corrigent le déficit de l'insulino-sécrétion par les cellules β du pancréas en potentialisant la réponse insulino-sécrétoire au glucose (DEY et *al.*, 2002).
- Les biguanides hypoglycémiantes classés en deuxième lieu n'agissent pas sur la sécrétion insulinaire, ce sont des potentialisateurs d'effets de l'insuline. Ils réduisent la glycémie basale et postprandiale en diminuant la production hépatique du glucose (inhibition de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse et favorisant la capture et l'utilisation périphérique du glucose principalement au niveau musculaire (augmente la sensibilité à l'insuline) (THULÉ, 2012).
- Les inhibiteurs des alpha-glucosidases intestinales constituent la troisième classe des hypoglycémiantes oraux. Ils atténuent la glycémie postprandiale par leur action directe comme agent inhibiteur des alpha-glucosidases intestinales en ralentissant la digestion des polysaccharides. L'absorption du glucose après un repas est ainsi retardée dans le temps (HERMANS, 1998).

Les traitements pharmacologiques sont nécessaires, mais souvent restent inadéquates pour prévenir l'incidence et les complications du DT2. L'activité physique, la perte de poids et le régime peuvent prévenir le diabète et ses complications. Les plantes utilisées dans l'alimentation contribuent également à retarder le délai d'apparition du DT2. En effet plusieurs études ont montrés que les plantes médicinales ont aussi des rôles bénéfiques pour diminuer les facteurs de risque associés aux complications diabétiques (GAIKWAD et *al.*, 2014 ; GOVERNA et *al.*, 2018)

6.5. Les composants phytochimiques à effets hypoglycémiantes

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires (AHARONI et GALILI, 2011). Il existe plus de 200000 métabolites secondaires (HARVEY et *al.* 2015), dont plus de 200 qui présentent une activité hypoglycémiantes (GAIKWAD et *al.*, 2014).

Ainsi un certains nombres de groupes, tels que des alcaloïdes, des saponines, des flavonoïdes, des glycosides, des polysaccharides, des peptidoglycanes, acides aminés et d'autres composés obtenus à partir de diverses sources végétales, semblent avoir des effets hypoglycémiantes importants dans le traitement du diabète notamment le DT2. Le tableau

XVI résume les importants phytoconstituants ayant des effets hypoglycémiant utilisés dans le traitement du diabète de type II.

Tableau XVI : Liste des importants phytoconstituants à effet hypoglycémiant

Phytoconstituants	Noms de la plante	Partie utilisée	Références
Alcaloïdes			
Berberine	<i>Berberis spp.</i> <i>Tinospora cordifolia</i>	Racines, écorces et tiges	WANG et al. (2015)
Causuarine 6-o- α -glucoside	<i>Syzygium malaccense</i>	écorces	SHEN et CHANG (2013)
Catharanthine, vindoline, vindolinine Vindogentianine	<i>Catharanthus roseus</i>	Feuilles, tiges, fleurs et racines.	TIONG et al. (2015)
Cryptolepine	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	Racines	AMEYAW et al. (2016)
Harmane, norharmane	<i>Tribulus terrestris</i>	Fruits	CHHATRE et al.(2014)
Jatrorrhizine, magnoflorine, palmatine	<i>Tinospora cordifolia</i>	Tiges	PATEL et MISHRA (2011)
javaberine A hexaacetate, javaberine B hexaacetate,	<i>Talinum paniculatum</i>	Racines	CATTHAREEYA et al. (2013)
Lepidine et semilepidine	<i>Lepidium sativum</i>	Graines	ATTIA et al. (2017)
Glycosides			
Jamboline or antimellin	<i>Syzygium cumini</i>	Graines	SWAMI et al. (2012)
Myrciacitrines I et II ; myrciaphenones A et B	<i>Myrcia multiflora</i>	Feuilles	MATSUDA et al. (2002)
Perlargonidine 3-o- α -1 rhamnoside	<i>Ficus bengalensis</i>	Écorce	GAYATHRI et KANNABIRAN (2008).
Vitexine, isovitexine et isorhamnetine 3-O- β -D-rutinoside	<i>Microcos paniculata</i>	Feuilles	CHEN et al. (2013)
Polyphénols			
Acide protocatechuique	<i>Sansevieria roxburghiana</i>	Feuilles	BHATTACHARJEE et al.(2017)
Acide syringique	<i>Alpinia calcarata roscoe</i>	Feuilles	SRINIVASAN et al. (2014)
Acide férulique	<i>Cimicifuga racemosa</i>	Racines	(OU et KWOK, 2004)
Hydroxytyrosol et Oleuropeine	<i>Olea europaea L.</i>	Feuilles	JEMAI et al.(2009)
Epigallocatechine-gallate	<i>Camellia sinensis</i>	Feuilles	WALTNER-LAW et al. (2002)

Hesperidine, naringine	<i>Citrus spp.</i>	Fruit	JUNG et al.(2004)
Kaempferitrine	<i>Bauhinia forficata</i>	Feuilles	JORGE et al.(2004)
Kaempférol	<i>Jindai soybean</i>	Feuilles	ZANG et al.(2011)
Quercétine	<i>Phyllanthus emblica L.</i>	Fruits	SRINIVASAN et al. (2017)
Térpenoïdes et stéroïdes			
α -amyrineacetate	<i>Ficus racemosa</i>	Fruits	NARENDER et al. (2009)
Charantine	<i>Momordica charantia</i>	Fruits	NKAMBO et al. (2013)
Acide corosolique,acide maslinique	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	Feuilles	MIURA et al. (2012)
Polysaccharides			
Pectines	<i>Ficus pumila</i>	Fruits	WU et al. (2017)
Gomme galactomannanes	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	Graines	SAEED et al. (2012)

2^{ème} Partie :

Partie expérimentale

Matériel & Méthodes

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude est réalisée au sein du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et une partie des activités biologiques comme l'activité hypoglycémiant a été réalisée au sein du centre de recherche sur l'inflammation (CRI) Université Paris Diderot. Faculté de Médecine Xavier Bichat. L'analyse chromatographique de l'extrait phénolique des margines et immunologique de l'aflatoxine B1 a été effectuée aux laboratoires *Agrobio, Groupe Qualtech* à Rennes, France.

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel non biologique

➤ Equipement et appareillage

Les appareils utilisés sont les suivants:

- Chromatographie Haute Performance (THERMO FISHER SYSTEM);
- Electrophorèse sur mini cuves verticales (HOEFFER SE 200) ;
- Evaporateur rotatif (IKA-DEST);
- Spectrophotomètre UV Visible (UV-1700 SCHIMADZU, Japon) ;
- pH mètre (HANNA-INSTRUMENTS) ;
- Autoclave de paillasse (PB INTERNATIONAL);
- Hotte à flux laminaire (GELAIRE BSB4A);
- Etuves (MEMMERT);
- Four pasteur (BINDER),
- Lampe UV 245nm-365nm (DESAGA)
- Speed Vac Plus Vacuum Concentrato (Savant SC110A-120, Thermo Scientific)
- Microscope photonique (MOTIC),
- Bain-Marie (MEMMERT);
- Centrifugeuses réfrigérée (max 28000 g, SIGMA);
- Microcentrifugeuse à eppendorfs (MSE, Microcenter, UK) ;
- Agitateurs (IKA, HANNA, HEIDOLPH HEI);
- Balances de précision (Denver Instrument, Capacity (g) : 230 g);
- Lecteur ELISA (Micro ELISA Reader (BIOTEK EL 311);
- Lyophilisateur (TELSTAR", Model LyoQuest -55);
- ACCU-CHEK (Roche Diagnostic; Meylan, France);
- Automate voltage clamp (DVC 1000, WPI, Aston (England) linked through a MacLab 8 to Mac Intosh computer);
- Ultracentrifugeuse TL-100, Beckman Coulter (France); homogénéisateur (Polytron,

Kinematica, Switzerland),

-Densitomètre utilisant le logiciel Image Janalysis program (National Institute of Health, USA).

➤ Produits, réactifs et Consommable

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, peroxyde d'hydrogène, réactif de Bradford, Sérum albumine bovine, Tween 80, acrylamide, N, N'-méthylène-bis-acrylamide, dodécyl sulfate de sodium, glycine, persulfate d'ammonium, réactif de Folin-Ciocalteu, composés phénoliques (acide caféique, hydroxytyrosol, tyrosol, acide gallique, acide cinnamique, acide coumarique, acide tannique et oleuropéine) Sigma-Aldrich (France). Chlorure de sodium, chlorure de calcium, chlorure de potassium, chlorure de magnésium, chlorure de fer, persulfate d'ammonium, sulfate d'ammonium, tartrate de sodium, bicarbonate de Sodium, carbonate de Sodium, phosphate de sodium, acétate de sodium, phosphate dipotassique, ferricyanure de potassium, bromure de potassium, sulfate de fer, sulfate de manganèse, sulfate de cuivre, Trizma-base.

-**Solvants** : Acide acétique, acide chlorhydrique, acide trichloroacétique, acide sulfurique, méthanol, acétate d'éthyle, hexane, chloroforme, éthanol, glycérol, DMSO) Merck (Germany).

-**Milieux de culture et réactifs spécifiques utilisées pour la partie microbiologique**: PDA : Pomme de terre, Dextrose, Agar ; CAM: milieu à base de noix de coco (Coconut Agar Medium) ; PDB: milieu à base de pomme de terre liquide (Potato Dextrose Broth) ; SMKY: Semi synthetic liquid medium. Kit ELISA (*Celer AFLA BI*) (MA220/MA221; *Tecna R & D•Diagnostics-Biotechnology*, Italy) les compositions des milieux de cultures et la référence du Kit ELISA (*Celer AFLA BI*) sont mentionnées dans l'annexe 5 et 6.

-**Réactifs spécifique pour l'activité hypoglycémiant** : Luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-pan PKC ($\alpha, \delta, \zeta, D/\mu$) (Cell Signaling Technology, Ozyme, France), SGLT-1 rabbit antibody (Millipore, France), mouse beta-actin antibody (Sigma, France).

-**Consommable** : Plaques CCM (20 x 20cm, 0, 20mm d'épaisseur) de gel de silice-60 254F (Macherey Nagel, Germany), verreries, micropipettes, micro-seringue Hamilton, filtres à 0,45 μm , papier Whatman N°1.

1.1.2. Matériel biologique

➤ Matériel végétal

○ Les margines

Les margines ayant fait l'objet de notre étude proviennent d'une huilerie moderne utilisant le système d'extraction à trois phases dans la région de Kabylie située dans la wilaya de Tizi-Ouzou. Celles-ci proviennent de la campagne oléicole 2010/ 2011. Les margines ont été recueillies dans des bouteilles en plastiques, acheminées rapidement au laboratoire, ces dernières ont subi une macrofiltration avec une passoire (\emptyset des pores > 5 μm) afin de se débarrasser des impuretés puis conservées dans des flacons en plastiques de 500 ml au congélateur à - 40 °C jusqu'à leurs utilisations (ESMAIL et al., 2015).

Afin d'étudier les activités anti-oxydante, antifongique et hypoglycémiantes des margines, les échantillons de margines ont subi une lyophilisation pendant 6 h afin d'obtenir la poudre de margines (PM).

○ **Le maïs**

Dix kg de grains de maïs (*Zea mays* L.) importés d'Argentine et destinés à la consommation humaine ont été étudiés. Un échantillon a été recueilli en juin 2015 sur le marché de Tizi-Ouzou. L'échantillon a été fractionné (200 g) et placé dans des sacs en papier, scellés et maintenus au réfrigérateur à + 4 °C jusqu'à son utilisation.

➤ **Matériel non végétale**

○ **La souche fongique testée**

La souche utilisée dans les tests fait partie des moisissures appartenant au genre *Aspergillus*. Il s'agit d'une souche de références aflatoxinogène nommée *A. flavus* (NRRL 3251T) fournie par le laboratoire de recherche de Biologie des systèmes microbiens (LBSM, ENS Kouba). La souche est conservée à -40 °C en présence du glycérol à 20 %. Le repiquage de la souche est effectué sur milieu PDA inclinée et sur boîte de Petri de 9 cm de Ø.

○ **Les cellules Mode K**

Établie à partir des cellules épithéliales de l'intestin grêle de jeunes souris C3H/HeJ fournie par l'unité cellulothèque IFR128 cell bank du laboratoire de recherche BioSciences Gerland - Lyon Sud.

○ **Les souris**

Les animaux d'expérience utilisés sont des souris mâles C57BL/6J âgées d'environ 4 à 6 semaines et pesant entre 20-24 g. Elles sont fournies par le Centre d'élevage Janvier situé à Le Genest-St Isle (France). Tous les animaux sont de statut sanitaire EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiques). Dès leur réception, les souris sont placées aléatoirement en groupe de 6 dans des cages standard pour une période d'acclimatation avant d'être utilisées dans les différentes expériences. Pendant cette période les animaux avaient un accès libre à l'eau et à de la nourriture standard et sont maintenues dans une animalerie à température constante (22 ± 2) °C. Les souris ont été traitées en accord avec les lois Européennes concernant l'usage d'animaux en laboratoire. (authorization protocol number: 02133.01).

1.2. Méthodes

1.2.1. Caractérisation physicochimique des margines

La caractérisation physicochimique des margines issues de l'huilerie utilisant le système de centrifugation à trois phases est basée sur l'étude des paramètres suivants :

L'acidité (pH), la conductivité, la matière sèche (MS), la teneur en eau (TE), la matière minérale sèche (MMS), la matière volatile sèche (MVS), la matière en suspension (MES), la matière grasse (MG), les polyphénols totaux, les sucres totaux (ST), les sucres réducteurs, et les protéines totales.

Avant de procéder au dosage des différents paramètres physicochimiques. L'échantillon de margine est filtré à l'aide d'une passoire et centrifugé (3000 g/min à 4 °C). Pour la détermination du pH, MS, TE, MMS, MVS, MES, l'échantillon de margine est utilisé sans subir de filtration ni de centrifugation.

1.2.1.1. Détermination du pH

L'acidité des margines est évaluée en mesurant le pH. Cette dernière mesure la concentration d'une solution aqueuse en protons en déterminant ainsi le degré d'acidité ou de basicité de la solution (BUCK *et al.*, 2002).

Après étalonnage du pH mètre, l'électrode de mesure est plongée dans un bécher contenant un volume de 100 ml de margines bien homogénéisées et le pH indiqué est noté (REJESEK, 2003).

1.2.1.2. Conductivité

La conductivité est la capacité d'une solution à faire passer le courant électrique. Elle est exprimée par microsiemens par centimètre ($\mu\text{S}/\text{cm}$) ou en millisiemens par centimètre (mS/cm) (ANONYME 6, 2013). Après étalonnage du conductimètre, la sonde est plongée dans un bécher contenant 100ml de margines bien homogénéisées.

La valeur donnée par le conductimètre correspond à la conductivité des margines en prenant en considération la température à laquelle la mesure a été faite, elle est exprimée en mS/cm (REJESEK, 2003).

1.2.1.3. Teneur en eau et en matière sèche

La matière sèche (MS) est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines (AISSAM, 2003). Elle est déterminée selon le protocole suivant :

Une capsule en porcelaine vide est pesée, 20 ml de margines sont introduites dans cette dernière et l'ensemble est pesé. La capsule contenant les margines est incubée dans une étuve à 105 °C jusqu'à obtention d'une masse constante. Après refroidissement, la teneur en matière sèche est déterminée (RODIER, 1996).

La teneur en matière sèche est calculée par la formule suivante :

$$[\text{MS}] \text{ (g/l)} = (\text{M}_2 - \text{M}_0)1000/\text{VE}$$

MS : Teneur en matière sèche (g/l).

M₀ : Masse de la capsule vide (g).

M₂ : Masse de la capsule et des margines après séchage (g).

VE : volume de margines (ml).

La teneur en eau (TE) est la proportion effective d'eau contenue dans les margines. Elle est déterminée par la formule suivante :

$$\text{TE}(\%) = (\text{M}_1 - \text{M}_2)100/ (\text{M}_1 - \text{M}_0)$$

TE : Teneur en eau.

M₀ : Masse de la capsule vide (g).

M₁ : Masse de la capsule et des margines avant séchage (g).

M₂ : Masse de la capsule et des margines après séchage (g).

1.2.1.4. Teneur en matière minérale et en matière volatile sèche

La teneur en matière minérale sèche ou cendres, est déterminée par perte de masse à partir de la matière sèche par l'incinération dans un four à moufle à 550 °C pendant 2 h (RODIER, 1996).

Après calcination, il y'a obtention des cendres blanches ou grises claires. L'échantillon est ensuite refroidi dans un dessiccateur et pesé dès qu'il atteint la température du laboratoire.

La teneur en matière minérale sèche est donnée par la formule suivante :

$$[\text{MMS}](\text{g/l}) = (\text{M3}-\text{M0})1000/\text{VE}$$

M0 : Masse de la capsule vide (g).

M3 : Masse de la capsule après calcination à 550 °C (g).

VE : Volume de margines (ml).

La matière volatile sèche représente la fraction organique de la matière sèche qui disparaît au cours de la calcination de cette dernière à 550 °C. Elle est déterminée en faisant la différence entre les concentrations de la MS et de la MMS et représentée par la formule suivante :

$$[\text{MVS}](\text{g/l}) = [\text{MS}]-[\text{MMS}]$$

1.2.1.5. Teneur en matière en suspension

La matière en suspension correspond à des particules de faibles tailles et/ou de faible densité, ce qui limite leur chute par gravité. Elle est obtenue soit par filtration sur une membrane poreuse de 0,45 µm, soit par centrifugation (2800 à 3200 g/15min).

La teneur en MES des margines est déterminée selon le protocole suivant :

Après centrifugation de 100 ml de margines à une vitesse de 3200 g/15 min, le liquide surnageant est séparé par aspiration à l'aide d'une pipette en verre sans perturbation du dépôt, puis le culot déposé au fond du tube à centrifuger est transvasé dans une capsule en porcelaine préalablement séchée et pesée. Le tube à centrifuger est aussi rincé à l'eau distillée et les eaux de lavage sont recueillies avec le culot dans la capsule puis sécher à l'étuve à 105 °C jusqu'à obtention d'une masse constante. Après refroidissement au dessiccateur, la capsule est à nouveau pesée. Les opérations de séchage sont recommencées, refroidissement et pesées jusqu'à stabilisation entre deux pesées successives (RODIER, 1996).

La teneur en MES est calculée par la formule suivante :

$$[\text{MES}] (\text{g/l}) = (\text{M1}-\text{M0})1000/\text{VE}$$

M0 : Masse de la capsule vide (g).

M1 : Masse de la capsule pleine après dessiccation à 105 °C (g).

VE : Volume de margines (ml).

1.2.1.6. Teneur en matière grasse

La matière grasse (MG) constitue un groupe hétérogène, dont la propriété commune est d'être insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques.

La teneur en matières grasses des margines a été estimée par dosage colorimétrique décrit par KNIGHT et *al.* (1972).

1.2.1.6.1. Estimation de la teneur en matière grasse par dosage colorimétrique

Le dosage colorimétrique des lipides a été effectué selon KNIGHT et *al.* (1972), cette méthode utilise un réactif à base de phospho-vanilline et d'acide sulfurique (annexe 1), et une solution mère de lipide ou d'acide gras (0,3 mg/ml) dilué dans du chloroforme comme standard.

Dans des tubes à essais nous mesurons 0,1 ml de chaque échantillon de margine ou étalon, auxquels on rajoute 5 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄, 98 %) à l'aide d'une burette ou pipette graduée. Agiter puis chauffer au bain marie à 100 °C pendant 10 min. Après refroidissent 0,4 ml de chaque tube ont été prélevé puis on rajoute 6 ml de réactif de phospho-vanilline (Annexe 1). Après 45 min d'incubation à température ambiante, une coloration rose apparaît dont l'absorbance a été mesurée à 525 nm au spectrophotomètre UV visible contre un blanc (sans lipides). Les échantillons à doser et la gamme étalon ont été préparés de la même manière et dans les mêmes conditions.

La concentration de lipides est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide oléique [0-300] µg/ml (annexe 1).

1.2.1.7. Teneur en polyphénols

1.2.1.7.1. Extraction des polyphénols

Le protocole d'extraction des polyphénols à partir des margines est basé sur la méthode décrite par DE MARCO et *al.* (2007) dont les principales étapes sont résumées dans le diagramme représenté par la figure 19. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide avec un solvant polaire (acétate d'éthyle) après une étape d'acidification des margines brutes avec de l'HCl (4 N) à pH 2 suivie d'une étape de délipidation avec un solvant apolaire (hexane) dont le but d'éliminer la matière grasse. L'acidification est une étape très importante pour la précipitation des protéines et la rupture des liaisons établies entre les composés phénoliques aux composants des parois cellulaires ainsi que l'hydrolyse des phénols complexes en phénols simples (DE MARCO et *al.*, 2007).

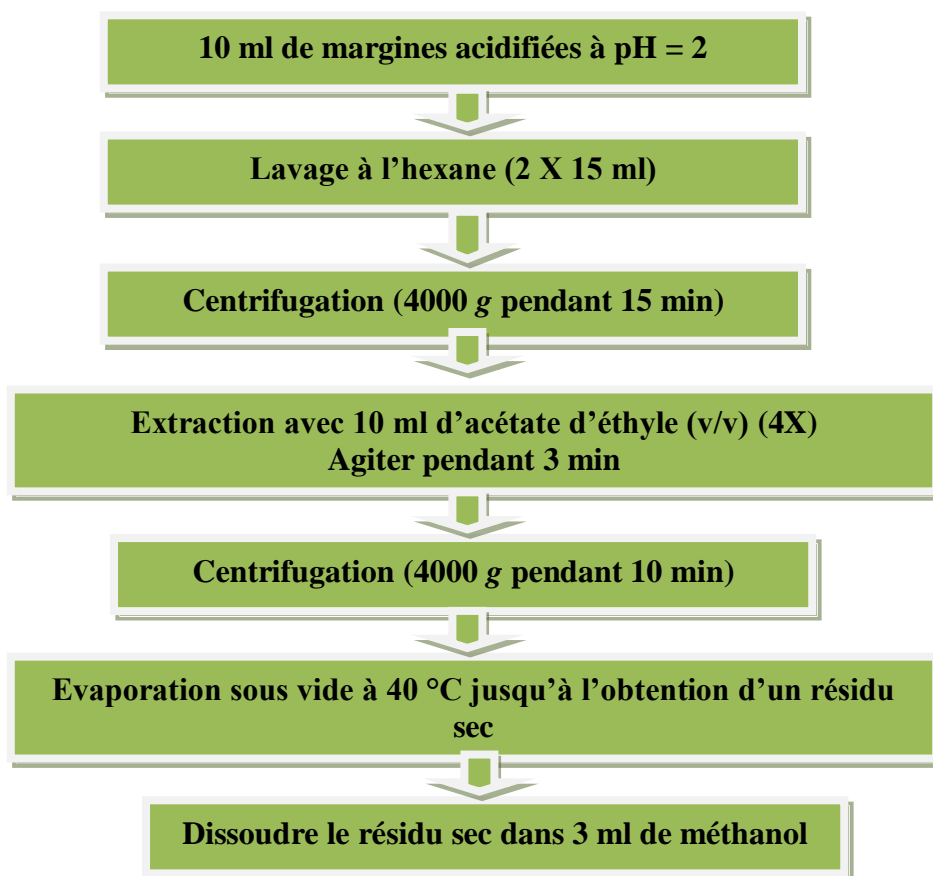


Figure 19: Diagramme d'extraction des polyphénols à partir des margines (DE MARCO et al., 2007).

1.2.1.7.2. Détermination de la teneur en polyphénols

La teneur en polyphénols a été estimée par méthode de Folin-Ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965), qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) et phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (CICCO et al., 2009). Les solutions de l'échantillon à doser et la gamme étalon ont été préparées de la même manière et dans les mêmes conditions (annexe 2) :

125 μ l de chaque dilution de l'extrait phénolique de margines ont été mesurés, auxquels on rajoute 500 μ l d'eau distillée puis 125 μ l du réactif de Folin. Six minutes plus tard un volume de 1,25 ml de la solution aqueuse de carbonate de sodium ($NaCO_3$) à 20 % est additionné au milieu réactionnel (dont la préparation est mentionnée dans l'annexe 2) puis on complète à 3 ml avec l'eau distillée après avoir bien agité.

Après 60 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 760 nm au spectrophotomètre contre un blanc sans extrait. La quantification des composés

phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de la forme $y = ax$, réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence. Les résultats seront donc exprimés en équivalents d'acide gallique. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0 – 100 µg/ml) (annexe 2).

1.2.1.7.3. Séparation et identification des composés phénoliques par HPLC

L'analyse des composés phénoliques après extraction a été effectuée sur un système HPLC-UV (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®) muni d'un détecteur UV à 280 nm. Une colonne type phase inverse Hypurity, C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm a été utilisée pour l'analyse des polyphénols. Le système solvant utilisé est composé d'un gradient de solvant A (eau: acide trifluoroacétique) (90:10, v / v) et solvant B (acétonitrile: méthanol) (80:20, v / v).

Le gradient d'élution est réalisé selon le programme indiqué dans le tableau XVII, avec un débit de 1 ml / min et le volume d'injection était de 20 µl. Les composés phénoliques ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention par rapport aux standards phénoliques. L'échantillon est dissous dans le méthanol puis filtré avec un filtre millipores (0,45 µm). La teneur totale en composés phénoliques extraits des margines a été déterminée à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu (SINGLETON et ROSSI, 1965). L'absorption à une longueur d'onde de 760 nm a été déterminée avec un spectrophotomètre. Les données sont exprimées en équivalents (Eq) d'acide gallique (g d'acide gallique/ 100 g de margine).

Tableau XVII : Gradients d'élution pour l'analyse HPLC

Temps (min)	A (%)	B (%)
6	35	65
9	60	40
14	80	20
25	100	0
30	35	65

1.2.1.8. Teneur en sucres totaux

Les sucres totaux ont été dosés par la méthode de DUBOIS et *al.*(1956). Tous les sucres réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orangée stable. Dans chaque tube à essai 2 ml de la dilution de l'échantillon plus 1ml de la solution phénol à 5 % et 5 ml de d'acide sulfurique à 96 % avec une bonne agitation.

Après 10 min d'incubation à température ambiante, et une autre incubation dans un bain marie à 30 °C jusqu'à apparition d'une couleur jaune-orangée, L'absorbance a été mesurée à 492 nm au spectrophotomètre UV-Visible contre un blanc. Les échantillons et la gamme étalon sont préparés de la même manière et dans les mêmes conditions. La teneur en sucres totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec une solution de glucose [0 – 50] µg/ml représenté en annexe 3.

1.2.1.9. Dosage des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs (en raison de leur groupement carbonyle libre C=O), en milieu alcalin et chaud, permettent de réduire l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune en acide 3-amino-2-hydroxy-5-nitrosalicylique (rouge orangé).

Les sucres réducteurs ont été dosés par la méthode de MILLER (1959). Les sucres réducteurs (en raison de leur groupement carbonyle libre C=O), en milieu alcalin et chaud, permettent de réduire l'acide 2,3-dinitrosalicylique (DNS) dont la composition du réactif est donnée en annexe en acide 3-amino-5-nitrosalicylique.

Le produit de la réaction au milieu basique développe une coloration jaune orangé avec un pic d'absorption à 540 nm. L'échantillon à doser a été dilué convenablement de façon à obtenir une concentration en sucres réducteurs voisine de 1 g/L. À 1 ml de cette dilution, on a ajouté 1 ml de réactif au DNS. Le mélange a été porté à ébullition pendant 5 min et refroidi homogénéisé au vortex, et la densité optique a été lue à 540 nm. La courbe d'étalonnage a été réalisée avec une solution de glucose de 0 à 1 g/L (annexe 3).

1.2.1.10. Teneur en protéines

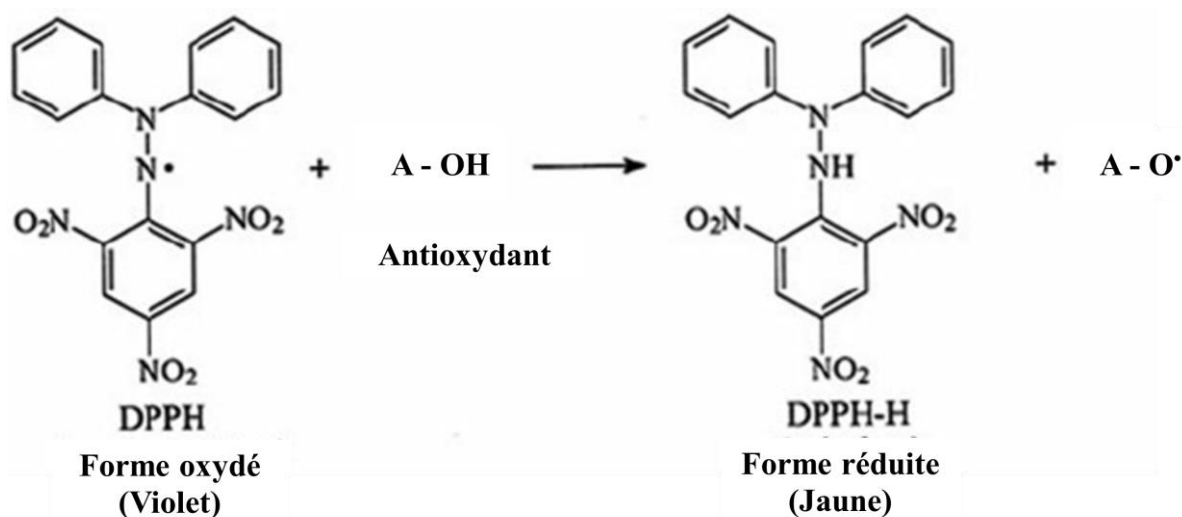
La teneur en protéines des margines a été estimée par la méthode de Bradford dont le principe est la fixation du réactif de Bradford sur la protéine en formant un complexe (colorant-protéine) de couleur bleue (BRADFORD, 1976).

Dans chaque tube à essai on met, 1 ml de l'échantillon et 5 ml du réactif Bradford dont la préparation est mentionnée dans l'annexe 4. Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 595 nm au spectrophotomètre UV-Visible contre un blanc. Les échantillons et la gamme étalon sont préparés de la même manière et dans les mêmes conditions. La teneur en protéines est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la BSA [0 – 40] µg/ml (annexe 4).

1.2.2. Analyse du pouvoir antioxydant de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

1.2.2.1. Test du piégeage du radical DPPH•

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH• est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, anti-oxydante, il y'aura formation de la forme réduite (Figure 20). Ceci provoque le changement de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).



**Figure 20 : mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH
(BRAND-WILLIAMS et al., 1995)**

L'effet piègeur ou le pouvoir anti-radicalaire des échantillons étudiés vis-à-vis du radical DPPH• est évalué selon la méthode décrite par BRAND-WILLIAMS et al. (1995). Les mélanges réactionnels contenant 100 µl de chaque échantillon avec les concentrations suivante préparées dans le méthanol (10-100 µg/ml), d'échantillon et 2 ml de solution de DPPH• (6x10⁻⁵ MDPPH, dissous dans le méthanol, préparée le jour de l'analyse) ont été incubés 60 min à l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 515 nm contre un blanc sans extrait.

L'acide ascorbique et le Trolox ainsi que l'acide gallique et caféique ont été utilisés comme antioxydants standards. L'étude de la variation de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50 % d'inhibition (IC50), plus la valeur de IC50 est faible ce qui correspond aussi à une faible absorbance plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libre. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH donné par la formule suivante :

$$\text{IC 50 \% (DPPH}\bullet\text{)} = [(A_C - A_E)/A_C] \times 100$$

Avec : **IC 50 % (DPPH•)**: pourcentage (%) de l'activité anti-radicalaire ;

A_E: absorbance de l'échantillon ou standard testes ;

A_C: absorbance du control sans extrait.

La concentration efficace (EC50) qui est la concentration d'extrait, du produit brut ou de l'antioxydant standards responsable de 50 % d'inhibition des radicaux DPPH• présents dans le milieu réactionnel, est déterminée un graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations des échantillons testés ou des antioxydants standards utilisés.

1.2.2.2. Test du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (RP)

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire de fer ferrique (Fe) en fer ferreux (Fe²⁺) établit par OYAIKU (1988). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique de l'action anti-oxydante des polyphénols. Elle consiste à mélanger 1 ml de chaque solution de PM et d'EPM ou de l'antioxydant standard (Trolox, acide ascorbique) à différentes concentrations (0 -50 µg /ml) avec 1 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 1 ml d'une solution de ferricyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] à 1 %). Le mélange obtenu est incubé à 50 °C pendant 20 min, puis 1 ml d'acide trichloroacétique (CCl₃COOH) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Le mélange est centrifugé à 2000 g pendant 10 min. À 1 ml du surnageant sont additionnés 1 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure de fer (FeCl₃) à 0,1 %. Le milieu réactionnel est incubé à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance du mélange réactionnel est lue à 700 nm contre un blanc qui contient tous les réactifs sauf le FeCl₃.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. L'étude de la variation de l'activité réductrice du fer en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50 % d'inhibition (IC50), plus la valeur de IC50 est faible, plus l'extrait a un pouvoir réducteur important ; l'IC50 est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

L'activité de l'extrait est comparée à celle des antioxydants synthétique (acide ascorbique, et le Trolox).

Le pouvoir réducteur du fer des échantillons testés par rapport aux standards utilisés est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = [(A_0 - A_1/A_0)] \times 100$$

A₀ : Absorbance de FeCl₃.

A₁ : Absorbance de FeCl₃ en présence de l'extrait ou standard.

1.2.2.3. Test du piégeage du radical ABTS^{•+}

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cationique ABTS^{•+}, (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique), en réagissant avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), l'ABTS forme le radical ABTS^{•+}, de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant provoque la réduction de ce radical et ainsi la décoloration du mélange réactionnel (figure 21). La décoloration du radical, mesurée par spectrophotométrie à 734 nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydants. Ce test est utilisé dans beaucoup de laboratoires pour l'étude de l'activité anti-oxydante car le radical ABTS^{•+} réagit rapidement avec les antioxydants et peut être utilisé sur

une large gamme de pH. Le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ est formé par arrachement d'un électron (e^-) à un atome d'azote de l'ABTS. En présence d'un antioxydant donneur de H^+ , l'atome d'azote concerné piège un H^+ , conduisant à l' $ABTS^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

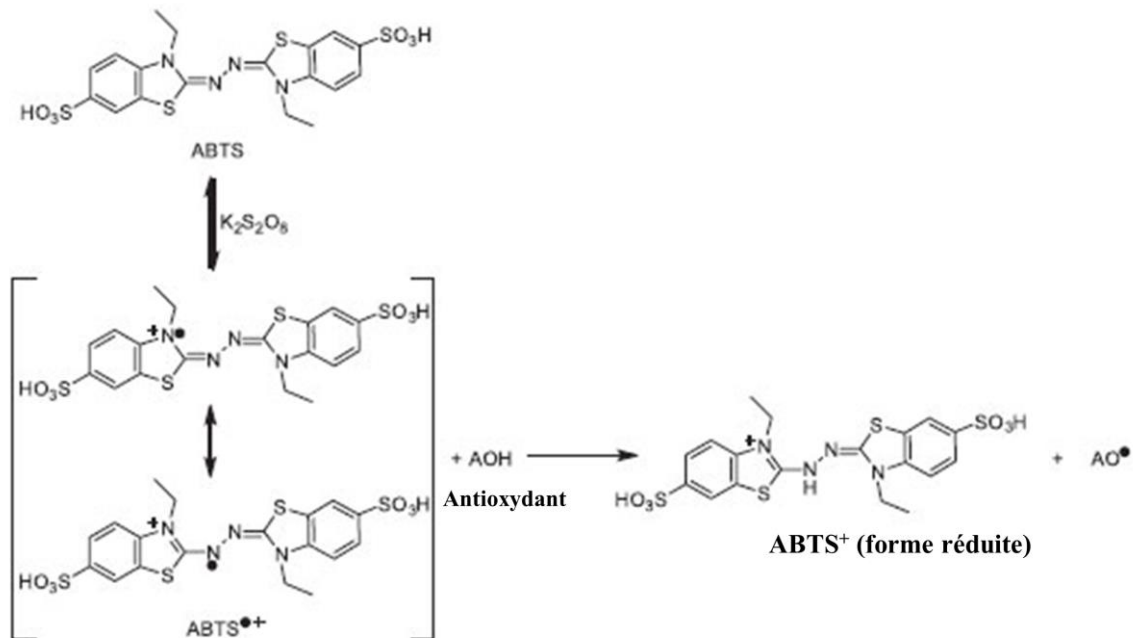


Figure 21: Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le radical $ABTS^{\bullet+}$ (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Le protocole utilisé est adapté selon la méthode d'ARNAO et al. (2001). Une solution mère d'ABTS stable est préparé en mélangeant 7,4 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2,6 mM de persulfate de potassium. Le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 heures. Pour la réaction une quantité de cette solution 0,9 ml est ensuite dilué avec l'éthanol (1 ml) afin d'obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,05$ à 734 nm. À 950 μL de cette solution, 50 μL de chaque solution PM ou d'EPM (20 $\mu g/ml$) ou standards (acide ascorbique et Trolox) à la même concentration sont ajoutés, après 1, 3 et 6 min on note l'absorbance obtenue à 734 nm, en se référant à un témoin sans extrait. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (PI) du radical $ABTS^{\bullet+}$ donné par la formule suivante :

$$PI (ABTS^{\bullet+}) = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Avec : **PI ($ABTS^{\bullet+}$)** : pourcentage (%) d'inhibition (capacité du piégeage du radical)

A_E : absorbance de l'échantillon ou standard testés.

A_C : absorbance du contrôle sans extrait.

1.2.3. Etude de l'activité antifongique de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

Cette partie est consacrée à l'étude de l'effet de la poudre (PM) et de l'extrait phénolique des margines (EPM) sur la croissance, la sporulation et la production des aflatoxines par *Aspergillus flavus*

1.2.3.1. Traitement des margines brutes

Les margines sont sous forme liquide. Afin de les concentrer sous forme d'une poudre, elles ont subi le procédé de lyophilisation suivant :

Une quantité de 15 ml de margines est déposée dans des plateaux en aluminium réservés à cet effet. Après une congélation de 24 heures, une lyophilisation a été réalisée pendant une durée de 6 heures jusqu'à l'obtention d'une poudre. Après grattage, la poudre de margines est récupérée dans des boîtes stériles et conservée à + 4 °C.

1.2.3.2. Préparation de l'inoculum

Pour la standardisation de l'inoculum de départ, une méthode photométrique (ATWAL, 2003 ; OMS, 2008) a été employée. A partir d'une culture de moisissure pure sur milieu PDA, les spores sont raclées à l'aide d'une anse, l'anse est déchargée dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 % additionnée de 0,1 % de Tween-80 stérile selon la méthode de LOPPEZ-MALO et *al.* (2005). La suspension de spores est homogénéisée, l'opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland où à une densité optique comprise entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm. La densité mesurée est équivalente à 1×10^8 spores/ml. L'inoculum peut être ajusté s'il est trop dense avec de l'eau physiologique stérile. À partir de là, on effectue une série de dilutions afin d'obtenir la charge de spores voulue pour les essais.

La densité de spores peut être aussi confirmée par comptage sur cellule de Malassez (OMS, 2008).

1.2.3.3. Tests préliminaires

1.2.3.3.1. Etude du pouvoir producteur d'Aflatoxines sur milieu CAM et par chromatographie sur couche mince

Le criblage de la souche *Aspergillus flavus* productrice d'aflatoxines est réalisé par détection de fluorescence à 365 nm sur le milieu de culture CAM à base de noix de coco dont la composition est décrite en annexe 5, selon la technique décrite par DAVIES et *al.* (1987) et FENTE et *al.* (2001). La souche fongique (10 µl) estensemencée par piqure central sur milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM), favorable à la production d'aflatoxines (FENTE et *al.*, 2001). Dans le milieu CAM, les aflatoxines, combinées aux matières grasses de la noix de coco, donnent une fluorescence visible sous lumière UV (365 nm) surtout sur le revers de la colonie (DAVIES et *al.*, 1987). En effet, après 48 à 72 h d'incubation à 28°C, les souches productrices d'aflatoxines développent autour de la colonie une fluorescence bleue et verte respectivement, visible sous la lumière UV (365 nm) et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour. La confirmation de la production des aflatoxines est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM). Après une culture de 7 jours sur milieu CAM, 6 disques de 6 mm de diamètre (environ 0,5 g) de milieu colonisé par le mycélium sont découpés à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée, pesés puis écrasés à l'aide d'une spatule. Les aflatoxines sont extraits avec 1 ml de méthanol dans des eppendorfs. La macération dure 1 à 2 heures et à l'abri de la lumière, les extraits sont

obtenus après centrifugation des échantillons à 14500 g pendant 15 minutes. Les surnageants (extraits) sont récupérés puis conservés à +4 °C.

1.2.3.3.2. Détection des aflatoxines par CCM

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire, en se basant sur le phénomène d'adsorption et de partage. La méthode utilisée pour la détection des aflatoxines par CCM est celle décrite par l'A.O.A.C (Official Method of Analysis). Des plaques (20 x 20 cm, 0,20 mm d'épaisseur) de gel de silice-60 254F ont été utilisées. Le solvant de développement est un mélange de Chloroforme/Acétone (90/10, v/v) (CALVO et *al.*, 2004). Des fractions de 20 µl sont appliquées soigneusement en évitant d'abimer la surface de chaque plaque. Ces précautions sont importantes pour l'obtention d'une bonne qualité de séparation des aflatoxines. Le développement des chromatogrammes est effectué dans une cuve de développement (25 x 25 x10 cm) préalablement saturée avec le système de solvant de développement.

Après migration, les plaques sont retirées et séchées. Les aflatoxines sont détectées en plaçant les plaques sous lumière UV à 365 nm (SRIVASTAVA et *al.*, 2008). Les aflatoxines B apparaissent sous forme de tache bleue. Une comparaison des rapports frontaux (Rf) des extraits avec ceux des témoins et de l'intensité de la fluorescence des taches permet de confirmer la présence d'aflatoxines et d'apprécier les quantités produites. L'observation des plaques sous UV à 365 nm permet de visualiser l'aflatoxine B sous forme d'une tache bleue.

1.2.3.4. Tests antifongiques et anti-aflatoxinogènes « *in vitro* »

1.2.3.4.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice, biomasse et nature de l'activité de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la biomasse ont été déterminées selon la méthode SRIVASTAVA et *al.* (2008). Des quantités requises de PM et d'EPM ont été rajoutées séparément dans le milieu SMKY dont la composition est décrite en annexe 5 de façon à obtenir les concentrations finales de 2, 4, 6, 8 et 10 g/L pour la PM, et des concentrations finales de 50, 125, 250, 400 et 500 mg/L pour l'EPM. Le volume final de milieu SMKY dans chaque erlenmeyer a été de 25 ml. 02 gouttes de Tween-80 ont été additionnées au milieu. Les erlens ont été aseptiquement inoculés avec un disque de 5 mm de diamètre d'une culture de 7 jours d'*Aspergillus flavus* effectuée sur milieu PDA. Des témoins sans PM et sans EPM ont été effectués, les essais ont été répétés trois fois. L'incubation a été réalisée à 28 °C pendant 7 jours.

La CMI correspond à la première concentration à partir de laquelle aucune croissance fongique n'est observée. Une substance naturelle est dite fongicide lorsqu'elle tue la moisissure et fongistatique lorsqu'elle inhibe sa croissance (MOHAMMEDI et *al.*, 2010).

Pour la détermination de la biomasse sèche par poids sec a été effectuée pour les concentrations testées de la PM ainsi que les EPM, le contenu des erlens est filtré avec un papier filtre Whatman N°01. Les mycéliums ont été lavés trois fois avec de l'eau distillée, séchés à 105 °C, jusqu'à poids constant (DELGADO-VIRGEN et GUZMAN-DE-PEÑA, 2009).

1.2.3.4.2. Détermination de l'activité anti-aflatoxinogène sur milieu SMKY

L'activité anti-aflatoxinogène a été déterminée selon la méthode de SRIVASTAVA et *al* (2008). Des quantités requises de PM et d'EPM ont été rajoutées séparément dans le milieu SMKY de façon à obtenir les concentrations finales de 2, 4, 6, 8 et 10 g/L pour la PM, et des concentrations finales de 50, 125, 250, 400 et 500 mg/L pour l'EPM. Le volume final de milieu SMKY dans chaque erlenmeyer été de 25 ml. 02 gouttes de Tween-80 ont été additionnées au milieu. Les erlens ont été aseptiquement inoculés avec un disque de 5 mm de diamètre d'une culture de 7 jours d'*Aspergillus flavus*. Des témoins sans PM et sans EPM ont été effectués, les essais ont été répétés trois fois et l'incubation est réalisée à 28 °C pendant 7 jours.

1.2.3.4.2.1. Extraction des aflatoxines à partir du milieu SMKY

L'extraction des AFB1 a été effectuée selon la méthode de NABNEY et NESBITT (1965). Le contenu des erlens sont récupérés et mis dans des tubes coniques de 50 ml contenant 20 ml de méthanol (HUYBRECHTS et *al.*, 2013) puis écrasés à l'aide d'une spatule. La macération dure 3 heures et à l'abri de la lumière. Les extraits méthanoliques d'aflatoxines sont obtenus après centrifugation des échantillons à 4000 g pendant 20 min et ont subi une évaporation sous vide à 50 °C. Les résidus secs obtenus sont redissous dans 2 ml de méthanol, filtrés à l'aide de microfiltres de 0,45 µm (Millex-HP Syringe Filter Unit, Millipore Corporation, USA) et conservés à +4 °C dans des eppendorfs pour l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) et par la technique d'ELISA directe compétitive. Ces étapes sont effectuées à l'abri de la lumière. Le diagramme de ces étapes est donné par la figure 21.

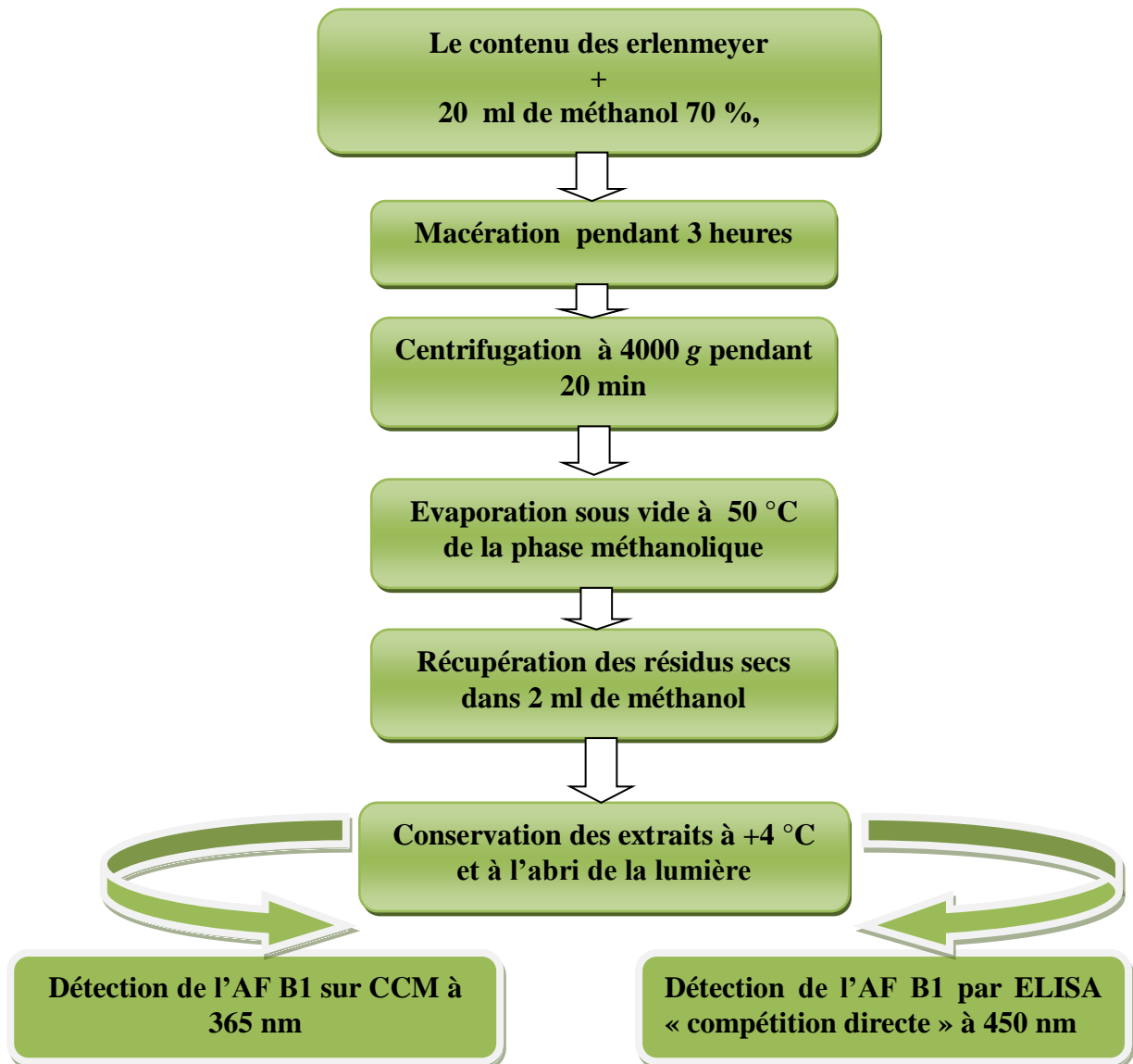


Figure 22 : Diagramme d'extraction des aflatoxines à partir du milieu liquide (SMKY) contaminés par *Aspergillus flavus*

1.2.3.5. Tests antifongiques et anti-aflatoxinogènes « *in situ* »

1.2.3.5.1. Tests préliminaires

BURT (2004) a suggéré après plusieurs études effectués sur les substances naturelles bioactives, que les valeurs des CMIs obtenues « *in vitro* » doivent être affectées d'un coefficient correcteur allant de 2 à 100, pour qu'elles aient le même effet dans une matrice alimentaire. Le choix du coefficient correcteur a été établi après avoir procédé à des tests préliminaires. Nous avons jugé utile de multiplier les valeurs des CMIs, par un coefficient de 2. Les tests préliminaires ont permis d'optimiser les concentrations de PM et de l'EPM à utiliser et enfin le choix de la matrice alimentaire à contaminer et qui est représentée dans cette étude par le maïs.

1.2.3.5.2. Choix de la matrice alimentaire

Aspergillus flavus est le principal agent de contamination du maïs (BATTILANI et al., 2016). Les conditions spécifiques de la température, de l'humidité relative et de la teneur en eau présentent lors du stockage de maïs peuvent contribuer à sa détérioration rapide, suite à la croissance fongique. La présence des micromycètes pourrait être attribuée essentiellement à la contamination du maïs par des espèces d'*Aspergillus* (PITT et HOCKING, 2009). Ces dernières peuvent provoquer la décoloration des grains, le changement de leurs caractéristiques chimiques et nutritionnelles, la réduction de la germination et leurs contaminations par des mycotoxines (FRANZOLIN, 1999).

1.2.3.5.3. Traitement du maïs

1.2.3.5.3.1. Méthode de détermination de l'humidité

La mesure de l'humidité de l'échantillon a été effectuée sur une prise d'essai de 10 g de grains de maïs ou de maïs broyé, pesée et mise dans un humidimètre infrarouge réglée à une température de 130 °C pendant 10 à 12 min (SULTANA et al., 2015). L'humidité en pourcentage (%) est affichée sur l'écran de l'humidimètre.

1.2.3.5.3.2. Ré-humidification du maïs

Pour cette expérience, pour obtenir des grains de maïs ou un maïs broyé avec une humidité à 30%, il a été nécessaire de ré-humidifier les grains de maïs ou le maïs broyé en ajoutant une quantité d'eau distillée selon la formule suivante :

$$X = 100 (H_f - H_i) / (100 - H_f)$$

X : Quantité d'eau distillée en ml à ajouter pour 100 g de maïs.

H_f : Humidité finale du maïs (30 %)

H_i : Humidité initiale du maïs

Les grains de maïs ont été trempés dans de l'eau distillée stérile pendant environ 24 h, à température ambiante (25 °C). Le maïs doit reprendre l'apparence et la consistance d'un maïs naturellement humide (SULTANA et al., 2015).

1.2.3.5.3.3. Broyage et stérilisation du maïs

Les grains de maïs ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à leur réduction. L'échantillon de maïs broyé, a été conditionné dans des bocaux en verre fermés hermétiquement est autoclavés à une température de 120 °C pendant 20 min.

Cette stérilisation a pour but d'éviter des signes de contamination (SULTANA *et al.*, 2015).

1.2.3.5.4. Effet antifongique et anti-aflatoxinogène de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur le maïs broyé et contaminé par *Aspergillus flavus*

Dans cette expérience le choix s'est porté sur une humidité de 30 % (HESSELTINE *et al.*, 1976), l'humidité initiale des grains de maïs était de 11,5 %. Afin d'atteindre cette humidité, des concentrations appropriées de PM et d'EPM ont été préparées dans de l'eau distillée stérile de façon à obtenir les concentrations 8, 12, 16 et 20 g/kg pour la PM, et des concentrations finales 250, 500, 800 et 1000 mg/kg pour l'EPM et rajoutées aux grains de maïs broyés (15 g) dans des conditions stériles et placés dans des boîtes de Petri stériles de 9 cm de diamètre.

Des piqures centrales ont été faites pour le dépôt de 100µl d'une suspension de spores contenant 10^6 spores/ml d'*A. flavus* (NRRL 3251^T). Des témoins sans PM et d'EPM ont été effectués et incubés à 28 °C pendant 7 jours. Le diamètre des colonies de la croissance fongique ont été mesurés chaque jour. L'estimation du pourcentage d'inhibition par rapport aux témoins sans PM ou d'EPM est déterminé selon la formule suivante décrite par LI *et al* (2016):

$$\% \text{ d'inhibition} = \{ \text{DT (mm)} - \text{DP (mm)} \} \times 100$$

DP : Diamètre des cultures traitées avec la poudre et les extraits phénoliques des margines.

DT : Diamètre des cultures témoins non traitées avec la poudre et les extraits phénoliques des margines.

La CMI a été définie comme la concentration de poudre ou d'extrait phénolique des margines qui a inhibé le développement du mycélium sur le maïs.

1.2.3.5.4.1. Extraction des aflatoxines à partir du maïs broyé

En vue d'une confirmation de la production des aflatoxines par CCM, les cultures de maïs ont subi une extraction au méthanol selon les directives du fournisseur du kit *Celer AFLA B1* (annexe 6). Les contenues des boîtes de Petri (15 g) sont fragmentés à l'aide d'une spatule du centre vers la périphérie, ensuite introduit dans des tubes coniques de 50 ml, l'extraction des aflatoxines est réalisée par l'addition de 20 ml de méthanol/eau (70/30). Après une macération de 3 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé à 4000 g pendant 20 min. Les extraits méthanoliques d'aflatoxines ont subit une évaporation sous vide à 50 °C. Les résidus sec obtenus sont redissous dans 2 ml de méthanol, filtrés à l'aide de microfiltres de 0,45 µm (Millex-HP Syringe Filter Unit, Millipore Corporation, USA) et conservés à +4 °C dans des eppendorfs pour l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) et par la technique d'ELISA directe compétitive. Ces étapes sont effectuées à l'abri de la lumière. Le diagramme du protocole est donné par la figure 23.

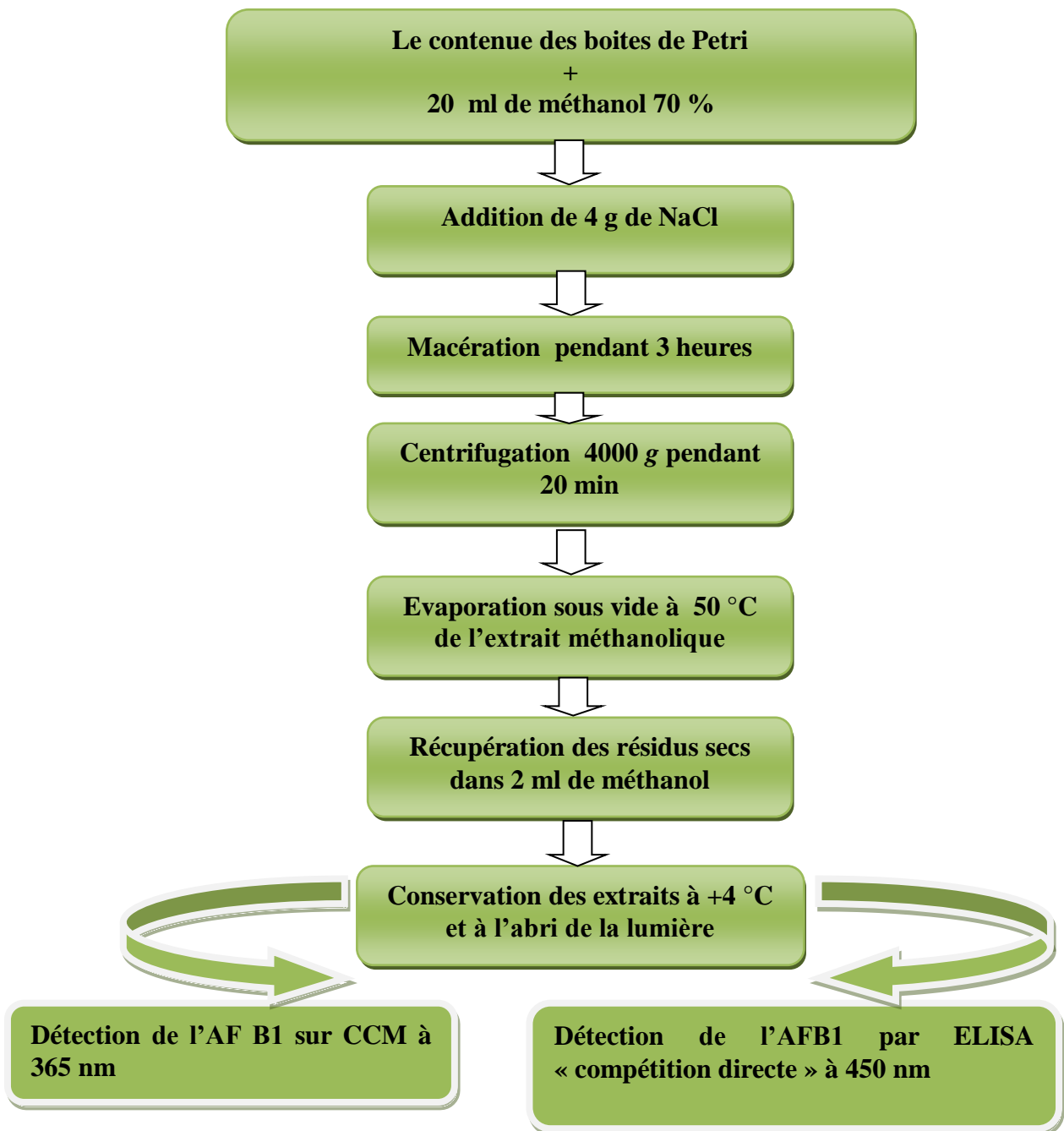


Figure 23 : Diagramme d'extraction des aflatoxines à partir de la poudre de maïs contaminée par *Aspergillus flavus* selon le kit ELISA « compétition directe » *Celer AFLA B1* test kit

1.2.3.6. Détermination des aflatoxines B1 par le test d'ELISA type « Compétition Directe »

1.2.3.6.1. Principe du test ELISA compétition directe

Dans ce type de tests, l'antigène à doser (étalon ou échantillon) entre en compétition avec une quantité connue d'Ag marqué par une enzyme pour se lier avec les anticorps spécifiques fixés sur la plaque ou la barrette de microtitration. On observe alors une relation inversement proportionnelle entre le signal de DO obtenu et la quantité d'Ag contenu dans l'échantillon. Ainsi, plus il y a d'Ag dans l'échantillon plus le signal DO est faible car l'affinité de l'anticorps est plus grande vis à vis de l'Ag libre que vis à vis de l'Ag marqué.

Les étapes de l'ELISA type compétition directe sont résumées dans la figure 24.

	<p>Etape 1 : Echantillons ou solutions étalon (●) doivent être mélangés en quantité adéquate et homogène avec le conjugué enzymatique.</p> <p>Etape 2 : Le mélange échantillons ou solutions étalon (●) et conjugué enzymatique (E●) sont alors introduits dans les tubes ou micro-puits dont les parois sont recouvertes d'anticorps. Ils vont alors entrer en compétition pour se lier aux anticorps fixés sur les parois du tube ou du micro-puits.</p> <p>Ces anticorps sont spécifiques de la molécule à détecter et sont responsables de la grande spécificité du test.</p>
	<p>Etape 3 et 4 (incubation et lavage): Après une période d'incubation, les tubes ou micro-puits subissent plusieurs lavages. A l'issue de ces lavages, seules les molécules et/ou conjugué enzymatique, qui sont liées aux anticorps resteront fixées sur les parois. Le lavage permet d'éliminer certains interférents qui peuvent influencer sur le résultat du test au moment de la détection.</p>
	<p>Etape 5 et 6 : Ajouter le substrat et le chromogène</p>

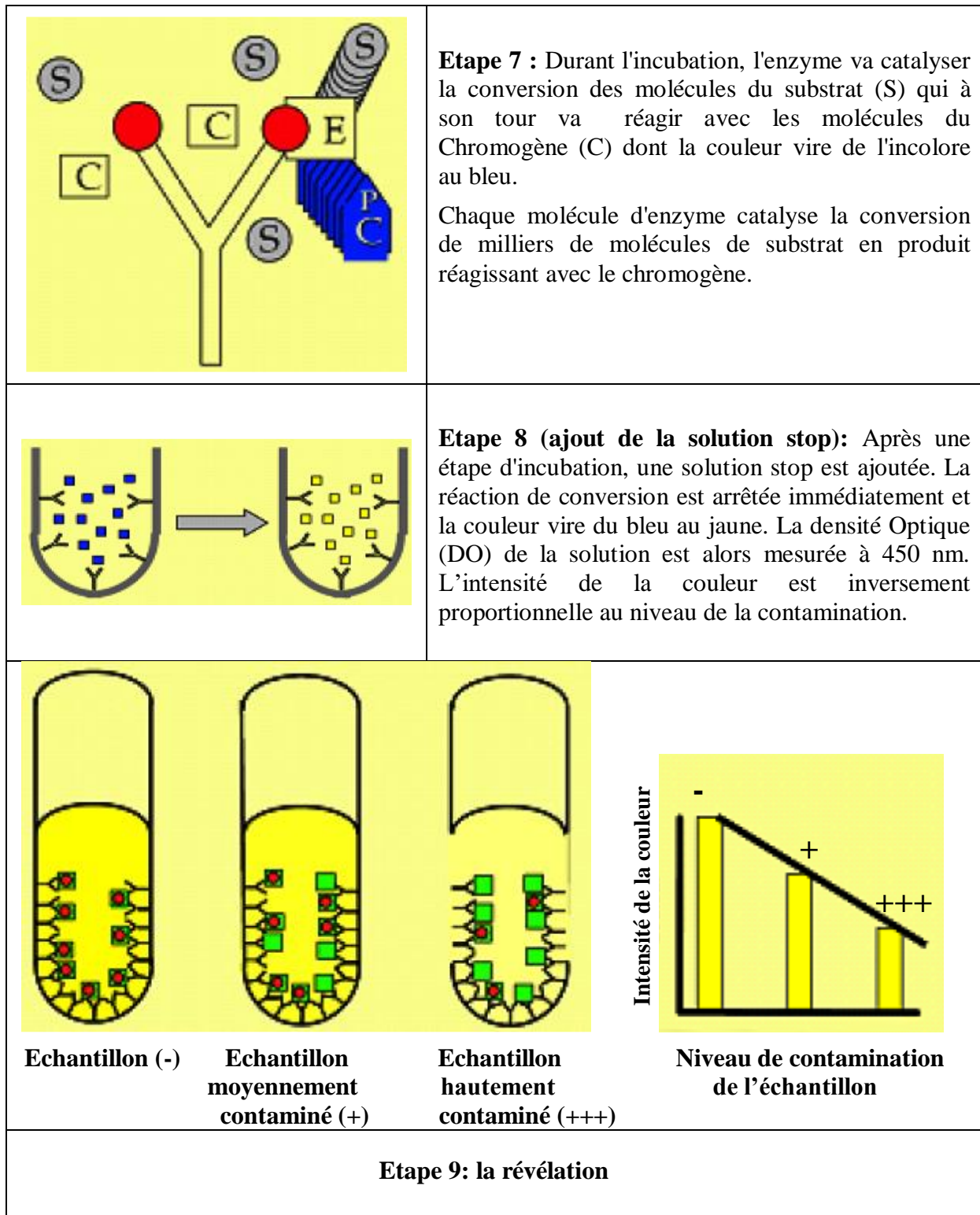


Figure 24 : Résumé des étapes de l'ELISA type «Compétition Directe» (ANONYME 7, 2011).

1.2.3.6.2. Protocole du dosage de l'aflatoxine B1 par test ELISA «Compétition Directe»

Après l'extraction et la filtration des échantillons contaminés par *Aspergillus flavus* à partir du milieu liquide SMKY et de la matrice alimentaire représentée par le maïs, on procède à la détermination de l'AFB1 selon les instructions de la fiche technique fournie avec le kit de test *Celer AFLA B1* (annexe 6) et résumées dans la figure 25. Les solutions standard utilisées pour la réalisation de la courbe d'étalonnage contiennent de l'AFB1 aux concentrations suivantes: 0, 1, 5, 20 et 40 ppb. Le dosage a été effectué dans des microplaques en plastique muni de barrettes avec des 8 micropuits chacune revêtues d'anticorps anti-aflatoxines B1. Dans les puits de prémélange, l'aflatoxine marquée aux enzymes ainsi que les solutions standard, ou les échantillons ont été mélangés puis transférés dans la plaque de microtitration contenant les barrettes revêtues d'anticorps anti-aflatoxines B1 comme suit : Cinquante microlitres d'échantillon ont été déposés dans des puits et 100 µl de (AFB1-HRP) ont été ajoutés à chaque puits de prémélange. 100 µl de chaque puits de prémélange ont été transférés immédiatement dans le micro-puits revêtu d'anticorps anti-aflatoxine B1 correspondant et incubé pendant 10 min à température ambiante (25 °C). Après l'incubation, les puits ont été vidés de leurs contenus et en tapotant la microplaque vigoureusement contre un papier absorbant. Trois cycles de lavage ont été effectués avec du PBS-Tween (0,01 M). Cent microlitres de substrat (tétraméthylbenzidine, TMB) ont été ajouté dans les puits et laissés dans l'obscurité pendant 5 min. L'enzyme a transformé le chromogène incolore en un produit bleu. L'addition de la solution stop (50 µl d'acide sulfurique 2 M) a conduit à un changement de couleur du bleu au jaune. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration d'AFB1 dans l'échantillon, qui a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques ELISA (Biotek EL 311). La courbe d'étalonnage a été tracée par le logiciel BioTek™ Gen5™ logiciel de collecte et d'analyse des données et les densités optiques des échantillons ont été comparées avec la courbe d'étalonnage pour calculer les concentrations d'AFB1 en ppb (annexe 7).

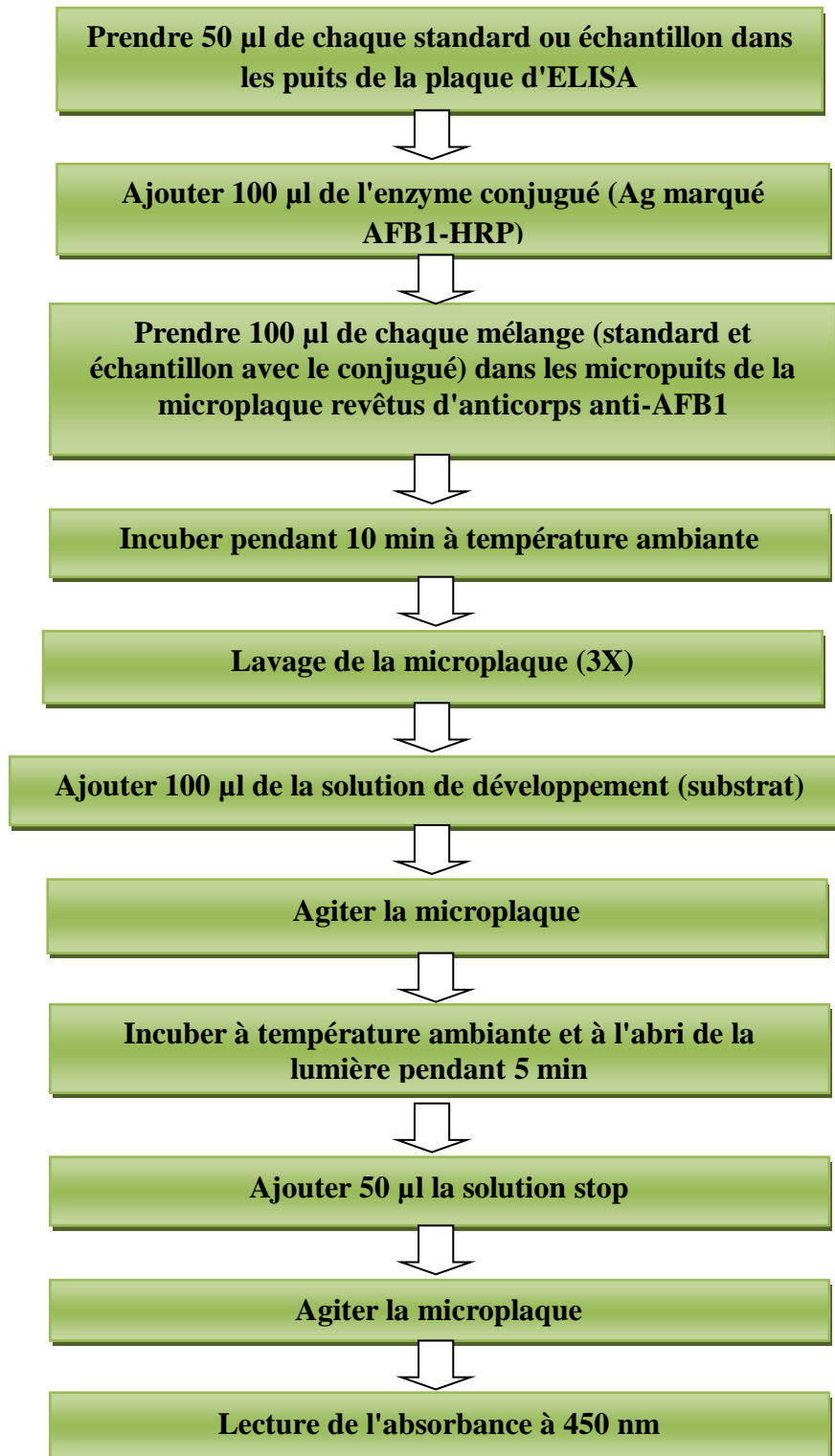


Figure 25: Résumé du protocole du dosage de l'AFB1 extrait à partir du milieu SMKY et du maïs contaminés par *Aspergillus flavus* selon le kit ELISA «compétition directe» *Celer AFLA B1*.

1.3.7.3. Expression des résultats

Pour permettre de calculer plus facilement les concentrations en AFB1 en ppb, les données sont d'abord transformées de manière à exprimer l'intensité du signal sur une échelle de 0 à 100 % (figure 26). La valeur de la DO du premier point en ppb correspond au standard (0 ppb) (absence d'AFB1) ce qui correspond à 100 % d'Ag marqués et les autres valeurs des DO obtenues des standards (1, 5, 20 et 40 ppb) ou des échantillons (les extraits d'AFs sans ou avec différentes concentrations de PM et d'EPM) sont exprimées en % de cette valeur (B/B₀%). Selon l'équation suivante :

$$(B/B_0)\% = \text{DO standard ou échantillon (B)} / \text{DO standard 0 ppb (B}_0) \times 100$$

On reporte ensuite l'intensité du signal B/B₀ (échelle linéaire) en fonction de la concentration en AFB1 en ppb (échelle semi-logarithmique) selon la figure 26.

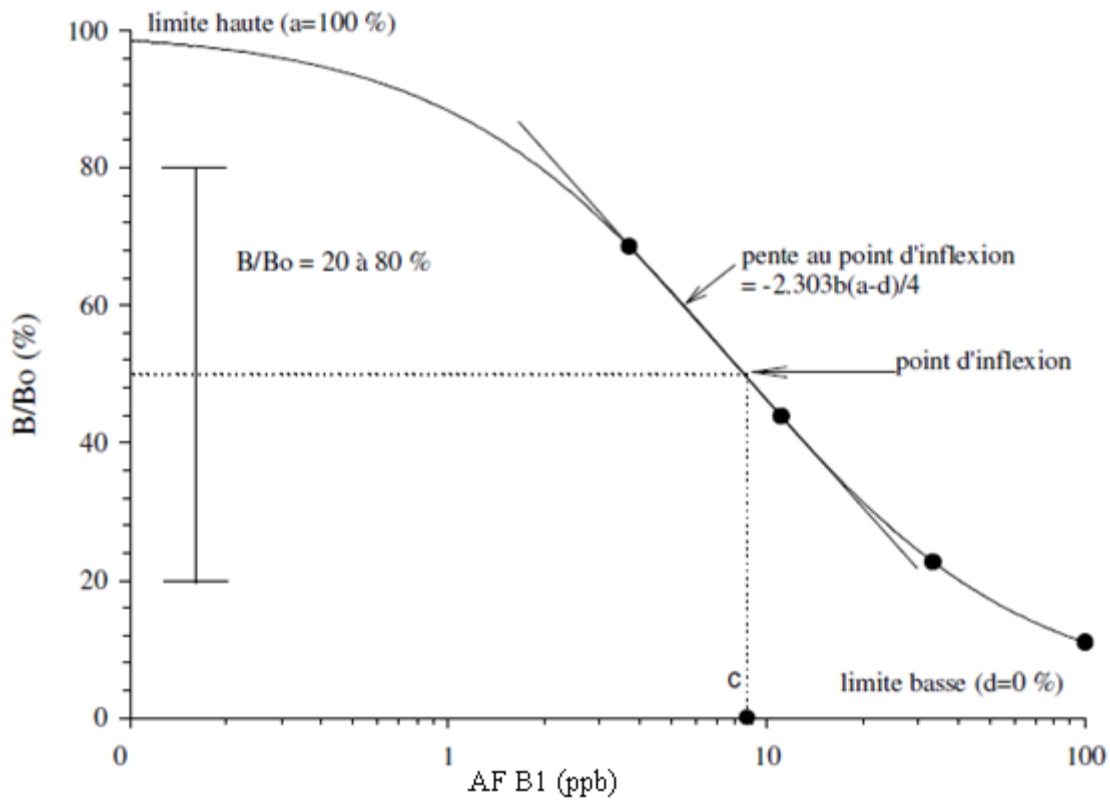


Figure 26 : Représentation du signal B/B₀ (échelle linéaire) en fonction de la concentration en AFB1 (échelle semi-logarithmique)(ANONYME2, 2011).

Le haut de la courbe est un plateau correspondant à la valeur du signal en l'absence d'Ag non marqué avec l'enzyme (AFB1). La valeur **c** : correspond à la concentration 50 % de fixation de l'AFB1 (Ag non marqué) et le conjugué enzymatique (l'Ag marqué avec l'enzyme). **a** : signal maximum, **d** : signal minimum, **b** : terme relatif à la pente au point d'inflexion. La

concentration en µg/kg (ppb) correspondant au pourcentage d'activité de chaque échantillon, peut-être lue directement sur la courbe étalon. Il est important que la valeur de B/Bo s'inscrive dans la portion 20-80 %. Suivant le degré de contamination et la matrice, on peut également être amené à diluer l'extrait pour avoir un signal compris entre 20 et 80 % d'activité, dans ce cas il faudra tenir compte de cette dilution supplémentaire et multiplier le résultat par ce dernier facteur.

La courbe de titration de l'AF B1 est donnée en annexe 8.

1.2.4. Etude de l'activité hypoglycémiant de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

1.2.4.1. Recherche de la toxicité de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

La recherche de la dose létale 50 (DL50) est une façon pratique de caractériser et de classer la toxicité d'une substance. Celle-ci désigne la dose d'une substance qui peut causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises (LAPOINTE, 2004). De ce fait, la mesure de la DL50 peut établir un classement pour ces substances (tableau XVIII).

Tableau XVIII: Echelle de classification des substances toxiques chez les rongeurs selon HODGE et STENER (FRANK, 1992).

DL50	Indice de toxicité
Jusqu'à 1 mg/kg	Extrêmement toxique
1 à 50 mg/kg	Hautement toxique
50 à 500 mg/kg	Modérément toxique
500 à 5000 mg/kg	Légèrement toxique
5000 à 15 000 mg/kg	Presque pas toxique
Plus de 15 000 mg/kg	Relativement inoffensif

Cependant, la DL50 a une valeur très limitée, car il ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions. Il s'agit d'une appréciation grossière et préliminaire qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels que l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de traitement, etc. (LAPOINTE, 2004).

La DL50 de la PM et de l'EPM n'est pas connue dans la littérature consultée ainsi la recherche d'une éventuelle toxicité de la PM et de l'EPM est nécessaire. L'administration de la PM et de l'EPM a été effectuée par gavage oral aux doses suivantes: 0,5 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 g/kg et de 10 ; 25 ; 250 ; 500 ; 1000 mg/kg respectivement et solubilisées dans de l'eau bidistillée; sont administrés par voie orale à 11 groupes ; chaque groupe est composé de 3 souris non diabétiques, le 11^{ème} groupe servant de contrôle (recevant de l'eau physiologique).

Les souris sont mises en observation continue pendant une durée de 72 h concernant les symptômes de toxicité, le changement de comportement et la mortalité (LITCHFIELD et WILCOXON, 1949).

1.2.4.2. Test de tolérance au glucose

Le test de tolérance au glucose appelés aussi hyper Glycémie Provoquée par voie Orale aussi (HGPO) ou Oral glucose tolerance test (OGTT) est un test simple, utilisé en routine clinique. Après une nuit de jeun, des échantillons de sang, sont prélevés à 0, 30, 60 et 120 min après une charge orale de glucose pour la détermination des concentrations de glucose sanguin. La tolérance au glucose est reflétée par l'efficacité de l'organisme à faire diminuer la glycémie après une charge en glucose.

Comme le test l'indique les souris doivent être à jeun (16 heures). En effet la veille du test les souris sont privées de nourriture et une grille métallique est placée au fond de la cage pour éviter le phénomène de la coprophagie). Les expériences ont été réalisées sur une série de huit groupes de souris chaque groupe est composé de 6 souris non diabétiques conscientes. Les souris ont été gavées avec une solution de D-glucose (1g/kg de poids corporel) en absence et en présence de la PM et les EPM respectivement avec les concentrations suivantes : 0,5 ; 2 ; 4 g/kg et de 10 ; 250 ; 500 mg/Kg de poids corporel. Le volume total d'injection par gavage était de 250 µl et la quantité de glucose était calculée en fonction du poids de chaque animal, le septième (recevant de l'eau distillée) et le huitième groupe (recevant la solution de glucose 1g/kg) servent de contrôles. Le sang était prélevé par dissection caudale de l'animal pour déterminer la glycémie, avant le gavage pour t=0 puis à 5, 10, 15, 30, 60 et 120 min. La glycémie est calculée par un appareil adapté (Accu-Check performa). La glycémie est donnée en mg/dl après dépôt d'une goutte de sang sur une bandelette par capillarité. Chaque souris était marquée au niveau de la queue à l'aide d'un marqueur.

1.2.4.3. Test de provocation *in vitro* en chambre d'Ussing

○ Définition et principe d'utilisation de la chambre d'Ussing

Une chambre d'Ussing est un montage permettant de mesurer un courant comme indicateur d'un transport ionique à travers un épithélium. Cet outil scientifique porte le nom de son inventeur Hans Ussing (1911 - 2000). Ce physiologiste danois inventa dans les années 1950 un système permettant d'isoler deux compartiments par un épithélium : le compartiment luminal et le compartiment basal. Le but de cette chambre était de pouvoir quantifier de façon électrique un passage ionique à travers un épithélium sous diverses conditions. Les premières expériences furent réalisées par Ussing avec un échantillon d'épithélium de peau de grenouille. La chambre d'Ussing est constituée de deux demi-chambres (C). L'échantillon est placé entre ces deux demi-chambres (taille du fragment 0,1 à 0,5 cm²) (S), les deux faces du tissu, déterminent un compartiment muqueux (lumière intestinale) et un compartiment séreux (circulation sanguine) sont baignées dans des solutions tampons avec pression, température et osmolarité contrôlées et spécifiques pour chaque type de tissus étudiés. Afin d'assurer la survie de l'échantillon, celui-ci est maintenu en conditions physiologiques, avec un milieu nutritif et un apport en O₂ (95%) et en CO₂ (5%), (a). L'O₂ assure la respiration cellulaire et le CO₂ le maintien du pH. Le principe est le suivant : le passage d'ions à travers l'épithélium génère une différence de potentiel qui est enregistrée par deux électrodes sensibles au voltage (A et A') placées de chaque côté de l'épithélium. Cette différence de potentiel est ensuite

annulée par l'application d'un courant (B et B'), nommé courant de court-circuit (*Short-circuit current, SCC*), de manière à maintenir à zéro le voltage de part et d'autre de l'épithélium. L'intensité du courant nécessaire à appliquer pour maintenir la différence de potentiel à zéro est mesurée par un ampèremètre (M). Une fois dans ces conditions, toute variation de potentiel est retranscrite par une variation de l'intensité du courant à appliquer (figure 27).

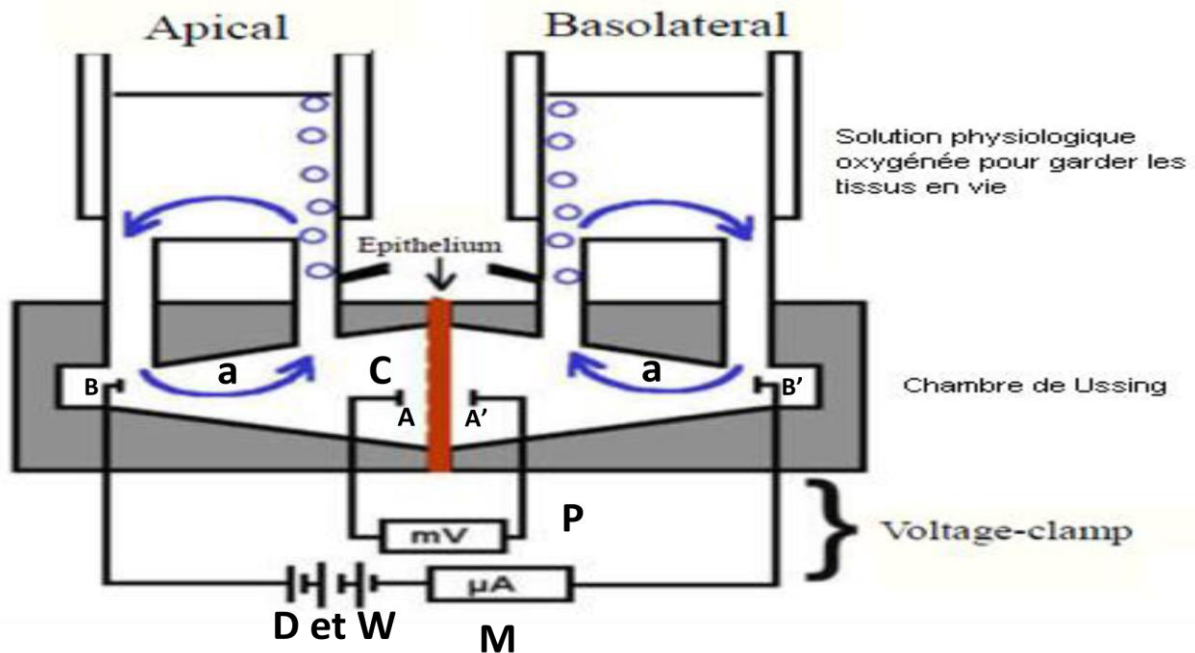


Figure 27: Représentation schématique de la chambre d'Ussing (USSING et ZERAHN., 1951). a : arrivée du carbogène, A et A' : électrode de mesure, B et B' : électrode de travail, C : solution physiologique, D : alimentation continue, W : régulateur potentiométrique, M : micro-ampèremètre, P : millivoltmètre.

Cette technique permet simultanément d'étudier et d'évaluer dans des conditions *in vitro* suffisamment réalistes, non seulement le passage des molécules au travers des tissus épithéliaux, mais aussi de suivre certaines fonctions physiologiques de la muqueuse, telles que sa capacité à réguler les flux d'ions au travers de la membrane. La possibilité de réaliser la mesure simultanée de deux paramètres distincts (les flux ioniques transmembranaires et le flux d'absorption d'une molécule d'intérêt) permet en premier lieu de contrôler la viabilité du tissu vivant pendant l'expérience, grâce au contrôle continu des paramètres électriques caractéristiques de la viabilité membranaire. En second lieu, elle contribue souvent à expliquer les modalités de passage transépithélial de la substance considérée.

➤ **Solution de Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) :** La solution nutritive utilisée dans notre étude était une solution de Krebs-Henseleit (KRB). Il s'agissait d'une modification de la solution de Ringer. Elle fut développée dans les années 1930 par HANS KREBS et KURT HENSELEIT dans le but de maintenir un tissu dans les conditions physiologiques le temps de l'expérience. Cette solution, équilibrée avec un flux gazeux à 95 % d' O_2 et 5 % de

Matériel et Méthodes

CO₂, présentait un pH de 7,4, pH conforme de l'environnement cellulaire. Elle contenait des ions sodium (Na⁺), chlorure (Cl⁻), potassium (K⁺), calcium (Ca⁺), du sulfate de magnésium (MgSO₄), des ions bicarbonate (HCO₃⁻), phosphates (PO₄²⁻), et du glucose. Les quantités utilisées sont celles décrites dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Composition de la solution Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB)

Composition	Concentration en mM
NaCl	117
KCl	4,7
CaCl ₂	2,1
MgSO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	24,8
Glucose	10

La stimulation de la capacité de transport de l'épithélium peut être réalisée de différentes manières. L'accessibilité des côtés apical et basolatéral du tissu intestinal permet une stimulation pharmacologique directe de l'épithélium au niveau basolatéral, notamment via l'ajout exogène d'un agoniste des récepteurs cholinergiques, le carbachol (choline chloride carbamate) (Cch). La présence de récepteurs muscariniques sur les cellules épithéliales (KOZAK et *al.*, 1998) permet une action directe du Cch sur l'épithélium, lorsqu'il est ajouté du côté basolatéral, faisant de cette molécule un outil pharmacologique intéressant pour étudier la capacité de transport épithélial de l'intestin (TAPPER et *al.*, 1978)

En effet certains produits de référence comme le carbachol, phloridzine et le glucose utilisés dans notre expérience servent au cours d'une expérience sur Chambre d'Ussing à tester la viabilité du tissu. Leurs effets et mécanismes d'action étant connus, ils sont utilisés pour agir sur les transporteurs cellulaires et donc induire des mouvements ioniques mesurables électriquement (tableau XX).

Tableau XX : Caractéristiques des produits agissant sur les paramètres électriques de l'épithélium intestinal

Produit	Lieu d'application	Mécanisme d'action	Effet sur <i>Isc</i>
Carbachol	Côté Séreux	Sécrétion de Cl ⁻ dépendante du Ca ²⁺	↑ <i>Isc</i>
Glucose	Intestin grêle côté muqueux	augmentation de l'entrée de Na ⁺ par le co-transporteur glucose/Na ⁺ (SGLT-1)	↑ <i>Isc</i>
Phloridzine	Côté muqueux	Inhibition du co-transporteur SGLT-1	↓ <i>Isc</i>

○ Enregistrement du courant de court-circuit (I_{sc})

Les électrodes de courant et de voltage étaient branchées sur un amplificateur de voltage clamp (figure 28). L'appareil est connecté à une interface traduisant le signal électrique en signal informatique, elle-même reliée à un ordinateur (MacLab ; MacIntosh computer). L'amplificateur utilisé est un DVC 1000 voltage-clamp amplifier (DVC 1000; WPI, Aston, England).

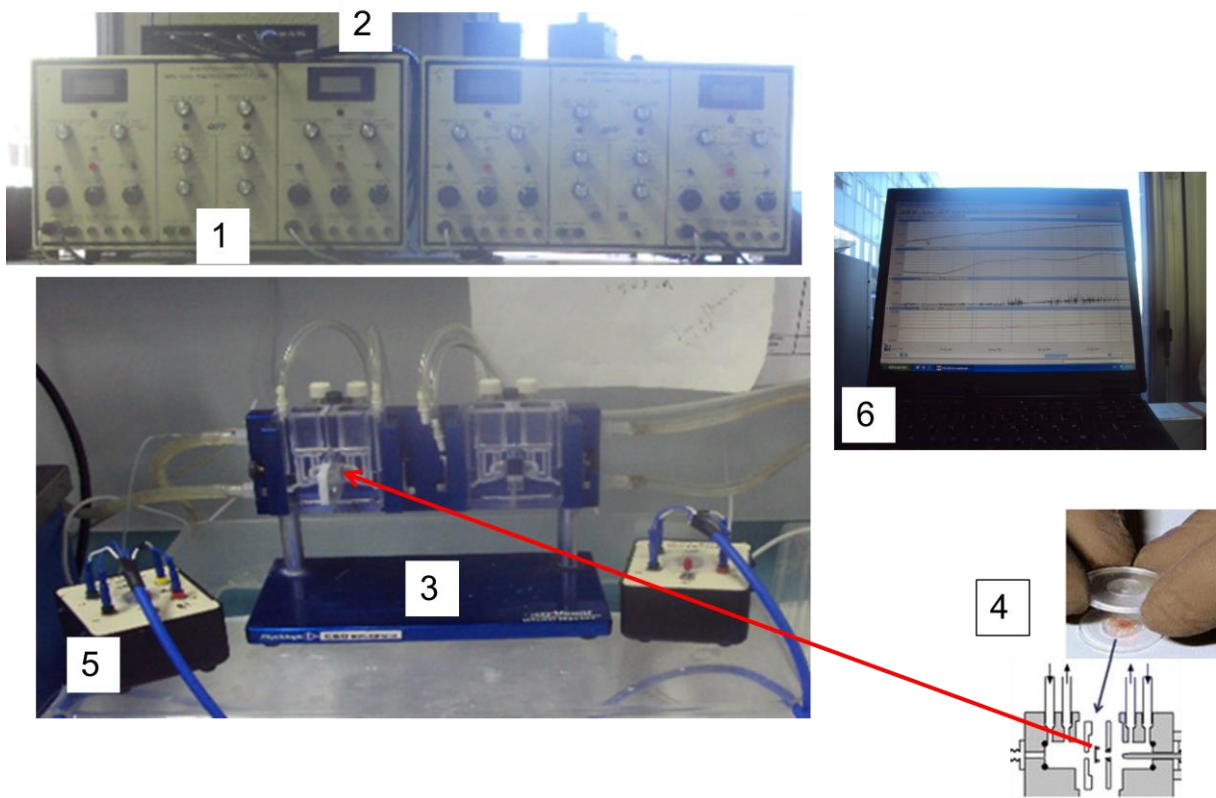


Figure 28: Photo originale du montage électrophysiologique de la chambre d'Ussing

Légendes : 1: amplificateur DVC 1000, 2: station d'enregistrement, 3: chambre d'Ussing, 4: montage du tissu dans la cassette, 5: électrodes sensibles au voltage, 6: logiciel de traitement du signal.

○ Préparation des souris et montage de fragments de jéjunum de souris en chambre d'Ussing

Les souris sont maintenues à jeun pendant une durée de 16 heures. Elles sont tuées par une overdose de pentobarbital. L'abdomen est ouvert et le segment jéjunum entier est prélevé délicatement de la cavité abdominale, vidé de son contenu par deux à trois rinçages avec une solution de Ringer froide (annexe 8). Le segment jéjunum est ensuite incisé selon le bord

mésentérique puis découpé en fragments qui sont maintenus dans du Ringer froid et oxygénés par un courant de carbogène (CO₂ : 5 % ; O₂ : 95 %). Les fragments sont montés entre deux chambres de lucite dont l'ouverture détermine la surface de la muqueuse intestinale. Le volume de la solution KRB (pH 7,4) contenant 10 mM/l de glucose (contrôle positif) déposé dans chaque compartiment de la chambre est de 4 ml. Le système est maintenu à 37 °C et oxygéné par un courant de carbogène. Après montage de tissus, environ 40 min sont nécessaires pour stabiliser les paramètres électrophysiologiques de base. Le KRB seule (vecteur) ou contenant de la PM avec les concentrations de (15, 30, 60, 125 mg/ml) ou de l'EPM avec les concentrations de (1, 10, 100, 1000 µg/ml) sont ajoutées au compartiment muqueux 2 min après l'ajout de glucose. Le carbachol (100 µM/l) (côté Séreux) et la phloridzine (500 µM/l) (côté muqueux) sont ajoutés à la fin de chaque expérience en qualité de contrôles positif et négatif respectivement. Les propriétés physicochimiques du carbachol et de la phloridzine ainsi que leurs références sont mentionnées en annexe 8.

Les résultats obtenus sont exprimés en intensité du courant de court-circuit I_{sc} (µA/cm²)

1.2.4.4. Analyse des membranes cellulaires avec le Western blot

Afin de répondre à cet objectif, le scraping des entérocytes intestinaux des souris a été effectué et la lignée cellulaire Mode-K a été utilisée dans le but d'étudier l'effet de la PM et de l'EPM sur l'expression du transporteur membranaire principalement SGLT-1 et l'absorption du glucose et une des voies de signalisation impliquant la protéine kinase-C (PKC).

1.2.4.4.1. Etude de l'effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur l'expression du transporteur membranaire principalement SGLT-1 et de la protéine kinase-C (PKC) sur les cellules intestinales des souris testées

1.2.4.4.1.1. Protocole du traitement des souris par la poudre et l'extrait phénolique des margines et d'isolation de la membrane intestinale de souris (Le scraping) pour le Western blot

Dans notre expérience, les souris ont été gavées avec du glucose 1 g/kg en absence et en présence de la poudre de margines (PM) 4 g/kg et d'extrait phénolique de margines (EPM) 500 mg/ml. Le contrôle (recevant de l'eau distillée). Le choix des concentrations testées ont été établies selon les résultats obtenus lors du test de l'OGTT.

Après 15 min de traitement les souris sont sacrifiées (euthanasie par dislocation cervicale) et le jéjunum mesurant 30 cm est prélevé à l'anus (la coupe se fait au niveau du duodénum (angle de Treitz) qui est un ligament en suspension). Après l'avoir lavé au tampon PBS froid contenant des inhibiteurs de protéase, on découpe le tube intestinal pour le poser à plat. Ce travail se réalise sur une plaque en verre placée sur de la glace afin de stopper les réactions enzymatiques. Une fois le tube ouvert on aplati à l'aide d'une pince et on prélève la muqueuse intestinale (scraping 15 cm du jéjunum) avec deux lames en verre comme représenté dans la figure 29.

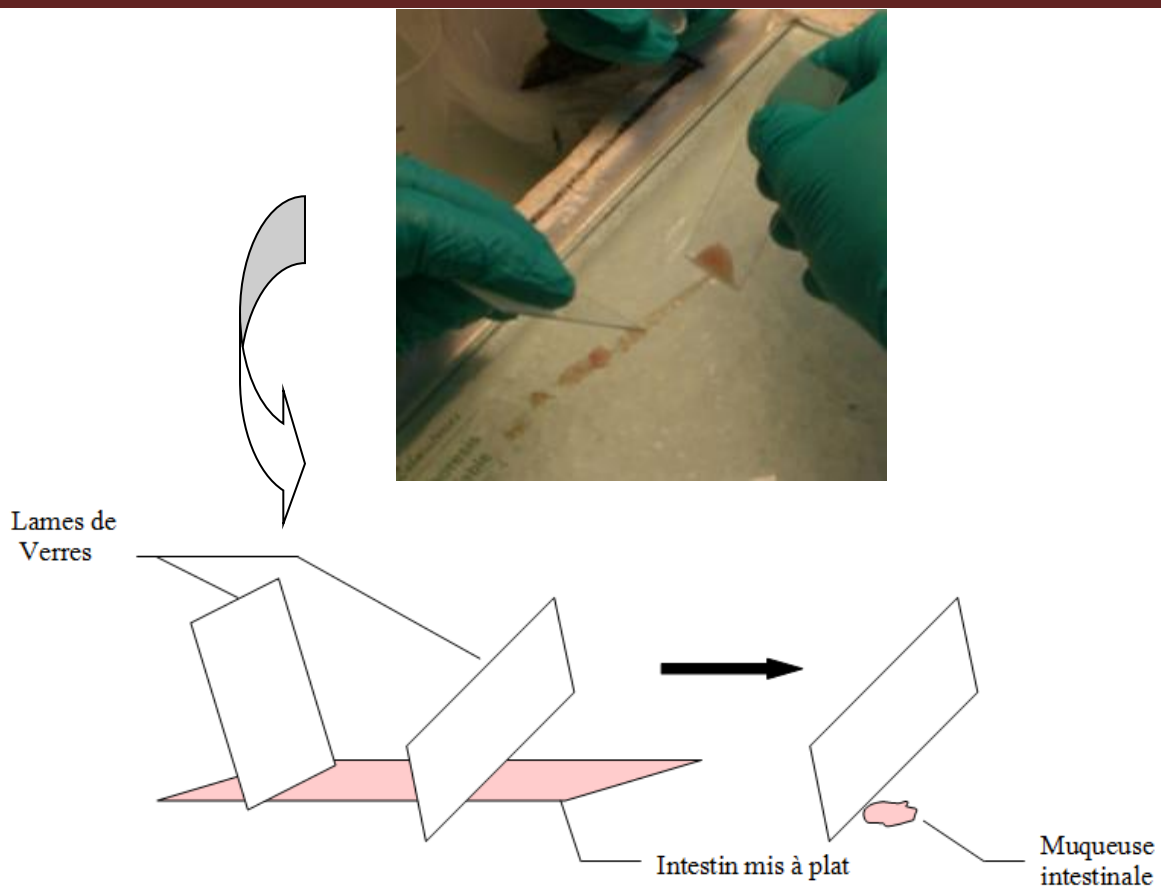


Figure 29: Représentation du prélèvement de la muqueuse intestinale (le scraping).

Les échantillons sont ensuite récupérés dans des eppendorfs en présence d'une solution tampon de RB⁺ PI (RIPA Buffer + Phosphatase Inhibitor) froide (annexe 9) et ont subi une lyse et homogénéisation à l'aide d'un Torax suivie d'une sonification à l'aide d'un sonicateur 3 fois pendant 15 sec, cette opération est effectuée dans un bac remplie de glace.

Après une première centrifugation à 400 g pendant 10 min à + 4 °C, effectuée dans le but d'éliminer les particules indésirables, les surnageants récupérés ont subi une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 45 min à + 4 °C. Les culots ont été resuspendus dans du tampon RB⁺ PI et complété avec du tampon Laemmli5X (annexe 9), placés dans un bain marie en ébullition pendant 3 min. Les échantillons sont congelés à -20°C jusqu'à leurs utilisations.

Les teneurs en protéines ont été suivies par analyse Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. L'expérience est répétée trois fois pour chaque concentration testée.

1.2.4.4.2. Etude de l'effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur l'expression du transporteur membranaire principalement SGLT-1 et de la protéine kinase-C (PKC) sur la lignée cellulaire Mode-K

1.2.4.4.2.1. Description de la lignée Mode-K

La lignée cellulaire Mode-K, a été établie à partir de cellules épithéliales de l'intestin grêle de jeunes souris C3H/HeJ, après immortalisation par transfert de l'oncogène T du

rétrovirus simiens SV40 (VIDAL *et al.*, 1993). Ces cellules adhérentes sont d'haplotype H-2k et présentent toutes les caractéristiques morphologiques et phénotypiques des entérocytes. Avec un temps de dédoublement de 24 heures (figure 30).

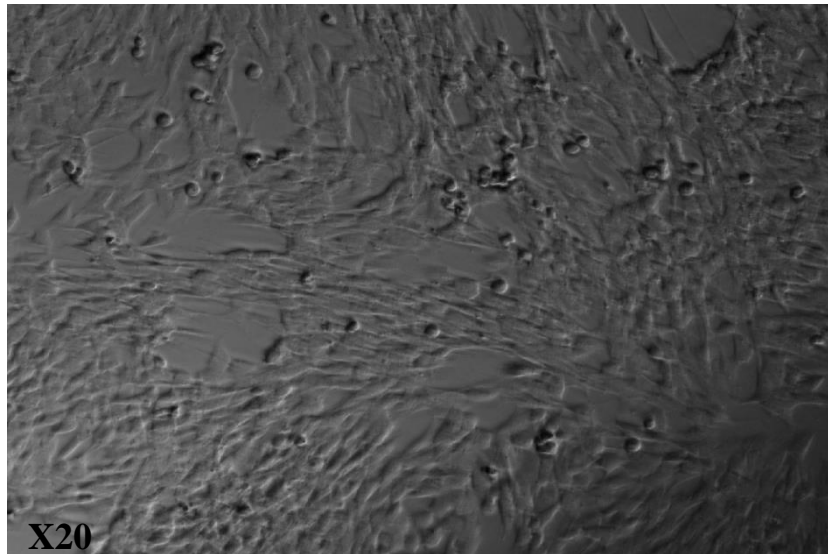


Figure 30: Photo originale de la morphologie de la lignée cellulaire Mode-K, en microscopie optique phase inverse, contraste en phase, grossissement X20, culture en passage 24.

1.2.4.4.2.2. Entretien de la lignée

Les cellules Mode-K sont cultivées à 37 °C (atmosphère humide, 5 % de CO₂) en présence de milieu de culture RPMI 1640 (annexe 10) contenant 8 % (volume/volume) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 0,25 µg/ml d'amphotéricine B. Lorsqu'elles arrivent à confluence, ces cellules sont trypsinées, centrifugées et ensemencées à une densité moindre dans de nouvelles flasques de culture. Les cellules Mode-K sont cryoprélevées dans l'azote liquide après avoir été remises en suspension dans une solution de SVF 10% DMSO.

1.2.4.4.2.3. Passage de la lignée cellulaire Mode-K

Le passage des cellules doit se faire sous la hotte et il consiste à l'aspiration de l'ancien milieu de culture et lavage des cellules avec du PBS. Puis, 0,3 ml de la trypsine EDTA sont additionnés et les cellules sont incubées pendant 5 min à 37 °C. Après détachement des cellules de la surface de la boîte de culture, un volume de 1,7 ml du milieu de culture RPMI 1640 est ajouté et une homogénéisation est pratiquée pour bien séparer les cellules encore en agrégats. Après comptage et dilution convenable, les cellules sont transférées dans un nouveau flasque en plastique stériles. Une homogénéisation est pratiquée pour répartir uniformément les cellules.

1.2.4.4.2.4. Comptage des cellules

La détermination du nombre cellulaire est une étape nécessaire qui précède chaque expérience. La méthode du bleu de trypan a été utilisée pour faire le dénombrement des

cellules Mode-K. Cette méthode permet de distinguer entre les cellules vivantes, et les cellules mortes. Pratiquement, un volume de 50 µl de la suspension cellulaire est mélangé avec 450 µl de la solution du bleu de trypan 0,1 % (une dilution à 1/10^{ème}). La solution obtenue est incubée pendant 5 min à température ambiante. Le nombre de cellules vivantes et mortes est déterminé directement par comptage en cellule de Malassez après coloration au bleu de Trypan. Les cellules vivantes, dont la membrane est intacte, sont imperméables aux colorants vitaux comme le bleu de Trypan, alors que les cellules mortes, qui ont perdu l'intégrité de leur membrane cytoplasmique, se colorent en bleu. Les cellules sont comptées à l'aide d'un microscope photonique au grossissement X 40. Le nombre de cellules est déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Concentration cellulaire par millilitre (Cellules/ml)} = \text{nombre de cellules par carré (10 carrés)} \times \text{facteur de dilution} \times 10^4$$

1.2.4.4.2.5. Traitement de la lignée cellulaire Mode-K par la poudre et l'extrait phénolique de margines pour le Western blot

1.2.4.4.2.5. 1. Test de toxicité des cellules Mode-K

La veille de l'expérience, les cellules ont étéensemencées dans un flasque en plastique stérile de 25 cm² à une densité de 0,5 millions de cellules/flasque avec 5 ml de milieu RPMI SVF- dépourvue de sérum de veau fœtal (Le milieu est composé de sodium pyruvate, HEPES, du milieu MEM NE aa (avec acides aminés non essentiels) (annexe 9), B mercaptoéthanol, antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Elles ont été incubées dans une étuve à 37 °C en atmosphère humide contrôlée à 5 % de CO₂.

Pour tester la toxicité de la PM et de l'EPM, les cellules Mode-K ont étéensemencées à une densité de 280 000 cellules par 1,5 ml de milieu RPMI SVF- par insert de plaques de 6 puits. Puis traités avec différentes concentrations de PM (0, 20, 40, 60, 100 mg/ml) ou d'EPM (0, 20, 40, 60 et 100 µg/ml) et incubé pendant 30 min. Après 30 min d'incubation les cellules ont été lavées et décrochées des inserts avec 1,5 ml de tampon PBS (1X) salin froid ([-]CaCl₂ ; [-]MgCl₂) (annexe 10) et en présence d'un milieu dissociant (Tryp LE Express) (annexe 10) dans chaque puits. Des aliquotes de 50 µl de chaque suspension obtenue ont été ajoutées à un volume de 450 µl de colorant bleu de Trypan (0,1 %), et les cellules qui n'ont pas absorbé le colorant ont été comptées comme des cellules vivantes. Le pourcentage des cellules viables en présence de la PM et de l'EPM a été calculé par rapport au nombre total de cellules présentes.

1.2.4.4.2.5.2. Protocole du traitement de la lignée cellulaire Mode-K par la poudre et l'extrait phénolique des margines pour le Western blot

Pour le Western blot, les cellules ont étéensemencées à une densité de 280 000 cellules par 1,5 ml de milieu RPMI SVF- par insert de plaques de 6 puits (12 mm de diamètre et 0,4 µm de porosité), les puits sont traités comme suit : un control négatif avec des cellules non traités (sans PMA, sans PM et sans EPM), cellules traités avec le PMA seule avec une concentration de 10 ng/ml final (contrôle positif), des cellules traitées avec les PM et l'EPM seules à une concentration de 30 mg/ml et de 10 µg/ml respectivement, et des cellules traitées

avec le PMA en présence de la PM et des EPM aux mêmes concentrations déjà testées. Les concentrations testées de la PM, EPM et de PMA ont été préparées dans le milieu RPMI SVF. Après 30 min d'incubation à 37 °C, les puits ont été lavés avec le tampon PBS (1X) salin froid ([-]CaCl₂ ; [-]Mg Cl₂) avec des inhibiteurs de phosphatases et des anti-protéases. Dans des eppendorfs les cellules ont été lysées et homogénéisées par sonication 3 fois pendant 15 sec, puis centrifugées à 400 g pendant 10 min à + 4 °C afin d'éliminer les impuretés et une ultracentrifugation à 100000 g pendant 45 min à + 4 °C. Les culots obtenus sont resuspendus dans du tampon PBS avec 50 µl de Laemelli à 5X dans un rapport de 1 pour 4 (50 µl dans 200 µl de PBS) et placés dans un bain marie en ébullition à 100 °C pendant 3 min. Après refroidissement, les échantillons sont congelés à - 20°C pour le Western blot.

Il est à noter que le PMA (Acetatemyrystate de phorbol (phorbol-12-myristate-13-acétate)) est un activateur ou stimulant chimique des protéines kinases (PKC) de façon spécifique en se substituant à leur ligand physiologique, le diacylglycerol (DAG).

1.2.4.4.3. Analyse des protéines

Afin de déposer la même quantité de protéines sur le gel de séparation, un dosage des protéines dans chaque lysat est effectué par la méthode de Bradford (Biorad, Hercules, CA, USA).

1.2.4.4.4. Western blotting

➤ Electrophorèse

30 µl des échantillons (les protéines intestinales de souris et les protéines des cellules Mode- K) ainsi que 5 µl des marqueurs de poids moléculaires (10 à 250 kDa) (annexe 11) ont été déposés dans les puits et séparés en fonction de leur poids moléculaires sur un gel de type SDS-PAGE 10 % (voir annexe11). La migration électrophorétique a été effectuée à 150 volts pendant 1 heure.

➤ Electro-transfert

Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Invitrogen) grâce à l'application d'un champ électrique (70 volts pendant 75 minutes). Après le transfert, les membranes ont été saturées par une solution de blocage contenant du lait à 5 % dans du TBST (Tris-buffered saline (TBS) avec 0,1 % de Tween-20) pendant 1 heure à température ambiante.

➤ Immuno-détection et révélation

Après 5 lavages successifs au TBS-T 1X, les membranes ont été incubées toute une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire. L'anticorps est dilué dans du TBS-T 1X suivant les instructions du fournisseur (les différents anticorps primaires utilisés ainsi que les dilutions et les fournisseurs sont récapitulés dans l'annexe 12). Suite à l'incubation, les membranes ont été lavées 5 fois TBS-T 1X puis incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Après rinçage, les membranes ont été incubées avec un révélateur fourni par le kit (Western Blotting, Luminol reagent, Santa Cruz Biotechnology) pendant 1 min, la révélation des bandes a été effectuée par chimiluminescence. La visualisation du marquage a été réalisée grâce à l'utilisation d'une

caméra (Ultimate sensitivity- Advanced camera technology), reliée à un logiciel de traitement de l'image (Fusion 7). Les bandes ont été quantifiées par densitométrie (Image J analysis program (National Institute of Health, USA). Alternativement, les membranes ont été aussi incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline les bandes ont été révélées avec le NBT/BCIP reagents dans le tampon carbonate (0,1 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9,8).

Il est à noter que l'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences du fait que, sa concentration est la même au niveau de toutes les cellules (contrôle interne). Ainsi, la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. Cette pratique permet la correction par rapport au taux de protéines totales sur la membrane, en cas d'erreur ou de transfert incomplet.

1.2.5. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de variance ANOVA. Le test ANOVA à un seul facteur suivie du test de Tukey's, ont été aussi utilisés pour les comparaisons multiples pour les différentes activités (anti-oxydante, antifongique et hypoglycémiant) de la poudre et de l'extrait phénolique des margines. Le test ANOVA à deux facteurs suivie du test de Bonferroni, ont été utilisés pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes dans l'OGTT pour l'activité hypoglycémiant. Les valeurs de p inférieur à 0,05 ($p < 0,05$) sont considérées statistiquement significatives. La comparaison des moyennes et des variances est déterminée grâce au logiciel Graphpad Prism version 5.0.

3^{ème} Partie :

Résultats et discussion

II. Résultat et discussion

2.1. Caractérisation physicochimique des margines

Les résultats de la caractérisation physicochimique des margines issues de l'huilerie moderne utilisant le système de centrifugation à trois phases sont regroupés dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Caractérisation physicochimique des margines provenant d'une huilerie moderne

Paramètre	Marges
pH (25° C)	4,88 ± 0,09
Conductivité (mS/cm)	12,2 ± 0,13
MS (%)	11,85 ± 1,50
TEE (%)	88,73 ± 0,21
MMS (g/100g)	09,91 ± 1,03
MVS (g/100g)	90,09 ± 2,36
MES (g/100 g)	28,94 ± 0,25
Matière grasse (g/100 g)	1,11 ± 0,08
Polyphénols (g/100 g)	5,29 ± 1,67
Sucres totaux (g/100 g)	11,39 ± 2,12
Sucres réducteurs (g/100 g)	3,69 ± 0,90
Protéines (g/100 g)	1,04 ± 0,06

Les valeurs du tableau représentent la moyenne de trois essais ± écart type.

2.1.1. Le pH

La valeur enregistrée est de 4,88 ; elle se situe dans la limite de la fourchette de l'intervalle de (4,7 – 5,7) cité par ZBAKH et EL ABBASI (2012), cette valeur acide est proche de celle trouvée par ESMAIL *et al.* (2014) pour les margines issus de deux régions (Ouazzane et Fès Boulman) situées au Maroc et qui est de l'ordre de 4,65 et 4,77 respectivement.

Ces résultats montrent que les margines étudiées sont des effluents acides. L'acidité des margines selon la littérature est peut être due à la présence des acides organiques comme les acides phénoliques (HAMDI, 1993) et les acides gras comme l'acide palmitique, l'acide

oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique (AMARAL et *al.*, 2008 ; ASFI et *al.*, 2012), ainsi qu'à la fermentation des sucres (HAMDI, 1991) et les réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques (ESMAIL et *al.*, 2014).

2.1.2. La conductivité

La conductivité des margines dépend de leur teneur en sels minéraux (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012). Les résultats obtenus pour les margines issues de l'huilerie moderne sont de l'ordre de $[12,2 \pm 0,13]$ mS/cm. Ces résultats sont proches des résultats obtenus par DANELLAKIS et *al.* (2011) pour des margines issues d'une huilerie localisée à Patras (Grèce) qui est de 11,28 mS/cm et supérieur par rapport aux résultats obtenus par ACHAK et *al.* (2008) pour des margines de la région de Marrakech (Maroc) qui est de l'ordre de 8,4 mS/cm.

AISSAM (2003) et ACHAK et *al.* (2011) ont mentionné que cette différence en conductivité des margines est due à la richesse naturelle des olives en sels minéraux et à l'ajout du sel lors du stockage des olives avant leurs trituration. L'ajout du sel à raison de 5 kg/100 kg d'olives lors du stockage conserve la qualité du fruit tout en inhibant le développement de microorganismes, surtout les moisissures.

2.1.3. Teneur en eau et en matière sèche

La teneur en eau dans les margines étudiées est de l'ordre de $[88,73 \pm 0,21]$ % (tableau XIX), cette dernière se situe dans l'intervalle de $[83-94]$ % pour les margines issues d'une huilerie moderne en Tunisie (NOUBIGH et *al.*, 2007).

Les taux d'humidité élevés des margines s'explique par l'eau existant habituellement dans les olives d'une part, et d'autre part, par l'eau ajoutée au cours du processus d'extraction d'huile d'olive (PROCIDA et CECCON, 2006).

La teneur moyenne en matière sèche (MS) pour les margines issues de l'huilerie moderne sont de l'ordre de $[11,85 \pm 1,50]$ % qui est équivalente 118,5 g/L de margines (tableau XIX). Cette valeur est proche de celle trouvée par ESRA et *al.* (2001) pour des margines issues d'une huilerie située à Istanbul (Turquie) qui est de $[78,2 \pm 13,6]$ g/L, et supérieure par rapport à la valeur citée par DANELLAKIS et *al.* (2011) pour des margines issues d'une huilerie située à Patras (Grèce) qui est de $[64,68 \pm 1,03]$ g/L et par rapport à celle trouvé par ACHAK et *al.* (2007) qui est de $[56,75 \pm 2,51]$ g/L.

Les variations de la teneur en matière sèche peuvent être dues à des paramètres climatiques et géologiques, à des variations botaniques, au stade de maturation de l'olive et au procédé d'extraction de l'huile (EL-ABBASSI et *al.*, 2011).

2.1.4. Teneur en matière minérale et en matière volatile sèche

La teneur moyenne des margines étudiées en matière minérale sèche (MMS) est de l'ordre de $[09,91 \pm 1,03]$ g/100g de poudre de margines qui est équivalente à 11,75 g/L (tableau XIX). Cette valeur est proche de celle trouvée par MEKKI et *al.* (2007) pour des margines tunisiennes qui est de $[10 \pm 0,43]$ g/L, et supérieure par rapport à la valeur trouvée par ACHAK et *al.* (2009) pour les margines de la région de Marrakech (Maroc) qui est de l'ordre de $[5,29 \pm 0,05]$ g/L. Cette différence est expliquée par le degré de maturation et la variété des olives (EL-ABBASSI et *al.*, 2011).

La teneur des margines en matière volatile sèche (MVS) est de l'ordre de $[90,09 \pm 2,36]$ g/100g de poudre de margines, qui est équivalente à 106,76 g/L de margines (tableau XIX). Cette valeur est plus élevée de celle trouvée par HAMDY (1993) pour des margines issues d'une huilerie localisée à Sfax (Tunisie) qui est de l'ordre de 55 g/L, et de celle rapportée par SABBABH et *al.* (2009) pour des margines de la région de Marrakech (Maroc) qui sont de l'ordre de $[11 \pm 1, 12]$ g/L. Cette différence est due aux conditions climatiques, méthodes d'extraction de l'huile d'olive ainsi qu'au temps de stockage des olives avant leur trituration (EL-ABBASSI et *al.*, 2011).

2.1.5. Teneur en matière en suspension

Les margines étudiées sont riches en matière en suspension (MES), la teneur est de l'ordre de $[28,94 \pm 0,25]$ g/100 g et elle est équivalente à 34,3 g/L de margines (tableau XIX). Cette valeur est proche de celle rapportée par ESRA et *al.* (2001) pour des margines issues d'une huilerie moderne à Istanbul (Turquie) qui est de l'ordre de $[27,6 \pm 5,1]$ g/l et supérieure à celle rapportée par FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA (1992) pour des margines d'origine espagnole qui est de l'ordre de 9 g/L.

La différence dans la teneur en (MES) est peut être due à des paramètres climatiques et géologiques, à des variations botaniques, au stade de maturation de l'olive et au procédé d'extraction d'huile (EL-ABBASSI et *al.*, 2011).

2.1.6. Teneur en matière grasse

La teneur moyenne en matière grasse (MG) résiduelle présente dans les margines étudiées est de l'ordre de $[1,11 \pm 0,08]$ g/100g de poudre de margines (tableau XIX), elle est équivalente à 1,32 g/L de margines. Cette valeur est très inférieure de celle trouvée par BILKA et *al.* (2009) en utilisant la méthode gravimétrique pour des margines issues d'une huilerie moderne à trois phases localisée à Patras (Grèce) qui est de l'ordre de $[10,78 \pm 1,39]$ g/L. En général le taux de lipides dans les margines varie de 0,03 % à 4,25 % (DERMECHE et *al.*, 2013).

La différence dans la teneur en matière grasse est en relation avec la qualité, le degré de maturation des olives et le mode de trituration (AMARAL et *al.*, 2008).

2.1.7. Teneur en polyphénols

Les margines sont caractérisées par la richesse en composés phénoliques, la teneur enregistrée pour les margines étudiées est de l'ordre de $[5,29 \pm 1,67]$ g/100g de poudre de margines, ce qui est équivalent à 6,27 g/L de margines (tableau XIX). Cette valeur dépasse largement la limite de la législation environnementale qui est de 0,5 ppm ($0,5 \times 10^{-3}$) g/L pour les polyphénols (PINTO et *al.*, 2005). Cette teneur est proche de celle trouvées dans la région de Tadla-Azilal (Maroc), des margines issues de l'extraction de l'huile des olives au stade de maturité noires de la plaine de la région et qui de l'ordre de $[5,17 \pm 0,057]$ g/L et avec le même procédé d'extraction. Alors que des valeurs supérieures ont été trouvées pour les margines issues de l'extraction de l'huile des olives noires de la montagne dans la même région et qui est de l'ordre de $[8,90 \pm 0,728]$ g/L, avec le même procédé d'extraction (LEOUIFOUDI et *al.*, 2015).

Une concentration de l'ordre de $[4 \pm 0,6]$ g/L a été trouvée par EL-ABBASSI et *al.* (2011) pour les margines de la région de Marrakech (Maroc) et avec le même procédé d'extraction.

Cependant la concentration de polyphénols trouvés dans notre étude reste supérieure par rapport à celle trouvée par DE MARCO et *al.* (2007) pour les margines de la province Benevento (Italie) qui est de l'ordre de 2,5 g/L de margines.

Cette variation de la teneur en polyphénols dépend de plusieurs facteurs qui sont : les conditions climatiques et géographiques (ZIOGAS et *al.*, 2010), l'état physiologique et l'âge de la plante (DELEONARDIS et *al.*, 2008), la température des olives avant et durant le broyage influence sur la solubilisation des polyphénols (CAPONIO et CATALANO, 2001), la variété de l'olivier, les conditions de culture et le degré de maturation des olives (FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA, 1992 ; ZIOGAS et *al.*, 2010). En général, la teneur en polyphénols, varie entre 0,63 % à 5,45 % (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012 ; DERMECHE et *al.*, 2013).

2.1.7.1. Résultats de l'analyse du profil chromatographique de l'extrait phénolique des margines

La composition des temps de rétention des composés retrouvés dans l'EPM avec ceux des différents standards a permis de mettre en évidence huit composés phénoliques représentés par le chromatogramme en annexe 13. Les temps de rétentions, concentrations et proportions (%) des composés phénoliques identifiés dans l'extrait phénolique des margines sont représentés par le tableau XXII.

Tableau XXII: Temps de rétention, concentration et proportion (%) des composés phénoliques identifiés dans l'extrait phénolique des margines

Composés phénoliques	Temps de rétention (min)	Concentration (g en EAG*/100 g margines)	Proportion (%)
Acide gallique	5,99	0,337 ± 0,040	6,37 ± 0,22
Hydroxytyrosol	7,82	2,869 ± 0,012	54,23 ± 0,22
Tyrosol	9,50	0,253 ± 0,050	4,78 ± 0,39
Acide <i>p</i> -coumarique	10,50	0,506 ± 0,010	9,56 ± 0,12
Acide protocatechique	23,10	0,759 ± 0,044	14,35 ± 0,57
Oleuropéine	41,12	0,046 ± 0,017	0,87 ± 0,36
Acide vanillique	45,98	0,084 ± 0,021	1,58 ± 0,10
Acide caféique	50,48	0,064 ± 0,007	1,21 ± 0,12
Polyphénols totaux	/	5,290 ± 1,670	100

*GAE: équivalent en acide gallique. Les valeurs du tableau représentent la moyenne de trois essais ± écart type.

La composition phénolique rapportée des margines dans la littérature est fortement variable en comparaison avec les différents travaux. En effet la fraction phénolique des margines se caractérise par une complexité importante, comme l'ont démontré BLANCO et *al.* (2003), qui ont identifié 20 composés phénoliques dans les margines par HPLC-MS-MS. Les classes prépondérantes de phénols hydrophiles identifiés comprennent les acides phénoliques, les alcools phénoliques, les dérivés sécoiridoïdes, les flavonoïdes (luteolin, luteolin-7-glucoside) et les lignanes cités par DERMECHE et *al.* (2013). Dans notre étude l'hydroxytyrosol représente le pic le plus élevé avec une proportion de l'ordre de $[54,23 \pm 0,22]$ %, ces résultats concordent avec les données de plusieurs travaux sur la caractérisation des extraits polyphénoliques des margines par HPLC UV à 280 nm et HPLC couplée à la spectrométrie de masse à 280 nm (DE MARCO et *al.*, 2007 ; ELABBASSI et *al.*, 2012 ; LEOUIFOUDI et *al.*, 2015). ELABBASSI et *al.* (2012) ont identifiés six pics par HPLC UV à 280 nm : l'acide gallique, l'hydroxytyrosol-4- β -glucoside, l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'oleuropéine aglycone. La valeur de l'hydroxytyrosol et du tyrosol rapporté par ELABBASSI et *al.* (2012) et de 3,76 g/L et 2,49 g/L en équivalent de Tyrosol/L de margines (Tyr E/L de margines) respectivement. Les proportions de l'hydroxytyrosol et du tyrosol dans cette étude est de 54,65 % et de 6,32 % respectivement avec une teneur en polyphénols totaux (PPT) égale à $6,11 \pm 0,2$ g/L de margines pour les margines marocaine issus d'une huilerie moderne à trois phase et avec le même protocole d'extraction. Les concentrations de l'hydroxytyrosol et du tyrosol trouvées dans notre étude restent élevés par rapport aux résultats retrouvés par DE MARCO et *al.* (2007) pour les margines issus d'une huilerie moderne à trois phase de la province de Benevento (Italy) et avec le même protocole d'extraction et qui sont de 1,224 g TyrE/L de margines pour l'hydroxytyrosol et de 0,208 g TyrE/L de margines pour le tyrosol.

En effet VISIOLI et *al.* (2002) a rapporté que l'hydroxytyrosol est un composé phénolique majeur dans les margines. Parmi eux, l'hydroxytyrosol (3, 4-dihydroxyphényléthanol, HT) se distingue comme un composé à forte valeur ajoutée qui est due à son activité anti-oxydante et qui est bénéfique pour la santé humaine. En plus des composés identifiés d'autres composés phénoliques sont aussi rencontrés dans la composition phénolique des margines comme l'acide sinapique, l'acide syringique, le verbascoside, l'apigénine, la quercétine, la naringénine, la rutine, la vanilline et les formes aglycones de l'oleuropéine (3,4-DHPEA-EA, 3,4-DHPEA-EDA) (LEOUIFOUDI et *al.*, 2015).

L'acide protocatechique (APC) un acide phénolique simple, chimiquement connu sous le nom d'acide 3,4-dihydroxybenzoïque a été aussi retrouvé en quantité appréciable dans les margines étudiés avec une proportion de $[14,35 \pm 0,57]$ %. Isolé pour la première fois à partir de pigments d'écaillés d'oignons (*Allium cepa*). L'acide protocatechique est l'un des composés le plus largement distribués et communs de plusieurs plantes, présents non seulement dans l'alimentation humaine comme dans le son, le riz brun et l'oignon et également retrouvé dans de nombreux fruits et fruits secs, tels que les prunes, les raisins et les noisettes. De nombreuses plantes et épices contiennent aussi de l'APC tels que l'anis étoilé (*Illicium verum*), la mélisse (*Melissa officinalis* L.), le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et la cannelle (*Cinnamomum aromaticum*). L'APC est considéré comme un composant actif de certaines plantes médicinales traditionnelles chinoises (LI et *al.*, 2011). Ce composé bioactif est connu pour ses propriétés biologiques et ses activités pharmacologiques, agissant comme ;

antioxydant, antibactérien, anticancéreux, antiulcéreux, antidiabétique, antiviellissement, anticoagulant, antiviral, anti-inflammatoire, analgésique, anti-athérosclérotique, cardioprotecteur, hépatoprotecteur, neurologique et néphroprotecteur (ABIDA KALSOOM et *al.*, 2015).

2.1.8. Teneur en sucres totaux et sucres réducteurs

La teneur moyenne en sucres totaux présente dans les margines est de l'ordre de $[11,39 \pm 2,12]$ g/100g de poudre de margines (tableau XIX), cette teneur est équivalente à 13,50 g/L de PM. Cette valeur se situe dans l'intervalle de (10 à 80) g/L cité par PROCIDA et CECCON, (2006). Elle est inférieure à celle rapportée par DANELLAKIS et *al.* (2011) pour les margines issues d'une huilerie localisée à Patras (Grèce) qui est de l'ordre de $[41,65 \pm 0,07]$ g/L et par LEULMI (2011) pour les margines issues d'une huilerie située dans la région de Jijel (Algérie) qui est de 39,91 g/L. Cette valeur dépasse légèrement l'intervalle cité par ZBAKH et EL ABBASSI (2012) qui est de 1,3 à 8,79 g/L, ce qui prouve la richesse des margines étudiées en sucres totaux. Cette teneur élevée en sucres totaux peut être expliquée par l'absence d'une fermentation pendant le stockage (HAMDI, 1991).

La teneur moyenne en sucres réducteurs dans les margines étudiées est de l'ordre de $[3,69 \pm 0,90]$ g/100g (tableau XIX), équivalente à 4,38 g/L de PM. Cette valeur est proche de celle trouvée par ESRA et *al.* (2001) pour les margines issues d'une huilerie moderne à trois phases située à Istanbul (Turquie) qui est de l'ordre de $[4,7 \pm 1,8]$ g/L.

Les glucides présents dans les margines sont essentiellement représentés par les composants pariétaux, en particulier la cellulose et les pectines, ces dernières jouent un rôle important dans la texture des olives et représentent environ 0,6 % du poids de la pulpe fraîche (GALANAKIS et *al.*, 2010a ; OBIED et *al.*, 2005). De nombreux travaux ont montré que les margines sont très riches en sucres simples. Les sucres simples les plus fréquents dans les margines sont, en particulier, le raffinose, le saccharose, l'arabinose, le xylose, le glucose, le mannose et le fructose (GALANAKIS et *al.*, 2010a ; OBIED et *al.*, 2005). Dans notre laboratoire l'étude menée par NADOUR et *al.* (2015) sur les polysaccharides contenues dans les margines local de Tizi-Ouzou (Kabylie) a conduit à leur extraction et la caractérisation biochimique de cette fraction. Cette étude a confirmé la présence dans les margines des constituants de la paroi cellulaire de l'olive comme les pectines, les hémicellulose et la cellulose avec un rendement de 20,51 g/100g de matière sèche. Les hydrolysats acides des extraits polysaccharidiques obtenues ont été caractérisés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions (HPAEC). Cette dernière a révélé la présence d'une composition hétérogène en monosaccharides. Le glucose est le monosaccharide majeur. D'autres oses neutres et acides ont été identifiés comme : le rhamnose, le galactose, l'arabinose, le mannose, le xylose et l'acide galacturonique. L'acide glucuronique et le fucose apparaissent comme des monosaccharides mineurs.

2.1.9. Teneur en protéines

La fraction protéique des margines est représentée essentiellement par les acides aminés libres avec un pourcentage variant entre 1,2 et 2,4 %. Les plus abondants sont la proline, la

glycine, l'acide aspartique et l'acide glutamique (CAPASSO et al., 2002).

La teneur en protéine obtenus dans notre étude est de l'ordre de $[1,04 \pm 0,06]$ g/100g (tableau XIX), cette fraction est équivalente à 1,24 g/ L de margines. Cette valeur est inférieure à celle trouvée par ASFI et al. (2012) pour les margines issues de Kalamata une ville située au sud de la Grèce qui est de l'ordre de $[2,67 \pm 0,75]$ g/L, et supérieure à celle trouvée par LOPES et al. (2009) pour les margines portugaises qui est de l'ordre de 0,30 g/L.

2.2. Le pouvoir antioxydant de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

2.2.1. Test de piégeage du radical DPPH•

Les profils de l'activité anti-radicalaire représentés dans la figure 31 ont révélé que l'EPM testé et la PM possèdent une activité dose dépendante, provoquant ainsi la réduction du radical DPPH• en sa forme non radicalaire DPPH-H. l'activité anti-radicalaire est classée comme suit : EPM > Trolox > Acide ascorbique > PM > Acide caféique > acide gallique. Comme le montre le tableau XXIII, l'EPM présente une activité anti-oxydante puissante avec une IC50 de $25 \pm 0,01$ µg/ml qui est plus basse que celle des standards utilisés, trolox et acide ascorbique avec des IC50 de 65 µg/ml et 80 µg/ml respectivement et des CP purs utilisés ; acide gallique et l'acide caféique avec des IC50 de 89 µg/ml et 86,8 µg/ml respectivement. Parmi les composés présents dans les margines, il a été trouvé que les composants ortho-dihydroxylés aromatiques présentent une plus grande activité anti-radicalaire sur le radical libre du DPPH, en particulier l'hydroxytyrosol (HT) et 3,4 - dihydroxyphénylacide acétique (FKI et al., 2005). FKI et al. (2005) ont prouvé que les margines pourraient être une source naturelle de substances utiles, notamment les polyphénols qui ont une action puissante sur le piégeage des radicaux superoxydes.

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire avec le DPPH, deux paramètres sont introduits et présentés dans le tableau XXI et la figure 32:

- **La concentration effective à 50% (EC50)** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel, $[EC50 = IC50 / (\text{mg de DPPH/ml})]$. La valeur de chaque EC50 exprime la concentration de l'extrait adéquate pour réduire 50 % de DPPH en solution (LOZENE et al., 2007).
- **Le pouvoir anti-radicalaire (ARP)** est inversement proportionnel à L'IC50, $(ARP=1/EC50)$.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur suivie du test de Tukey's comparaison multiples, de ces résultats a révélé une différence hautement significative entre l'activité anti-radicalaire de l'EPM par rapport au trolox et l'acide ascorbique ($p < 0,05$) (figure 32). La PM a révélé une activité anti-radicalaire comparable à celle des standards utilisés (trolox et acide ascorbique). En effet le test de Tukey's comparaison multiples, de ces résultats n'a montré aucune différence significative entre l'activité anti-radicalaire de la PM et le trolox et entre la PM et l'acide ascorbique ($p > 0,05$) (figure 32). Les résultats du test statistique de Tukey's comparaison multiples des différentes substances testées sont résumés dans l'annexe 14.

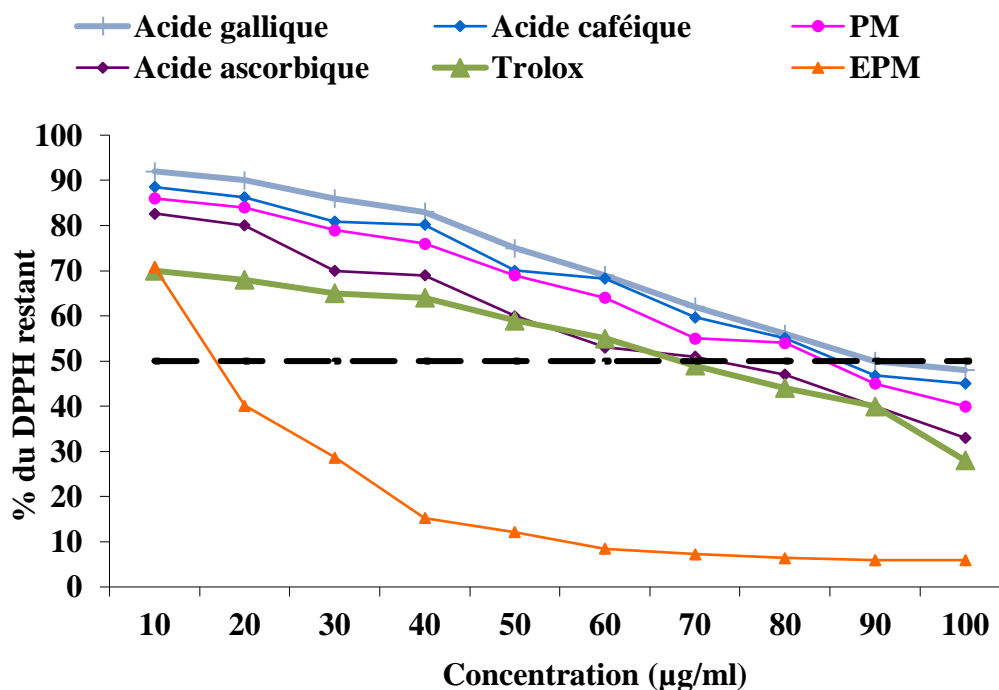


Figure 31: Pourcentages de réduction du radical DPPH• en présence des différentes concentrations des standards et de la poudre et de l'extrait phénolique de margines.

Tableau XXIII : Activité anti-radicalaire de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

Echantillon	IC50 (µg/ml)	EC50 (µg/ml)	ARP
Acide gallique	89 ± 0,010	2,23 ± 0,005	0,45 ± 0,033
Acide caféique	86,8 ± 0,005	2,17 ± 0,005	0,46 ± 0,006
PM	83 ± 0,070	2,08 ± 0,001	0,48 ± 0,006
Acide ascorbique	80 ± 0,047	2 ± 0,002	0,50 ± 0,046
Trolox	65 ± 0,02	1,62 ± 0,012	0,61 ± 0,006
EPM	25 ± 0,01	0,60 ± 0,02	1,66 ± 0,073

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± l'écart type.

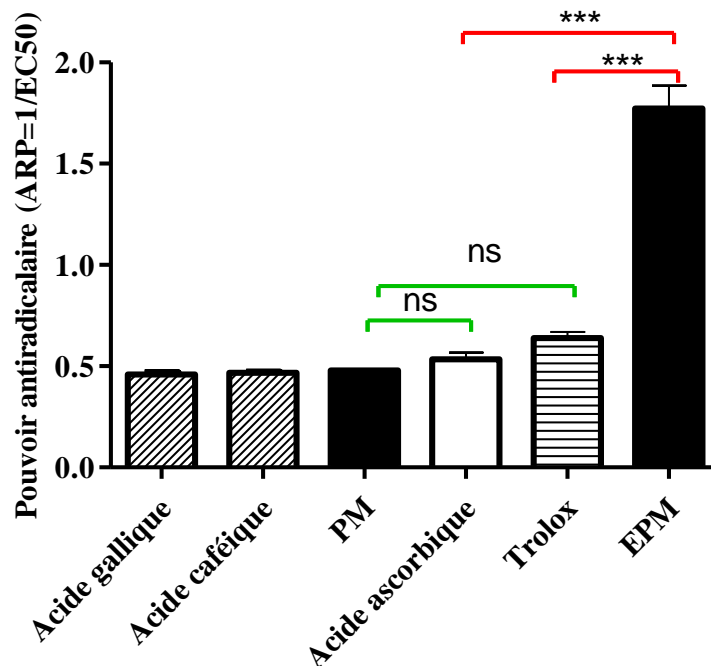


Figure 32 : Pouvoir anti-radicalaire de la poudre et de l'extrait phénolique des margines, des standards (acide ascorbique et trolox) et des acides phénoliques (acide gallique et acide caféique).***Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 essais \pm écart type. Différence significative par rapport aux standards, $P < 0,01$. **ns**: Différence non significatif ($p > 0,05$).

2.2.2. Test du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (RP)

Par ce test, la capacité de l'EPM à transformer le fer ferrique en fer ferreux a été évaluée. Ce mécanisme est connu comme un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique de la capacité anti-oxydante. Le ferricyanure de potassium est réduit en ferrocyanure par les polyphénols. En effet la combinaison des ions ferriques avec le ferrocyanure conduit à la formation d'un complexe d'une couleur verte qui absorbe dans l'UV à 700nm. Il existe une relation de proportionnalité entre les DO mesurées et l'activité anti-oxydante (ALAM et al., 2013). Le pouvoir réducteur du fer par la PM et l'EPM est illustré par la figure 33. L'EPM a présenté une activité anti-oxydante très significative et dose dépendante avec une IC50 de $11,90 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$) en comparaison avec celle des standards utilisés (Trolox et l'acide ascorbique) avec des IC50 de $20,40 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ et $13,38 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ respectivement (tableau XXIV).

Pour une concentration minimale évaluée à $20 \mu\text{g/ml}$ de chaque échantillon testé, le pouvoir réducteur de l'ion ferrique se distingue et qui peut être classé comme suit : EPM (84 %) > acide ascorbique (74,73 %) > PM (52 %) > Trolox (49 %).

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur suivie du test de Tukey's comparaison multiples, de ces résultats a révélé une différence hautement significative entre la capacité de réduction du fer de l'EPM par rapport au trolox et significative par rapport à l'acide ascorbique ($P < 0,05$). La PM a révélé une capacité de réduction du fer comparable à celle du trolox ($P > 0,05$) et une différence hautement significative à celle de l'acide ascorbique

($p < 0,05$). Les résultats du test statistique de Tukey's comparaison multiples des différentes substances testées sont résumés dans l'annexe 14.

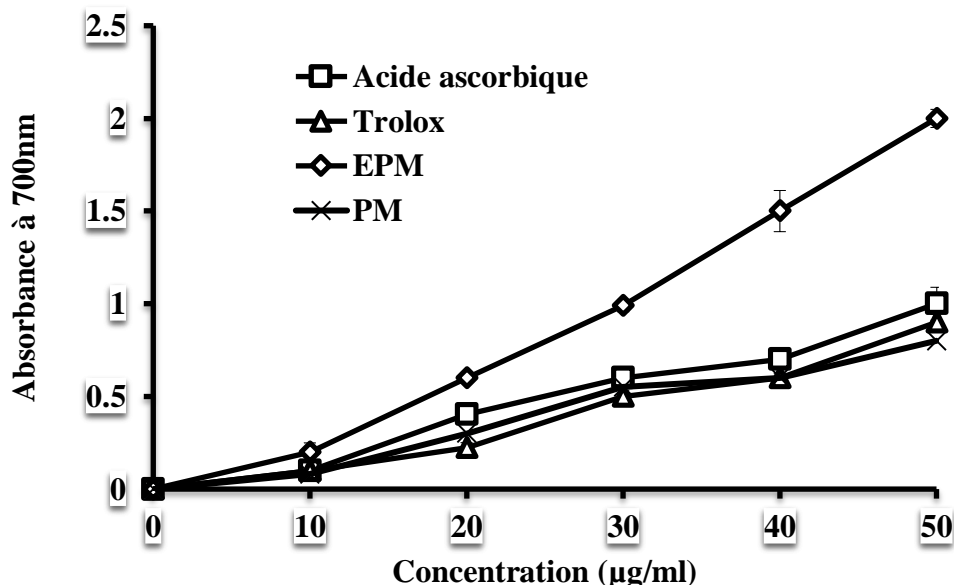


Figure 33: Le pouvoir réducteur du fer en présence des différentes concentrations de la poudre et de l'extrait phénolique des margines et des standards (acide ascorbique et trolox). Les résultats sont exprimés sur une moyenne de 3 essais.

Tableau XXIV : Pouvoir réducteur des ions ferriques exprimés en IC50 (µg/ml) en présence de la poudre et de l'extrait phénolique des margines et des standards

Echantillon	IC50 (µg/ml)
EPM	11,90 ± 0,01
Acide ascorbique	13,38 ± 0,03
PM	19,23 ± 0,04
Trolox	20,40 ± 0,08

2.2.3. Test du piégeage du radical-cation ABTS^{•+}

L'activité anti-oxydante de la PM et de l'EPM est déduite de leur capacités à inhiber le radical ABTS^{•+} comparativement aux antioxydants de référence : acide ascorbique et le trolox. La figure 34 illustre les courbes représentatives de cette activité. Cette activité se traduit par la diminution de la DO initiale du radical ABTS^{•+} dans le milieu réactionnel et qui est de 0,700 en présence des différents échantillons testés. En effet à la même concentration de 20 µg/ml et après 6 min de la réaction de l'EPM a révélé une activité anti-radicalaire de

l'ABTS^{•+} et peut être classé comme suit : acide ascorbique (86 %) > EPM (80 %) > Trolox (62 %) > PM (55 %) (Figure 35).

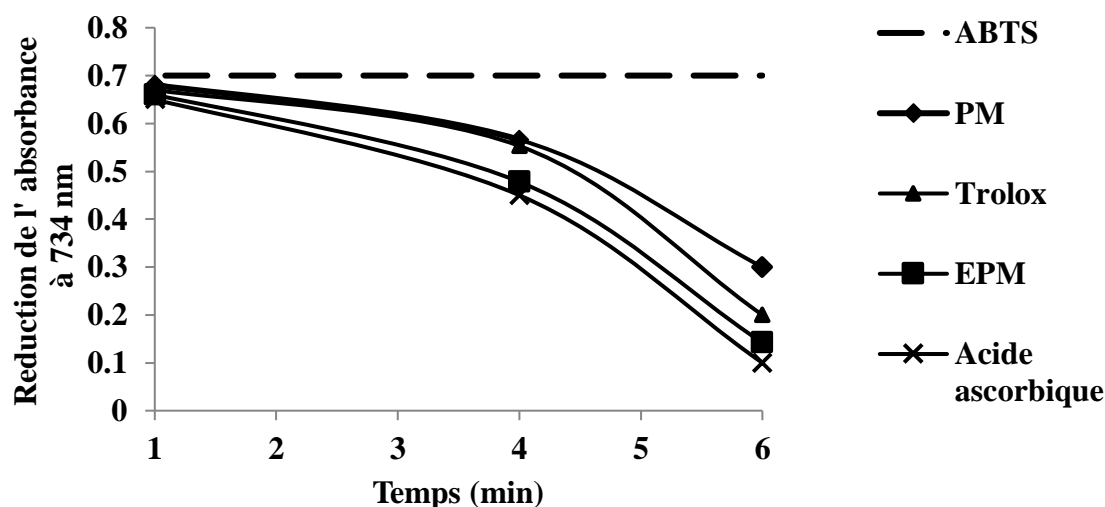


Figure 34 : Evolution de l'activité anti-radicalaire de l'ABTS^{•+} en présence des standards (acide ascorbique et Trolox), de la poudre et de l'extrait phénolique de margine au cours du temps. Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 essais.

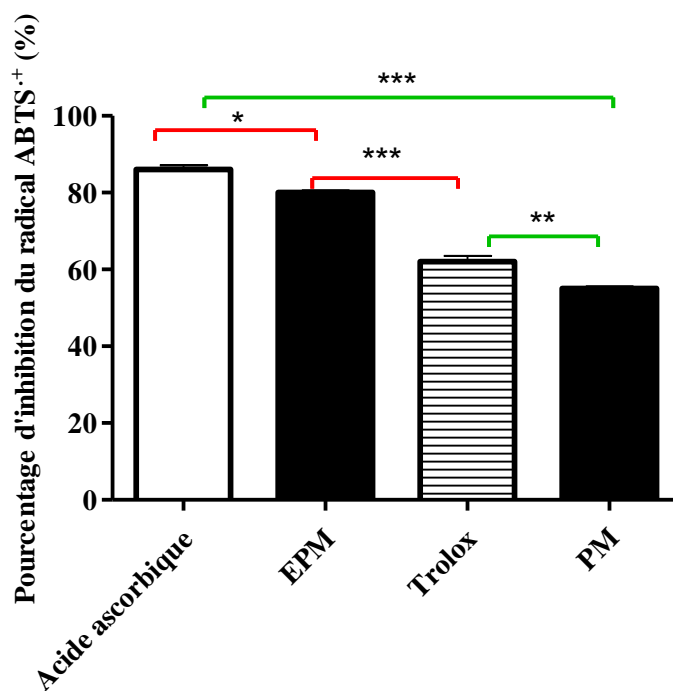


Figure 35: Pourcentage du piégeage du radical ABTS^{•+} par la poudre et de l'extrait phénolique de margine par rapport aux standards (acide ascorbique et le Trolox) après 6 minutes de la réaction.*Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 essais ± écart type. Différence significative par rapport aux standards, P <0,05.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur suivie du test de Tukey's comparaison multiples, de ces résultats a révélé une différence hautement significative entre l'activité anti-radicalaire de l'EPM par rapport au trolox et significative entre l'EPM par rapport à l'acide ascorbique ($P < 0,05$). La PM a révélé une activité anti-radicalaire très significative à celle du trolox ($P < 0,05$) et une différence hautement significative à celle de l'acide ascorbique ($P < 0,05$). Les résultats du test statistique de Tukey's comparaison multiples des différentes substances testées sont résumés dans l'annexe 14.

La capacité anti-oxydante des molécules bioactives peuvent être évaluées soit *in vivo* sur des modèles animaux soit *in vitro* en utilisant des tests qui miment leur action dans les conditions physiologiques (ALAM et al., 2013).

Pour les tests *in vivo*, les échantillons à tester sont généralement administrés aux animaux soumis à l'essai (souris, rats, etc.) avec un schéma posologique défini tel que décrit par la méthode utilisée. Après une période de temps spécifiée, les animaux sont habituellement sacrifiés et du sang ou des tissus sont utilisés pour le test. Parmi les tests utilisés on cite : la capacité réductrice du fer du plasma et la mesure de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)(ALAM et al., 2013).

Dans la littérature l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits naturels a été largement discutée (ALAM et al., 2013). Ces méthodes impliquent la présence d'espèces oxydantes comme les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydés en présence d'un extrait qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces derniers peuvent agir selon deux mécanismes majeurs : soit par transfert d'atomes d'hydrogène comme dans le cas du piégeage des radicaux peroxydes par les méthodes TRAP et ORAC, soit par transfert d'électron comme dans le cas du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (RP ou FRAP), soit en utilisant les deux mécanismes comme dans le cas du DPPH• et de l'ABTS". Les méthodes basées sur le transfert d'atomes d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à inhiber les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène alors que les méthodes basées sur le transfert d'électrons mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira les métaux, les radicaux et même les carbonyles.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un extrait naturel. La combinaison de plusieurs tests est nécessaire pour évaluer cet effet (ALAM et al., 2013). Dans la littérature beaucoup de travaux sur l'activité anti-oxydante des extraits naturels des plantes ont établis la relation entre la teneur des composés phénoliques des margines et leur activité anti-oxydante. En effet la capacité de l'activité anti-oxydante des margines et de l'EPM semble être influencée par leur teneur en polyphénols totaux (DE MARCO et al., 2007). Ces observations, selon lesquelles les composés phénoliques joueraient un rôle antioxydant très important, ont été confirmées par plusieurs auteurs (VISIOLI et al., 2001 ; DE MARCO et al., 2007 ; EL ABBASSI et al., 2012 ; LEOUIFOUDI et al., 2015) en utilisant divers tests sur l'activité anti-oxydante *in vivo* et *in vitro*. L'étude de l'activité anti-radicalaire effectuée par LEOUIFOUDI et al. (2015) en utilisant le test du piégeage du radical DPPH• a démontré que l'extrait phénolique des margines avec une concentration en polyphénols totaux de $8,9 \pm 0,728$ g/L de margines provenant de l'extraction d'olives des zones montagneuses du Maroc, était plus actif que celui provenant de l'extraction d'olives issues des plaines avec une concentration en polyphénols totaux de $5,17 \pm 0,057$ g/L de margines. Les IC 50 sont de l'ordre de $12,1 \pm 5,6$

$\mu\text{g/ml}$ et $157,7 \pm 34,9 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Les résultats de notre étude effectuée avec le même test ont montrés un haut pouvoir de piégeage du radical DPPH \cdot de l'EPM avec une IC50 de $25 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ que celle trouvée par EL ABBASSI et *al.* (2012) pour les margines marocaines issues d'une huilerie moderne à trois phase, avec le même protocole d'extraction et avec le même test (DPPH \cdot) l'IC50 est de $169 \pm 5,2 \mu\text{g/ml}$.

D'autres études ont montrées que l'activité anti-oxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait. En effet le motif d'hydroxylation du cycle aromatique joue un rôle fondamental sur la puissance de l'antioxydant (FKI et *al.*, 2005). La présence de deux groupes hydroxyle en position ortho dans l'hydroxytyrosol et l'acide caféique qui sont présents dans les margines, leur confère une activité anti-oxydante élevée, tandis que les composés phénolique possédant un seul groupe hydroxyle, tel que le tyrosol, l'acide *p*-coumarique et l'acide *p*-hydroxyphénylacétique, montrent une activité anti-oxydante inférieure (DEMARCO et *al.*, 2007; FKI et *al.*, 2005). Ainsi, l'effet antioxydant des polyphénols n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (BALASUNDRAM et *al.*, 2006). Toutefois il est important de mentionner dans cette étude dans le cas des margines brutes ou PM que la teneur en composés phénoliques totaux n'est pas toujours corrélée avec l'activité anti-oxydante, mais également à la présence d'autres constituants à potentiel antioxydant (NADOUR et *al.*, 2015). En effet l'étude menée par NADOUR et *al.* (2015) de la fraction polysaccharidique issue des margines locale de Tizi-Ouzou(Kabylie) a démontré une grande capacité à piéger plusieurs espèces radicalaires telles que le radical hydroxyle avec le test du piégeage du radical hydroxyle et le radical DPPH \cdot par le test du DPPH. Les IC50 obtenues sont de l'ordre de $158,70 \pm 4,03 \mu\text{g/ml}$ et de $89,43 \pm 2,65 \mu\text{g/ml}$ respectivement comparativement à l'acide ascorbique utilisé comme standard dans les IC50 sont de l'ordre de $28,03 \pm 1,50 \mu\text{g/ml}$ et de $28,45 \pm 0,75 \mu\text{g/ml}$ respectivement. L'activité anti-oxydante des polysaccharides des margines s'expliquent par la présence de nombreux groupes hydroxyles libres dans la structure des polysaccharides et très probablement par la présence de CP résiduels.

2.3. Etude microbiologique *in vitro* et *in situ*

2.3.1. Résultats du test *in vitro*

2.3.1.1. Criblage de la production d'aflatoxines de la souche testée sur milieu CAM et par chromatographie sur couche mince

Dans le milieu CAM, les aflatoxines (AFs), combinées aux matières grasses de noix de coco, donnent une fluorescence visible sous UV (365 nm) surtout sur le revers du mycélium. En effet, après 5 jours d'incubation à 28 °C, la souche test productrice d'aflatoxine B développe autour du mycélium une fluorescence bleue, visible sous lumière UV à 365 nm et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour. La production des AFs a été confirmée par CCM après développement de la plaque de l'extrait d'AF par le biais du système solvant (Chloroforme/Acétone : 90/10, v/v) et la visualisation de cette dernière sous UV à 365 nm. Des taches bleues apparaissent sur la plaque correspondent aux AFB. Rappelons qu'*Aspergillus flavus* produit les AFs (B1 et B2).

2.3.1.2. Concentration minimale inhibitrice, biomasse et nature de l'activité de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

Une diminution de la croissance du mycélium fongique en présence des concentrations croissantes de PM et l'EPM a été observée dans la présente étude après 7 jours d'incubation sur milieu SMKY (figure 36 et figure 37).

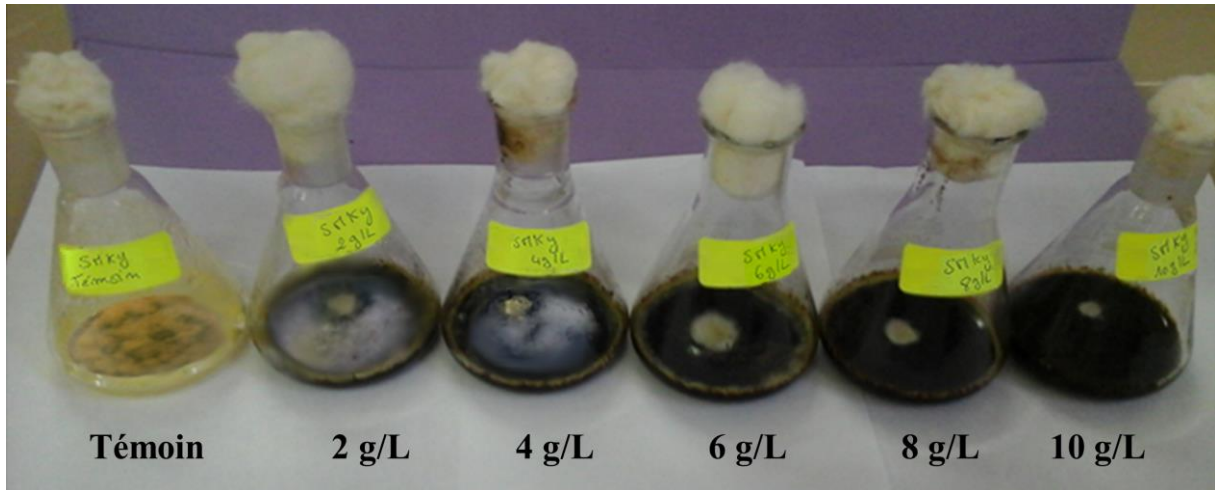


Figure 36: Inhibition de la croissance d'*A. flavus* par la poudre de margine après 7 jours d'incubation à 28 °C sur milieu SMKY

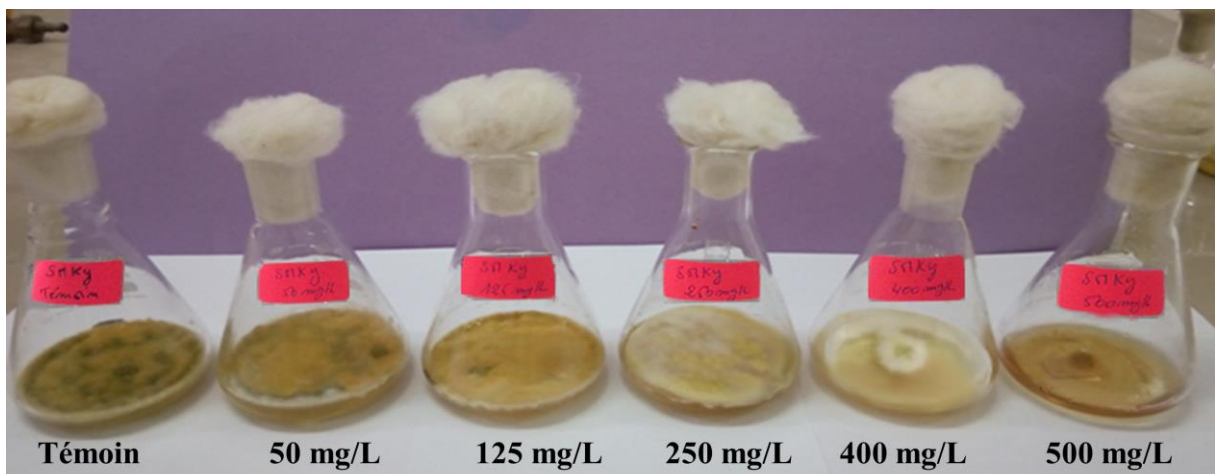


Figure 37: Inhibition de la croissance d'*A. flavus* par l'extrait phénolique après 7 jours d'incubation à 28 °C sur milieu SMKY

L'inhibition complète de la croissance mycélienne a été établie à partir de la biomasse du mycélium. Cette inhibition totale correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est de 10 g/L pour la poudre de margines (tableau XXV et figure 36) et de 500 mg /L pour l'EPM (tableau XXVI et figure 37). L'étude statistique a démontré, que cette diminution du poids du mycélium est très hautement significative avec $Pvalue < 0,001$.

Tableau XXV: Capacité d'inhibition de la poudre de margine de la biomasse du mycélium (g) de la souche toxigénique *A. flavus* dans le milieu SMKY

Concentration Poudre de margines (g/L)	Biomasse du mycélium (g)	Pourcentage de réduction (%)
0	0,26 ± 0,05*	0
2	0,18 ± 0,03	30,8
4	0,14 ± 0,02	46,2
6	0,10 ± 0,01	61,5
8	0,06 ± 0,01	76,9
10	0,00 ± 0,00	100

*Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 essais ± écart type. Différence significative par rapport au contrôle, $P < 0,05$.

Tableau XXVI: Capacité d'inhibition de l'extrait phénolique des margines de la biomasse du mycélium (g) de la souche toxigénique *A. flavus* dans le milieu SMKY

Concentration Extrait phénolique (mg/L)	Biomasse du mycélium (g)	Pourcentage de réduction (%)
0	0,26 ± 0,05*	0
50	0,22 ± 0,01	15,4
125	0,19 ± 0,01	23
250	0,13 ± 0,00	50
400	0,12 ± 0,00	69,2
500	0,00 ± 0,00	100

*Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 essais ± écart type. Différence significative par rapport au contrôle, $P < 0,05$.

La PM et l'EPM ont exercé une activité antifongique remarquable aussi bien sur la croissance du mycélium que sur la sporulation. Cette activité puissante est en relation avec l'interaction des différents constituants actifs des margines, pour ce qui est de l'EPM, l'activité est due aux polyphénols totaux (ESMAIL et *al.*, 2015).

Jusqu'à l'heure actuelle, aucune étude n'a été réalisée sur l'activité antifongique de la PM obtenue par lyophilisation, alors que des études ont été réalisées sur l'activité antibactériennes des margines marocaine concentrés par évaporation dans une étuve à 103 °. Cet avec la méthode de diffusion en milieux solides Muller Hinton (MH) et sabouraud (SB) sur des bactéries à l'origine d'infection urinaire gram+ et gram- (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter sp*) et contre une souche de levure à l'origine d'infection vaginale (*Candida albicans*) (ESMAIL et *al.*, 2015). Pour les EPM issus d'une huilerie à trois phases de la région de la Kabylie, des études ont été effectués sur l'activité antifongique de deux souches fongiques pathogènes *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* avec la méthode de contact direct sur milieu CAM (SENANI et MATI MOULTI, 2012). Beaucoup d'études ont été faites sur l'activité antifongique des huiles essentielles (H.E) (LI et *al.*, 2016). Les travaux de SRIVASTAVA et *al* (2008) sur les huiles essentielles ont montré une inhibition totale de la croissance du mycélium d'*Aspergillus flavus* sur milieu SMKY à des concentrations de 1000 ppm (mg/L) avec l'huile essentielle *Cinnamomum camphora* et *Alpinia galanga*, une autre étude réalisée par TATSADJIEU et *al* (2008) a montré une inhibition incomplète de la croissance mycélienne sur milieu SMKY à des concentrations de 1000 ppm avec les huiles essentielles suivantes *Plectranthus glandulosus* et *Ocimum gratissimum*. Le poids sec du mycélium était de [0,502 ± 0,00] g pour *Ocimum gratissimum* et de [0,503 ± 1,14] g pour *Plectranthus glandulosus*, alors qu'il est de [0,00 ± 0,00]g dans notre étude (100 % d'inhibition) pour les concentrations de 500 mg/L (500 ppm) d'EPM et de 10 g/L pour la poudre de margines.

2.3.1.3. Test anti-aflatoxinogène

Parallèlement au test de mesure de la biomasse réalisé sur milieu SMKY, un autre test complémentaire a été effectué sur le même milieu afin de mesurer les potentialités antifongiques que possèdent la PM et l'EPM sur la production des aflatoxines par *A. flavus*, connue par ces immenses potentialités à produire des mycotoxines dont les plus toxiques sont les aflatoxines B1 (LI et *al.*, 2016). La CCM n'a révélé aucune production d'aflatoxines pour les concentrations testées de 8 g/L et 10 g/L pour la poudre de margines et pour les concentrations testées de 400 mg/L et 500 mg/L pour l'EPM par rapport au témoin (figure 38). Ce résultat est dû, soit à l'inhibition totale de la production d'aflatoxines par les concentrations utilisées, soit à la très faible quantité d'aflatoxines produites non détectées par CCM. En effet l'AFB1 peut être mesurée par cette technique à des concentrations comprises au mieux entre 5 et 10 µg/kg (AFSSA, 2009). Les spots obtenus au niveau du témoin sur le chromatogramme de la figure 38 confirment la présence de production d'aflatoxines par la souche testée par rapport aux concentrations testées.

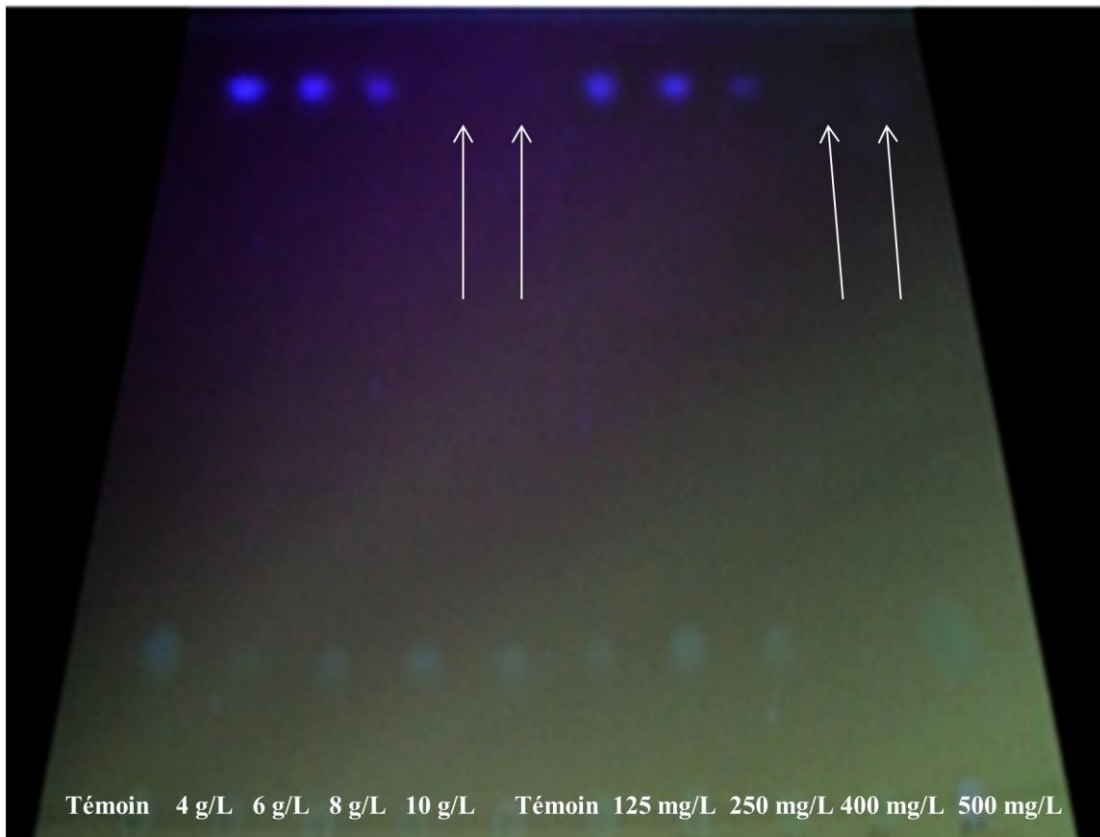


Figure 38: Photographie du chromatogramme obtenu sur les extraits d'aflatoxines de la culture d'*A. flavus* sur milieu SMKY en présence ou absence de la poudre et de l'extrait phénolique de margines (révélation à l'UV à 365 nm). Les flèches précisent l'absence de fluorescence.

TATSADJIEU et *al* (2008) a rapporté que l'inhibition de la production d'aflatoxine ne peut être attribuée à une insuffisance de croissance, en effet, la baisse de la production de l'aflatoxine B1 n'est pas en relation avec la croissance du mycélium.

Les travaux de SARIVASTAVA et *al.* (2008) sur les huiles essentielles (HE), ont montré que la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus* enregistrée de $[0,28 \pm 0,01]$ g en présence d'une concentration de 750 ppm de l'huile essentielle de *C. camphora* a permis d'enregistrer une absence totale de production d'aflatoxine B1 par rapport au témoin avec une croissance mycélienne de $[0,54 \pm 0,01]$ g. Dans notre étude la concentration de 250 mg/L (ppm) d'EPM a permis une réduction de la production d'aflatoxines avec une croissance mycélienne de $[0,13 \pm 0,005]$ g et une absence totale de production d'AFB avec une croissance mycélienne de $[0,08 \pm 0,005]$ g par rapport au témoin qui est de $[0,26 \pm 0,005]$ g. MOHAMMEDI et *al* (2010), a aussi enregistré un effet inhibiteur de biomasse et de la production d'AF et qui est dose-dépendant avec l'HE de *Thymus Fontanesii* récoltés dans la région nord-ouest de l'Algérie. Ces résultats enregistrés expliquent une relation de proportionnalité entre la réduction de la biomasse et la production des aflatoxines (SARIVASTAVA et *al.*, 2008).

2.3.2. Résultat du test *in situ*

2.3.2.1. Choix de la matrice alimentaire

La prédominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminant les céréales a été mise en évidence dans les études réalisées par RIBA et *al.* (2008) en Algérie, et par TAHANI et *al.* (2008) au Maroc. Par ailleurs, TABUC (2007) et SREENIVASA et *al.* (2011) dans leur étude sur la flore prédominante au niveau des céréales produites dans le sud-est de la Roumanie, du Vietnam et Karnataka (Inde) respectivement confirment que le genre *Aspergillus* est le contaminant majeur du maïs avec une grande prévalence de l'espèce d'*Aspergillus flavus* avec un pourcentage de 53,52 % et 46,2 %. La figure 39 illustre la croissance d'*Aspergillus flavus* *in situ* sur des grains de maïs humidifiés à 30 % et après 7 jours d'incubation à 28 °C.

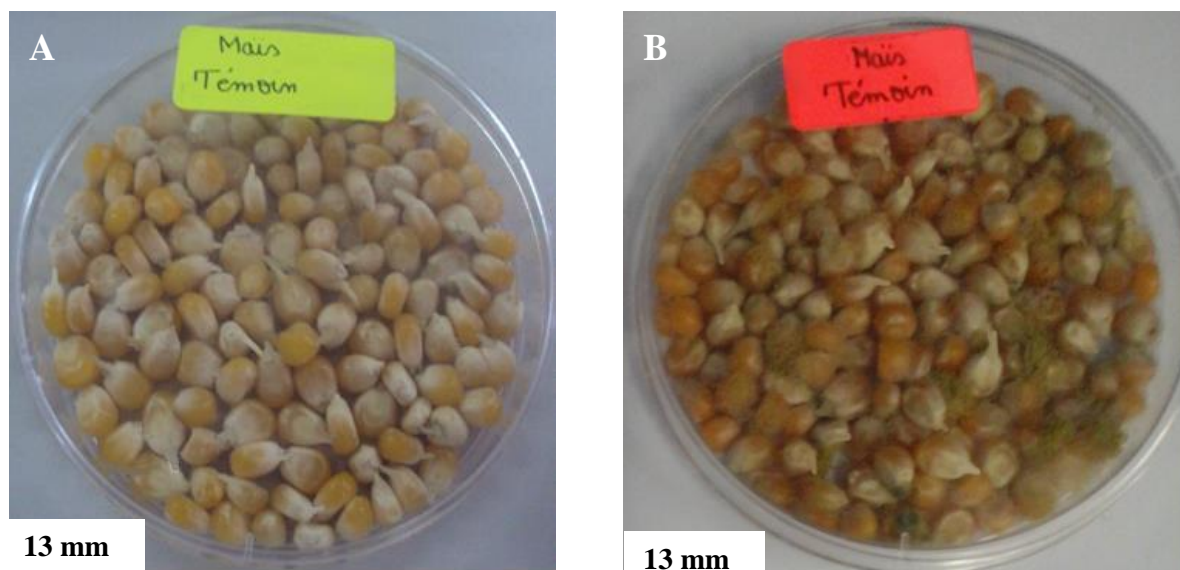


Figure 39: Croissance de la souche *Aspergillus flavus* (B) sur des grains de maïs humidifiés à 30 % et après 7 jours d'incubation à 28 °C. (A) représente des grains de maïs non contaminés par *Aspergillus flavus*, humidifiés à 30 % et après 7 jours d'incubation à 28 °C.

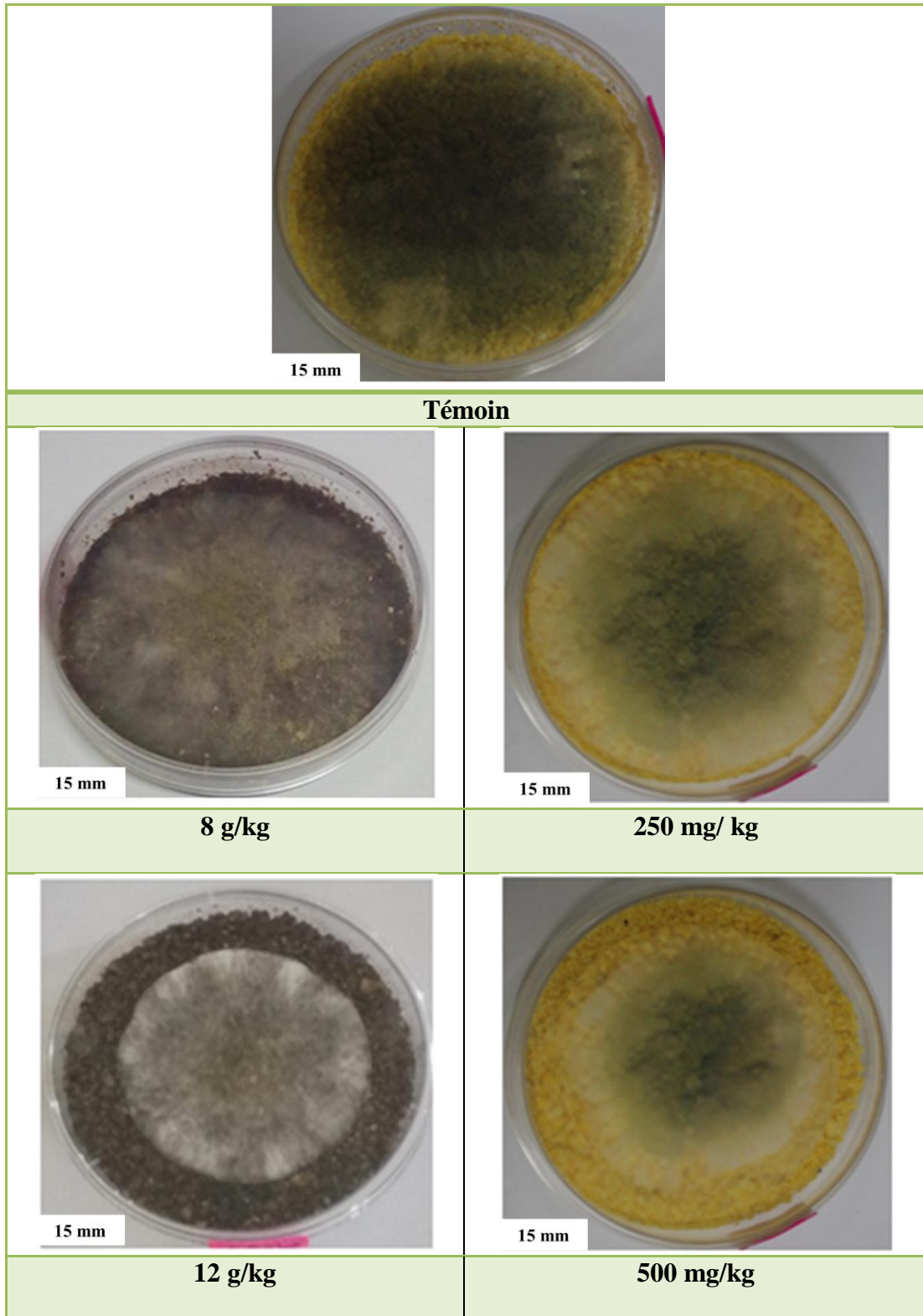
2.3.2.2. Humidité

D'après les résultats obtenus par l'humidimètre à infrarouge, la valeur moyenne obtenue est de $11,50 \pm 0,97$ %. SULTANA et *al.* (2015) a rapporté que l'humidité initiale du maïs est de 11,10 %, ce résultat est semblable à celui trouvé dans notre étude.

2.3.2.3. Effet antifongique et anti-aflatoxinogène de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur le maïs broyé et contaminé par *Aspergillus flavus*

2.3.2.3.1. Test antifongique

La figure 40 consigne les résultats obtenus sur l'effet de la PM et l'EPM sur la croissance d'*Aspergillus flavus* *in situ* après une incubation de 7 jours.



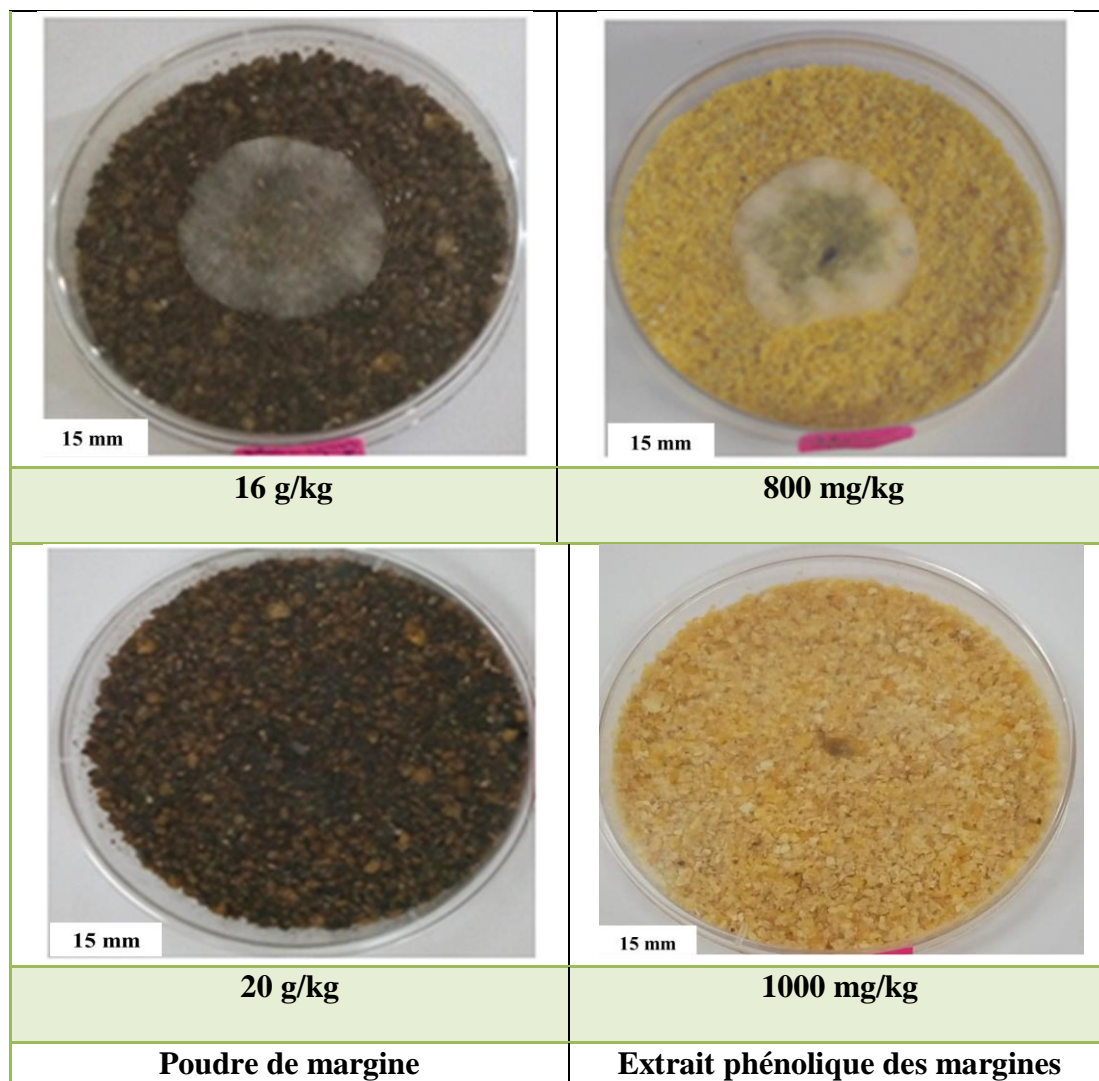


Figure 40: Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la croissance d'*Aspergillus flavus* sur le maïs broyé humidifiés à 30 % et après une incubation de 7 jours à 28 °C.

La figure 40 montre une inhibition de la sporulation à partir de 12 g/kg pour la PM et 800 mg/kg pour l'EPM.

Les résultats obtenus *in situ* montrent bien une diminution du diamètre de croissance d'*Aspergillus flavus* avec la PM et l'EPM (figure 40). Cette diminution indique une activité antifongique importante. En effet aucune croissance n'a été observée aux concentrations de 20 g/Kg pour la PM et à une concentration de 1 g/kg pour l'EPM.

L'analyse de variance ANOVA a démontré que les concentrations 8 g/Kg de la PM et de 250 mg/kg de l'EPM n'ont pas d'effet inhibiteur sur la croissance d'*Aspergillus flavus* ($Pvalue > 0,05$), alors que les autres concentrations ont un bon effet inhibiteur ($Pvalue < 0,05$). Les pourcentages d'inhibition d'*Aspergillus flavus* de la PM et de l'EPM sont consignés dans les tableaux XXVII.

Tableau XXVII: Pourcentages (%) d'inhibition de la poudre et de l'extrait phénolique de margines sur la souche *A.flavus* après 7 jours d'incubation à 28 °C sur maïs broyé.

Traitement	Concentration	Diamètre (mm)	Inhibition (%)
Concentration de l'EPM en (mg/kg)	0	79 ± 0,88*	/
	250	79 ± 0,44	0
	500	65 ± 0,04	17,7
	800	38 ± 0,71	51
	1000	00 ± 00	100
Concentration de PM en (g/kg)	0	79 ± 0,88*	/
	8	80 ± 0,04	0
	12	67 ± 0,44	15,2
	16	39 ± 0,04	50,6
	20	00 ± 00	100

/ : Absence d'inhibition pour le témoin sans EPM et sans PM.

*Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 essais ± écart type. Différence significative par rapport au contrôle, $P < 0,05$.

D'après les résultats obtenus avec la PM et l'EPM, le pourcentage d'inhibition a atteint au bout du septième jour une valeur de 100 % pour une concentration de 20 g/Kg en présence de la PM et aussi pour une concentration de 1000 g/kg pour l'EPM. Des résultats similaires ont été rapportés par BLUMA et al (2008), un pourcentage d'inhibition de 100 % est obtenu à une concentration de 1000 ppm (mg/kg) en présence de 5 huiles essentielles : *Pimpinella anisum L*, *Peumus boldus*, *Hedeoma multiflora*, *Syzygium aromaticum L* et *Lippia turbinata*.

2.3.2.3.2. Test anti-aflatoxinogénique

La chromatographie sur couche mince de la PM a permis de séparer plusieurs spots, apparus sous formes de taches colorées après révélation sous lumière UV à une longueur d'onde de 365 nm. Les spots correspondant à l'aflatoxine B donnent une fluorescence bleue (figure 41).

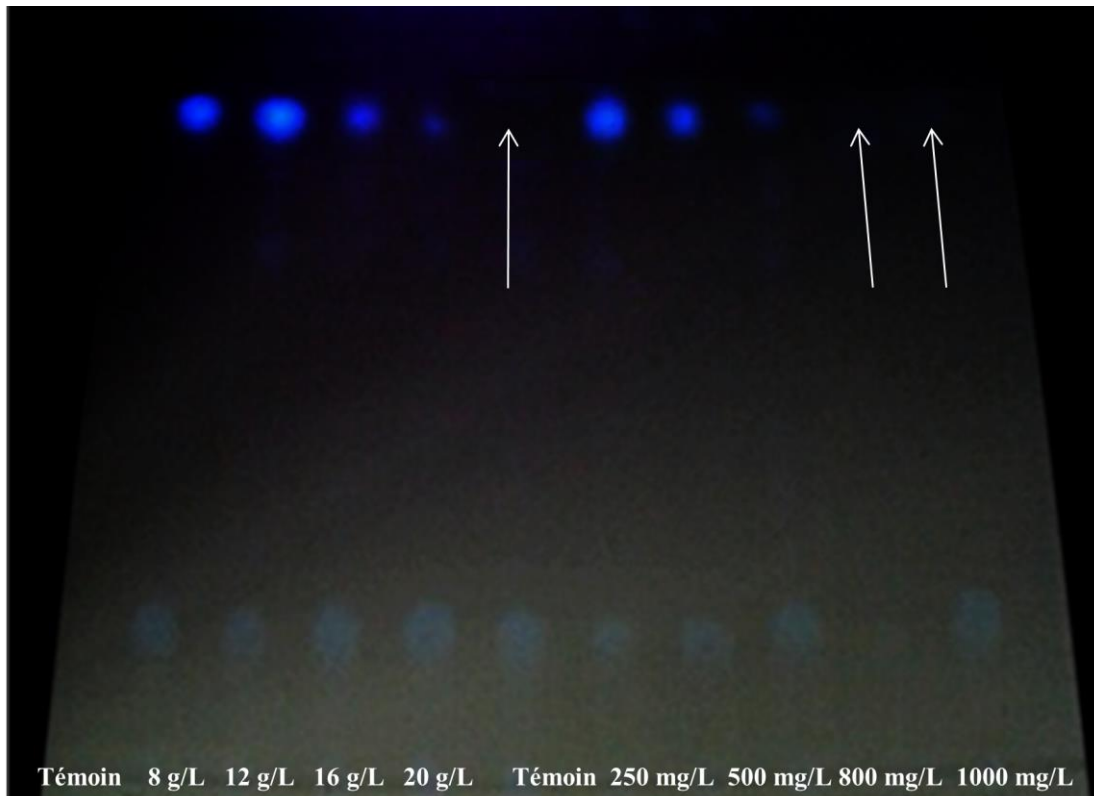


Figure 41: Photographie du chromatogramme obtenu des extraits d'aflatoxines de la culture d'*A. flavus* sur la poudre de maïs en présence ou en absence de la poudre et de l'extrait phénolique de margines (révélation à l'UV à 365 nm)

Sur le chromatogramme de la figure 41 nous avons observé l'effet de la PM et l'EPM sur la production d'aflatoxines. En effet, l'apparition d'un spot à la concentration de 8 g/Kg et une diminution progressive de celui-ci pour les concentrations 12 g/Kg et 16 g/kg jusqu'à une disparition complète de la tâche à la concentration de 20 g/kg pour la PM. Le même effet a été aussi observé pour l'EPM pour les concentrations de 250, 500 mg/kg jusqu'à une disparition complète de la tâche à la concentration de 800 mg/kg et 1000 mg/kg. L'étude réalisée par contact direct de cinq types d'huiles essentielles sur des grains de maïs contaminés par *Aspergillus flavus* par BLUMA et ETCHEVERRY (2008), afin d'inhiber la production d'aflatoxine *in situ* a montré que l'huile essentielle *Pinpinella anisum L.* (anis) n'a aucun effet inhibiteur sur la production d'aflatoxine B1, alors que les huiles : *Hedeoma multiflora Benth* (thym des montagnes) et *Syzygium aromaticum L.* (Clou de girofle) ont un effet inhibiteur à la concentration de 1000 ppm (mg/kg), les huiles : *Lippia turbinata* (poleo) et *Pêumus boldus Mol* (boldus) ont un effet inhibiteur 2000 (mg/kg). Les résultats de cette étude ont démontré que nos produits sont très actifs contre la production de l'aflatoxine B1 et à de faibles concentrations.

2.3.3. Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la germination du maïs

La PM et l'EPM ont un effet inhibiteur sur la germination du maïs (figure 42)

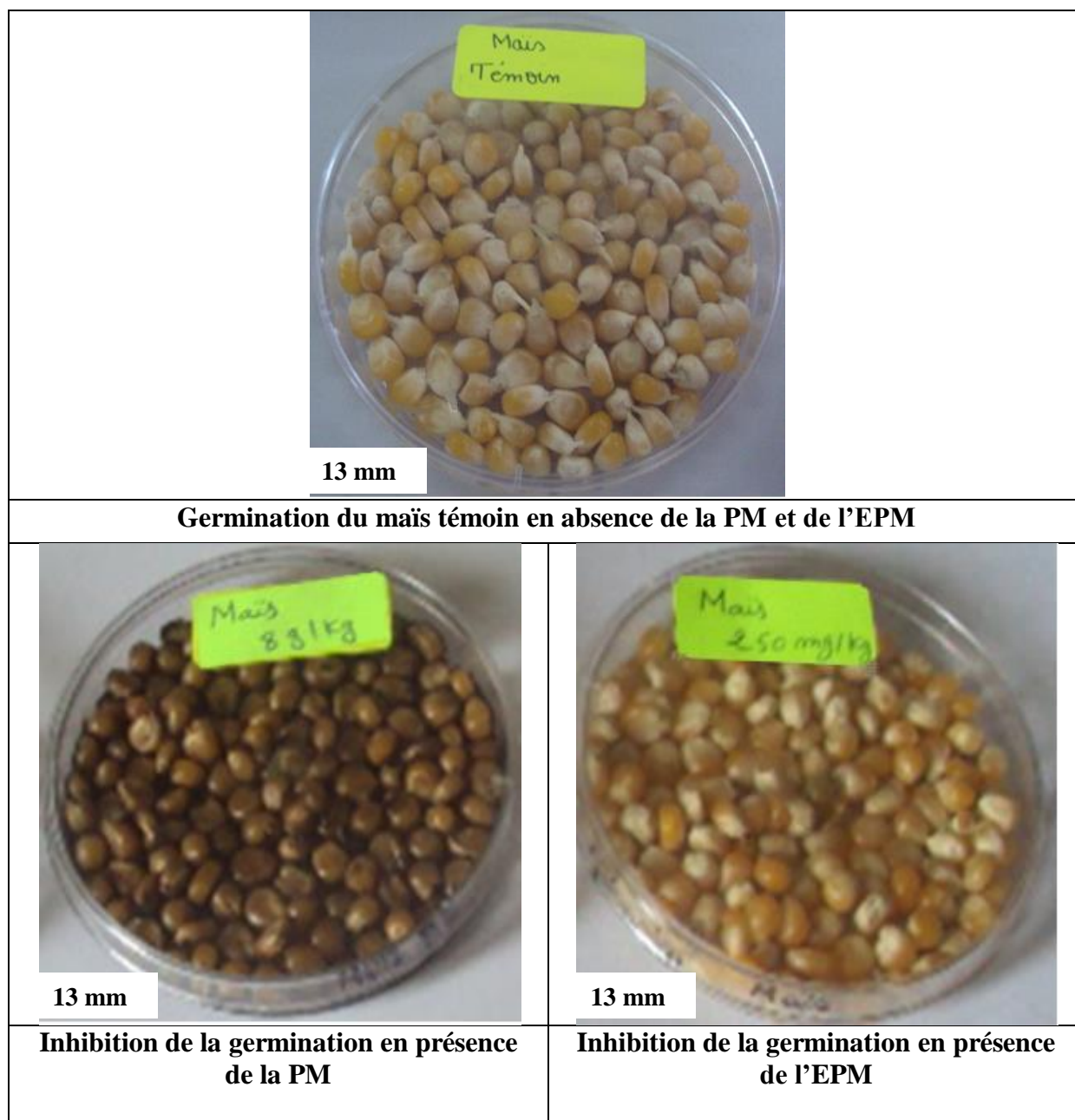


Figure 42: Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la germination des grains de maïs après humidification à 30 % et incubation pendant 7 jours à 28 °C par apport au témoin sans PM et EPM.

La germination du maïs est une phase physiologique qui correspond à la transition de la phase de vie latente de la graine sèche à la phase de développement de la plantule. Le processus de germination commence dès que la graine sèche est hydratée. Cette germination a un effet négatif sur la durée de conservation ainsi que sur la valeur nutritionnelle (BEWLEY, 1997). La PM ainsi que l'EPM ont exercé un effet inhibiteur de la germination des graines à

de faible concentration, 8 g/Kg pour la poudre et à 125 mg/Kg pour l'EPM. Le même fait a été rapporté par MEKKI et *al.*(2008).

2.3.4. Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la production de l'aflatoxine B1 par le test ELISA compétition directe

2.3.4.1. Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la production de l'aflatoxine B1 sur milieu SMKY par le test d'ELISA compétition directe

Parallèlement aux tests d'activité effectués sur la croissance de la souche fongique un autre test complémentaire a été effectué afin de mesurer les potentialités de la PM et de l'EPM sur la production d'AFB1 par *Aspergillus flavus*. Cette souche est connue pour ces immenses potentialités à produire des mycotoxines dont les plus toxiques sont les AFs. La production de l'AFB1 est mesurée après une durée d'incubation de 7 jours et les résultats sont donnés dans le Tableau XXVIII.

Tableau XXVIII : Teneur et pourcentage de production de l'AF B1 en présence de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur milieu SMKY

Traitement	Concentration	Teneur en AFB1 (ppb)	Inhibition de la production de l'AFB1 (%)
PM (g/L)	0	130,68 ± 0,46*	/
	4	110,10 ± 0,13	15,73
	6	60 ± 0,23	54,07
	8	0,00 ± 0,00	100
	10	0,00 ± 0,00	100
EPM (mg/L)	0	130,68 ± 0,46*	/
	125	90,56 ± 0,83	30,68
	250	8,00 ± 0,24	93,87
	400	0,00 ± 0,00	100
	500	0,00 ± 0,00	100

/ : Absence d'inhibition pour le témoin sans EPM et sans PM.

*Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 essais ± écart type.*Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 essais ± écart type. Différence significative par rapport au contrôle, $P < 0,05$. La limite de quantification (LQ) estimée pour la méthode est de 1 ppb pour le maïs.

Les résultats enregistrés expliquent une relation proportionnelle entre les biomasses et les aflatoxines, qui est dose-dépendante. En effet l'augmentation de la concentration de la PM et de l'EPM dans le milieu de culture SMKY, induit une réduction de la biomasse mycélienne

accompagnée d'une baisse dans la production de l'AFB1 jusqu'à son inhibition totale aux concentrations de 10 g/L et 500 mg/L pour la PM et l'EPM respectivement. La PM ainsi que l'EPM ont montré une activité remarquable aussi bien sur la croissance que sur la production de l'AFB1 sur milieu SMKY. Les pourcentages de réduction de l'AFB1 est de 100 % pour les concentrations maximales de 8 g/L, 10 g/L pour la PM et de 400 mg/L, 500 mg/L pour l'EPM.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur suivie du test de Tukey's comparaison multiples, de ces résultats a révélé une différence hautement significative entre l'activité anti-aflatoxinogène des différentes concentrations testées (125, 250, 400 et 500 mg/L) d'EPM par rapport au témoin sans EPM sur milieu liquide (SMKY) ($P < 0,05$). La PM a révélé une activité anti-aflatoxinogène très significative à la concentration de 4g /L par rapport au témoin sans PM et une différence hautement significative à celle du témoin sans PM des autres concentrations testées (6, 8 et 10 g/L) de PM ($P < 0,05$). Les résultats du test statistique de Tukey's comparaison multiples des différentes substances testées sont résumés dans l'annexe 14.

2.3.4.2. Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la production de l'aflatoxine B1 sur le maïs broyé par le test d'ELISA compétition directe

Les résultats enregistrés expliquent une relation proportionnelle entre les biomasses et les aflatoxines, qui est dose-dépendante. En effet l'augmentation de la concentration de la PM et de l'EPM dans le milieu de culture SKMY, induit une réduction de la biomasse mycélienne accompagnée par une baisse dans la production de l'AFB1 jusqu'à son inhibition totale aux concentrations de 20 g/kg et 1000 mg/kg pour la PM et l'EPM respectivement. Les substances végétales ou naturelles exercent une action directe et indirecte sur la biosynthèse des AFs. La PM ainsi que l'EPM ont démontré une activité remarquable aussi bien sur la croissance que sur la production de l'AFB1 sur le maïs broyé. Les pourcentages de réduction de l'AFB1 est de 100% pour les concentrations maximales de 20 g/kg pour la PM et de 1000 mg/kg pour l'EPM. La production de l'AFB1 est mesurée après une durée d'incubation de 7 jours et les résultats sont donnés dans le Tableau XXIX.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur suivie du test de Tukey's comparaison multiples, de ces résultats a révélé une différence hautement significative entre l'activité anti-aflatoxinogène des différentes concentrations testées (250, 500, 800 et 1000 mg/kg) d'EPM par rapport au témoin sans EPM sur le maïs broyé ($P < 0,05$). La PM a révélé une activité anti-aflatoxinogène une différence hautement significative à celle du témoin sans PM des concentrations testées (12, 16 et 20 g/L) de PM ($P < 0,05$). À faible concentration 8g /kg la PM n'a montré aucune inhibition de production d'AFB1 par rapport au témoin ($P > 0,05$). Les résultats du test statistique de Tukey's comparaison multiples des différentes substances testées sont résumés dans l'annexe 14.

Tableau XXIX: Teneur et pourcentage de production de l'AF B1 en présence de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur maïs broyé

Traitement	Concentration	Teneur en AFB1 (ppb)	Inhibition de la production de l'AFB1 (%)
PM (g/Kg)	0	360,01 ± 0,12*	/
	8	520 ± 1,13 ^{ns}	0
	12	130,26 ± 0,70	63,82
	16	6,75 ± 0,81	98,13
	20	0,00 ± 0,00	100
EPM (mg/Kg)	0	360,01 ± 0,12*	/
	250	140,00 ± 0,45	61,11
	500	6,00 ± 0,40	98,33
	800	0,00 ± 0,00	100
	1000	0,00 ± 0,00	100

/ : Absence d'inhibition pour le témoin sans EPM et sans PM. *Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 essais ± écart type. Différence significative par rapport au contrôle, $P < 0,05$. **ns** : Différence non significatif ($p > 0,05$). La LQ estimée pour la méthode est de 1 ppb pour le maïs.

L'ELISA est une méthode de détection assez simple pour un personnel avec un peu d'entraînement, rapide et moins coûteuse que l'HPLC. En effet, les délais pour une chromatographie liquide couplée avec une spectrométrie de masse sont de 15-20 jours voir même plus lorsque qu'il s'agit de plusieurs échantillons, alors que faire un test ELISA prend quelques heures (1 heure 30 min minimum). L'étape d'extraction ne demande pas un matériel de laboratoire très sophistiqué. En outre, les résultats obtenus sont visuels, les plaques de lecture permettant d'obtenir des données quantifiées et d'améliorer les limites de détection (HUYBRECHTS et al., 2013).

Même si les analyses par chromatographie sont plus sensibles et spécifiques que l'ELISA, TAKAGI et al. (2011) ainsi que LIU et al. (2013) ont montré qu'il y avait une bonne corrélation entre l'ELISA et l'HPLC. Il est donc possible d'utiliser ce test comme une alternative à l'HPLC. Cependant la possibilité de présence de réactions croisées est élevée lorsqu'il s'agit d'une matrice alimentaire. En effet les molécules chimiquement proches de la mycotoxine recherchée peuvent être dosées en même temps que cette dernière. Elles sont à l'origine de la surestimation des résultats donnés par un kit. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser ces kits en complément des méthodes chromatographiques. Ainsi, si un échantillon est positif après analyse rapide, il est bon de le valider par chromatographie à haute performance (WACOO et al., 2014).

De nombreux chercheurs ont tenté de tirer parti des propriétés phytotoxiques et antimicrobiennes des margines en les utilisant en agriculture comme bio-pesticide pour la protection des cultures à la place des herbicides, insecticides, fongicides chimiques contre de nombreuses maladies qui touchent les plantes et qui affectent les cultures (YANGUI *et al.*, 2010, LARIF *et al.*, 2013, ESMAIL *et al.*, 2015). Le présent travail est la première étude montrant les effets protecteurs des margines sous forme de PM et de son extrait polyphénolique contre la souche aflatoxinogène *A.flavus*. Des réductions significatives de la croissance mycélienne et de la synthèse d'AFB1 ont été démontrées.

La flétrissure verticillienne est une maladie cryptogamique causée par des champignons du genre *Verticillium* qui pénètrent dans les végétaux par leurs racines est l'une des maladies des plantes les plus destructrices au monde et il est difficile pour les producteurs de trouver des moyens efficaces de lutter contre ce fléau. Certains chercheurs ont suggéré l'incorporation des margines dans le sol comme une alternative écologique aux fumigants pour la protection des cultures contre, l'espèce *Verticillium dahliae* Kleb, ce champignon tellurique provoque chez ses diverses plantes hôtes des symptômes de jaunisse et de flétrissement verticillien. L'activité protectrice des margines a été démontrée à travers une expérience en pot sur une culture de tomates dans des conditions de terrain (YANGUI *et al.*, 2011). Cela pourrait être attribué à l'effet direct de composés fongicides tels que l'hydroxytyrosol ou à l'induction de mécanismes de réponse immunitaire dans la plante. Le traitement expérimental du sol inoculé avec *Rhizoctonia solani* (6 g / kg dw de sol) par les margines provenant d'une huilerie moderne avec un système de centrifugation à trois phases localisés dans la région de Messinia, dans le sud de la Grèce, peut également inhiber la croissance de *Rhizoctonia solani* s'il est appliqué à fortes doses (400 ml / kg d.w. de sol) (KOTSOU *et al.*, 2004), alors qu'aucune activité antifongique des margines provenant de l'extraction des olives des deux régions Mission et Frantoio (Australie) n'a été trouvée contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger* à une concentration de 5 mg / disque par la méthode de diffusion sur disque (OBIED *et al.*, 2007). Cependant l'expérience menée par VAGELAS *et al.* (2009) sur des graines de tomates a montré la possibilité de l'application des margines filtrées par vaporisation sur les fruits et légumes infestés de moisissures et d'inhiber la sporulation de *Botrytis* et *Penicillium spp* et aussi la croissance du mycélium des pathogènes du sol *Fusarium oxysporum f. sp.* Et *lycopersici*. Dans cette expérience, vingt-et-une graines de tomates ont été incubés en présence d'une suspension de spores (10^6 spores / ml) de deux espèces fongiques, *Fusarium oxysporumf. sp.* et de *lycopersici* pendant 10 min et vingt-et-une graines de tomates ont été incubés dans les mêmes conditions mais avec des spores traités préalablement avec des margines (5 ml spores / 100 ml de margines).

Un grand nombre de composés et d'extraits de sources naturelles, y compris les plantes, les bactéries, les microalgues, les champignons et les actinomycètes ont été testés pour leur capacité à inhiber les champignons fongiques toxigènes sur la croissance et / ou production d'AF.

Des efforts considérables ont été déployés pour trouver des agents de lutte biologique potentiels ainsi que de nouveaux métabolites inhibiteurs. Génomique, protéomique et métabolomique. Des études ont révélé de nouveaux mécanismes inhibiteurs de la production d'AF par des composés bioactifs provenant de sources naturelles.

Diverses huiles essentielles et autres extraits de plantes (vitamines, caroténoïdes, bêta-carotène, alfa-carotène, lycopène, acide ascorbique, curcumine, polysaccharides, plusieurs flavonoïdes et composés phénoliques) ont été rapportées comme inhibiteurs de la production d'AFs en particulier l'AFB1 et de la croissance des mycéliums des espèces d'*Aspergillus* dans les denrées alimentaires (BLUMA et ETCHEVERRY, 2008c ; HOLMES et *al.*, 2008 ; MA et *al.*, 2014 ; PANDEY et *al.*, 2016). Cependant, il n'y a pas de littérature significative disponible sur la bio-efficacité de la PM et l'EPM sur la croissance d'*A.flavus* et la production d'AFB1. La biosynthèse des AFs dépend fortement des conditions chimiques et physiques de croissance, à savoir la composition du substrat, la température, le pH, l'activité de l'eau et la combinaison particulière de différents paramètres qui peuvent être complètement inhibés ou activés par la biosynthèse de ces aflatoxines (HAHLBROCK et SCHEEL, 1989). De plus, la biosynthèse des aflatoxines est établie par la conversion de l'acétate en acide norsolorinique (NOR) par des synthases (Fas) et une polycétidesynthase (PksA) impliquées dans la synthèse du polycétide (polyketide) à partir de l'acétyl-CoA (précurseur issu du métabolisme primaire) (CRAWFORD et *al.*, 2008). La synthèse de l'AFB1 à travers la voie de polycétide implique plus de 25 gènes. Au moins 16 réactions consécutives catalysées par des enzymes sont nécessaires pour compléter la synthèse d'AFB1 à partir de NOR (BHATNAGAR et *al.*, 2006).

LIANG et *al* (2015) ont démontrés l'activité antifongique du cinnamaldéhyde (composant principal de l'essence de cannelle), du citral (le constituant majeur de l'huile de citronnelle) et de l'eugénol (constituant majeur retrouvé dans le clou de girofle) sur la croissance et la biosynthèse de l'AFB1. La croissance d'*Aspergillus flavus* et la production d'AFB1 ont été complètement inhibées par la concentration de 0,80 mmol / L de cinnamaldéhyde et 2,80 mmol / L de citral. Cependant, à une concentration plus faible, le cinnamaldéhyde (0,40 mmol / L), l'eugénol (0,80 mmol / L) et le citral (0,56 mmol / L) réduiraient significativement la production d'AFB1 avec des taux d'inhibition de 68,9 %, 95,4 % et 41,8 % respectivement. Alors qu'aucun effet sur la croissance fongique n'a été observé. Les niveaux d'expression de 5 gènes clés (aflR, aflT, aflD, aflM et aflP) dans la biosynthèse de l'AFB1 ont été évalués par PCR en temps réel. La PCR en temps réel a montré des réductions significatives de leurs expressions. Ces résultats suggèrent que la réduction de la production d'AFB1 par le cinnamaldéhyde, l'eugénol et le citral à de faibles concentrations peut être due à leur régulation négative du niveau de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'AFB1.

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés via la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Ces composés sont des éléments constitutifs des structures des parois cellulaires, servant de défense contre les pathogènes (HAHLBROCK et SCHEEL, 1989). Ces composés non seulement inhibaient la biosynthèse de l'AFB1, mais réduiraient également la production d'acide norsolorinique (NOR), le premier précurseur d'aflatoxine stable (FERREIRA et *al.*, 2013). Il est clair que les composés phénoliques inhibent une ou plusieurs étapes précoces plutôt que tardives de la voie de biosynthèse de l'AFB1 (FERREIRA et *al.*, 2013).

Il a été établi que l'augmentation du stress oxydatif dans les cellules fongiques déclenche la synthèse de l'AF (JAYASHREE et SUBRAMANYAM, 2000). Ainsi, une diminution du stress oxydatif des cellules fongiques causée par des antioxydants ajoutés de

manière exogène pourrait être l'une des raisons possibles de la diminution de la production d'AF (KOVACĀ et al., 2017).

Les phénylpropanoïdes comprennent des phénols simples et les flavonoïdes tels que les flavones, les flavonols, les coumarines, chromones et biflavonoïdes. La plupart de ces composés sont connues pour leur pouvoir antioxydant, mais l'activité anti-oxydante n'est pas toujours positivement corrélée avec l'inhibition de la biosynthèse des AFs. L'activité anti-oxydante peut être importante pour le mode d'action de ces groupes de composés, mais il semble probable que des facteurs supplémentaires peuvent être requis pour l'inhibition de la synthèse des AFs. Ceux-ci peuvent inclure leur biodisponibilité et leur absorption, leur mobilité intracellulaire et leur interaction avec des enzymes spécifiques, des métabolites et/ou des voies de signalisation (HOLMES et al., 2008 ; KOVACĀ et al., 2017).

Les auteurs suggèrent que les similitudes structurales entre les coumarines et la structure des AFs peuvent entraîner une inhibition compétitive des enzymes impliquées dans leur biosynthèse (HOLMES et al., 2008 ; KOVACĀ et al., 2017).

HITOKOTO et ses collaborateurs (1980) ont signalé des cas où la formation d'AFs était inhibée alors que la croissance des colonies fongiques était apparemment normale, justifiant la nécessité d'étudier à la fois le potentiel d'inhibition de la croissance fongique et le potentiel d'inhibition de la production de toxines. Le mécanisme par lequel cette dernière inhibition se produit n'est pas très clair. Les AFs sont synthétisés de manière extra-mitochondriale à partir de l'acétylcoenzyme-A pendant une période d'utilisation rapide du glucose (HSIEH et MATELES, 1970). D'après TATSADJIEU et al. (2009), les huiles essentielles de *L. rugosa* du Cameroun peuvent restreindre le catabolisme des hydrates de carbone chez *A. flavus* en agissant sur certaines enzymes clés, ce qui peut entraîner une diminution de sa capacité à synthétiser l'AFB1. De plus, le nombre et la position des substitutions des acides phénoliques ont une influence sur leur potentiel antimicrobien contre divers micro-organismes (NAZZARO et al., 2013).

Selon FARAG et al. (1989) et NYCHAS (1995), la présence des groupes OH phénoliques capables de former des liaisons hydrogène avec les sites actifs des enzymes cibles contribue à augmenter leur activité antimicrobienne.

MEKKI et al. (2009) ont rapporté que les propriétés phytotoxiques et antimicrobiennes des margines sont associées à sa composition en composés phénoliques. Certaines études ont démontré des activités bactéricides et fongicides intéressantes des margines et en particulier de ses monomères phénoliques, tels que l'hydroxytyrosol et le tyrosol (YANGUI et al., 2009).

En effet les extraits phénoliques des margines enrichies en hydroxytyrosol ont présentés des activités fongicides puissantes contre diverses espèces phytopathogènes avec une concentration minimale d'inhibition comprise entre 7,18 et 57,4 mg /L (YANGUI et al., 2010).

2.4. Activité hypoglycémiant de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

2.4.1. Etude de la toxicité (Test d'innocuité)

Selon les résultats obtenus du test d'innocuité, aucune perturbation n'a été observée et aucun cas de mortalité n'a été enregistré pour toutes les doses testées pendant 72 heures ce qui prouve qu'il n'existe aucune toxicité remarquable jusqu'à la dose de 8 g/kg et 1000 mg/kg pour la PM et l'EPM respectivement.

2.4.2. Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la tolérance au glucose

2.4.2.1. Effet de la poudre de margines sur la tolérance au glucose

Les résultats de l'évaluation de la tolérance au glucose chez les souris traitées par la PM en présence et en absence du glucose sont illustrés dans la figure 43 et rassemblés dans le tableau XXX.

L'administration de 1 g/kg du glucose a provoqué chez les groupes de souris à jeun un état d'hyperglycémie une heure après gavage de la solution glucosée. En parallèle, une régulation de la glycémie est observée après le pic (15 min). Ce qui est remarquable est l'amélioration de cette régulation chez les souris traitées. En comparant la glycémie, point par point, des différences significatives et hautement significatives doses dépendantes ont été notée pour les concentrations de 2 g/kg ($p < 0,05$) et 4 g/kg ($p < 0,001$) de PM testées en présence du glucose. Le pic de glycémie à 15 min a été nettement réduit en présence des margines à 4 g/kg de poids corporel par rapport à la réponse témoin glucose 1g/kg.

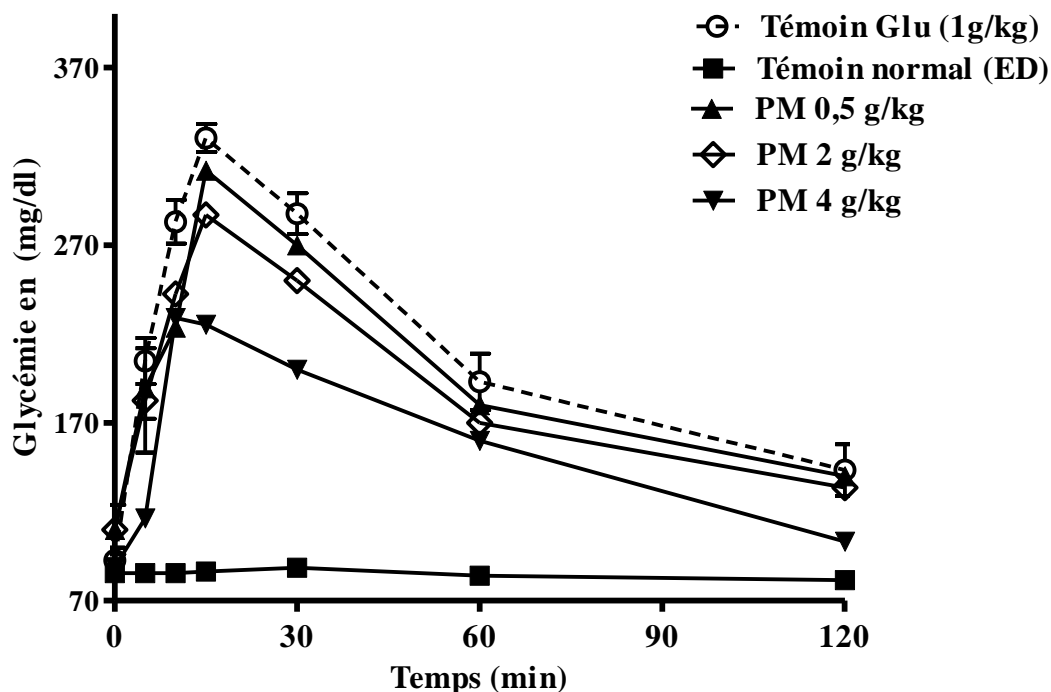


Figure 43: Evolution de la tolérance au glucose chez les souris traitées par la PM en présence du glucose (1 g/kg). Les valeurs obtenues représentent la moyenne de six essais \pm écart type.

Tableau XXX : Variation de la glycémie chez les souris traitées en fonction du temps et de la dose de la poudre de margines.

Temps Souris traités	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Témoin normal (eau distillée)	86 ± 0,08	85 ± 0,08	80 ± 0,02	85 ± 0,05	83 ± 0,03
Témoin hyperglycémique (1 g/kg de glucose)	90 ± 0,66	316 ± 0,66	280 ± 1,55	190 ± 1,00	143 ± 1,11
Margine (PM) 0,5 g/kg en (mg /dl)	88 ± 0,88ns	312 ± 0,44ns	270 ± 0,44ns	180 ± 0,88ns	140± 1,33ns
Margines (PM) 2 g/kg (mg /dl)	90 ± 0,88ns	287 ± 1,00*	250 ± 2,44ns	170 ± 1,55	133 ± 1,11ns
Margines (PM) 4 g/kg (mg /dl)	89 ± 0,44ns	225 ± 0,55***	208 ± 0,88***	155 ± 0,66ns	110 ± 0,66ns

Les valeurs de la glycémie sont données en mg/dl et représentent la moyenne de six essais ± écart type. Groupes comparés au groupe témoin (Glucose 1g/kg). ANOVA à deux facteurs (Bonferroni post-tests) : ns >0,05 ; **p*< 0,05 ; ***p*< 0,01 ; ****p*<0,001.

2.4.2.2. Effet de l'extrait phénolique des margines sur la tolérance au glucose

Les résultats de l'évaluation de la tolérance au glucose chez les souris traitées par l'EPM en présence et en absence du glucose sont illustrés dans la figure 44 et rassemblés dans le tableau XXXI.

L'administration de 1 g/kg du glucose a provoqué chez les groupes de souris à jeun un état d'hyperglycémie une heure après gavage de la solution glucosée. En parallèle, une régulation de la glycémie est observée après le pic (15 min). Ce qui est remarquable est l'amélioration de cette régulation chez les souris traitées. En comparant la glycémie, point par point, des différences hautement significatives et dose dépendantes ont été notées pour les concentrations de 250 mg/kg (*p*<0,001) et 500 mg/kg (*p*<0,001) d'EPM testés en présence du glucose. Le pic de glycémie à 15 min a été nettement réduit en présence de l'EPM à 250 mg/kg et à 500 mg/kg de poids corporel par rapport à la réponse du témoin (glucose 1g/kg).

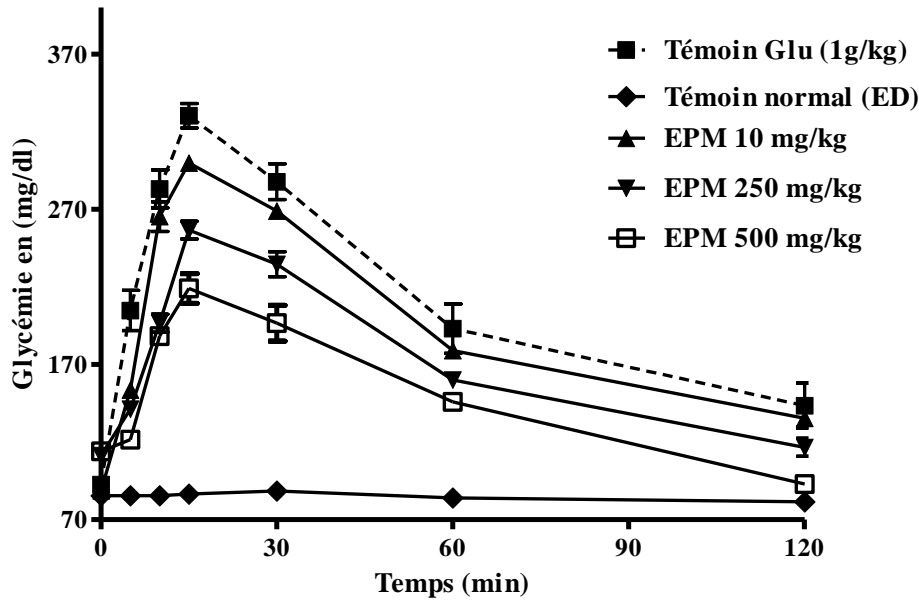


Figure 44 : Evolution de la tolérance au glucose chez les souris traitées par l'extrait phénolique des margines (EPM) en présence du glucose (1 g/kg). Les valeurs obtenues représentent la moyenne de six essais \pm écart type.

Tableau XXXI : Variation de la glycémie chez les souris traitées en fonction du temps et de la dose d'extrait phénolique de margines.

Temps \ Souris traités	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Témoign normal (eau distillée)	86 \pm 0,08	85 \pm 0,08	80 \pm 0,02	85 \pm 0,05	83 \pm 0,03
Témoign hyperglycémique (1 g/kg de glucose)	91 \pm 0,66	316 \pm 0,66	280 \pm 1,55	190 \pm 1,00	143 \pm 0,11
EPM 10 mg/kg en (mg /dl)	88 \pm 1,1ns	300 \pm 0,1ns	269 \pm 0,44ns	179 \pm 0,88ns	135 \pm 0,33ns
EPM en 250 mg/kg (mg /dl)	89 \pm 0,88ns	256 \pm 0,44***	231 \pm 1,22**	160 \pm 1,55ns	116 \pm 0,11ns
EPM en 500 mg/kg (mg /dl)	90 \pm 0,66ns	219 \pm 0,01***	197 \pm 0,66***	144 \pm 0,88**	93 \pm 0,77**

Les valeurs de la glycémie sont données en mg/dl et représentent la moyenne de six essais \pm écart type. Groupes comparés au groupe témoin (Glucose 1g/kg). ANOVA à deux facteurs (Bonferroni post-tests) : ns>0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p <0,001.

Les résultats de l'OGTT ont montré un effet hypoglycémiant remarquable de la PM et de l'EPM chez les souris traitées. En effet une réduction dose dépendante de la glycémie a été observée après 15 min du gavage par rapport au témoin. La PM (4 g/kg) et les EPM (500 mg/kg) ont réduit le pic glycémique à $225 \pm 0,55$ mg/dl et $219 \pm 0,01$ mg/dl, respectivement d'une manière hautement significative ($p < 0,001$) en comparaison avec la glycémie du groupe témoin (glucose 1g/kg) après 15 min du gavage et qui est de $316 \pm 0,66$ mg/dl. En effet, à partir de 15 min après le gavage, la PM et de l'EPM ont freiné l'augmentation de la glycémie en l'empêchant ainsi d'atteindre le pic glycémique obtenu avec le témoin glucose 1 g/kg. Le retour au niveau basal de la glycémie s'observe à 120 min suivant le pic glycémique. L'EPM a réduit la glycémie d'une manière très significative ($p < 0,01$) de $143 \pm 0,11$ mg/dl à $93 \pm 0,77$ mg/dl. Pour la PM une réduction non significative ($p > 0,05$) de la glycémie a été observé et qui est de l'ordre de $143 \pm 0,11$ mg/dl à $110 \pm 0,66$ mg/dl.

Plusieurs travaux effectués sur l'activité hypoglycémiante des extraits naturels de différentes plantes médicinales sur des souris et/ ou des rats de laboratoires ont démontrés le même effet (KEBIECHE 2009 ; MEDDAH *et al.*, 2009 ; JUAREZ-REYES *et al.*, 2015). Les auteurs de ces travaux ont suggérés afin d'expliquer ce phénomène, une utilisation très active du glucose administrés par voie orale (OGTT) par les tissus périphériques. En effet les travaux de KEBIECHE (2009) sur l'effet des flavonoïdes sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité chez les rats males de souche *Wistar* ont démontré que l'effet hypoglycémiant des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens. L* est suivie par une élévation de la tolérance des tissus au glucose ce qui pourrait expliquer l'élévation significative de la teneur hépatique en glycogène chez les rats prétraités avec les flavonoïdes par rapport aux témoins non traités. KEBIECHE (2009) a rapporté que ce stockage massif de glycogène dans le foie peut se produire suite à une internalisation intense de glucose dans les hépatocytes.

Le passage du glucose du sang vers les tissus périphériques, en l'occurrence le foie en présence des substances phénoliques et/ou insuliniques est susceptible d'être facilité par différents effets, parmi ces effets, une activation de la glycogénogenèse et une potentialisation de l'effet insulinique ont été signalés par CHAGAS *et al.* (2015) et une activation du transporteur de glucose (GluT) a été signalé par HAJIAGHAALIPOUR *et al.* (2015).

2.4.3. Résultat du test de provocation *in vitro* en chambre d'Ussing

Après 40 min le temps nécessaire pour la stabilisation des paramètres électrophysiologiques de base. Le D-glucose (10 mmol/l), et le carbachol (100 μ M/l) sont respectivement utilisés pour induire des mouvements ioniques dans le compartiment muqueux et du côté séreux respectivement. En effet après l'ajout du glucose, la tension trans-épithéliale augmente rapidement en moins de 10 min jusqu'à atteindre sa valeur de stabilisation sous forme de plateau (figure 45 A). La valeur obtenue est de 6,2 mV. Le carbachol induit lui aussi une augmentation mais en forme de pic dont la valeur maximale est 2,4 mV depuis la valeur stabilisée après l'ajout du glucose. La phloridzine (500 μ M/l) ajoutée dans le compartiment muqueux a un effet inverse à celui du glucose puisqu'elle provoque une diminution rapide trans-épithéliale qui se stabilise en moins de 5 min à sa valeur de repos (figure 45 B).

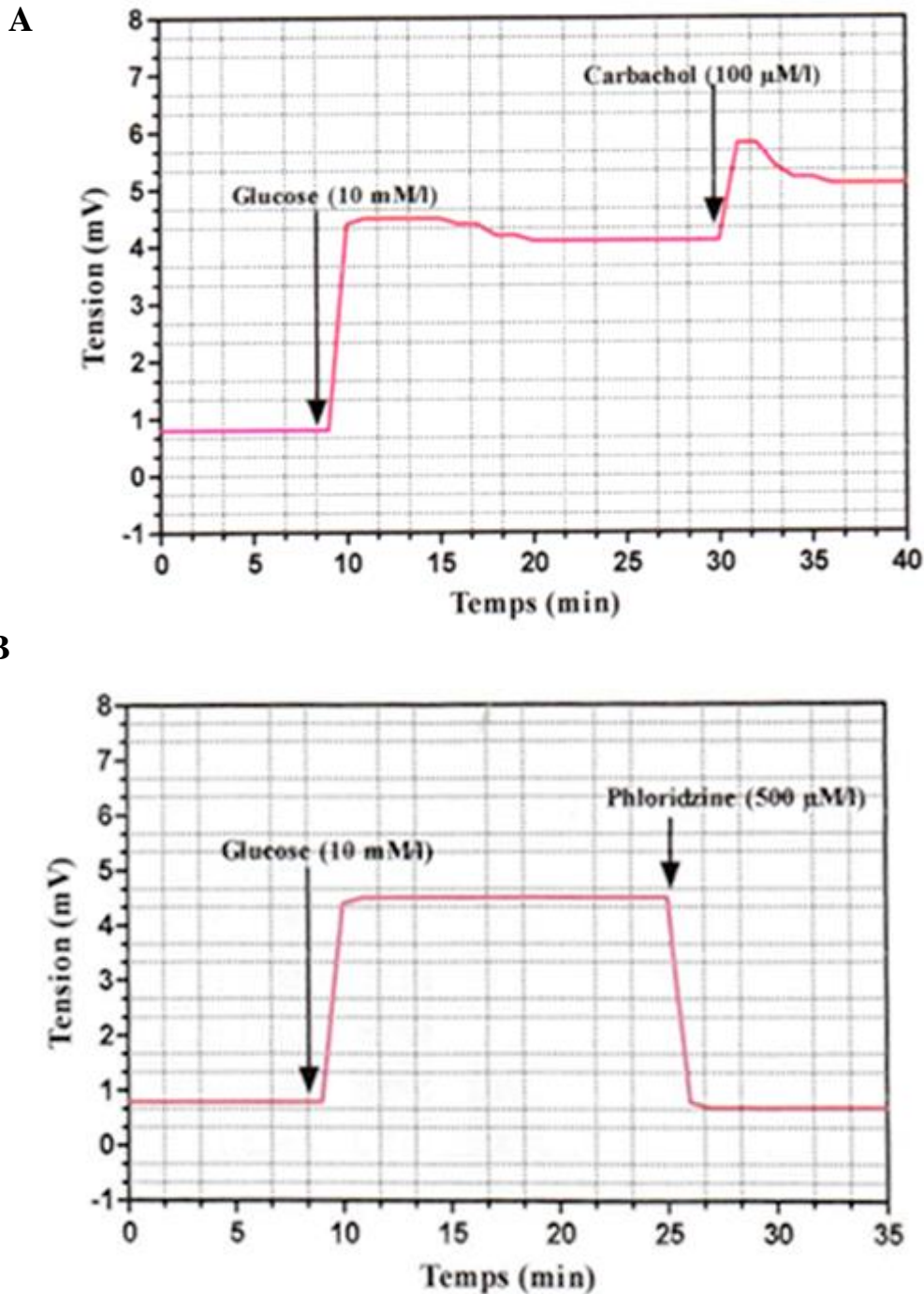


Figure 45 : Mesures de la tension trans-épithéliale du Glucose/Carbachol (A) et du Glucose/Phloridzine (B) en (mV). Les mesures sont réalisées sur l'intestin de souris obtenue en chambre d'Ussing d'une surface de 0,5 cm².

L'ajout du carbachol ou la stimulation électrique du tissu intestinal de souris induit une augmentation du courant de court-circuit équivalente à celle obtenue dans d'autres études (YANG *et al.*, 2003 ; MEDDAH *et al.*, 2008), suggérant là encore que l'intégrité tissulaire est préservée. La durée de l'incubation du tissu intestinal dans la chambre d'Ussing est un paramètre qui doit être également pris en compte. En effet, ce paramètre est déterminant dans la préservation de la perméabilité et la viabilité du tissu intestinal et qui est chez la souris limité à environ 3 heures de temps (CLARKE, 2009).

La PM et l'EPM inhibent l'entrée du D-glucose par les récepteur sodium dépendant SGLT-1 qui représente le récepteur majeur du glucose au niveau de l'intestin. En effet l'introduction de la PM et de l'EPM du coté muqueux de la muqueuse jéjunale induit une importante inhibition dose dépendante du courant de court-circuit (Isc), comme le montre les figures 46 et 47. Le taux maximal d'inhibition a atteint une valeur moyenne de $80 \pm 3,9$ % et de $98 \pm 0,5$ % pour les doses de 60 mg/ml et de 100 μ g/ml pour la PM et d'EPM respectivement. L'inhibition du transport de D-glucose en réponse à la PM et de l'EPM pour les doses de 60 mg/ml et de 100 μ g/ml correspond à une diminution de A-Isc de $43 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ à $4 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ pour la PM et de $1,33 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ pour l'EPM.

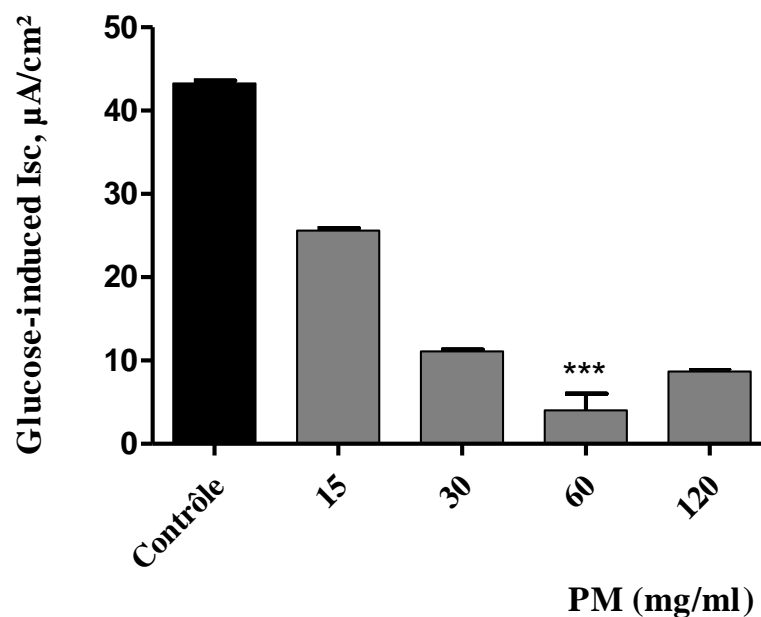


Figure 46 : Courant de court-circuit (Isc) induit par le glucose en absence ou en présence de concentrations croissantes de PM [15, 30, 60, 120] mg/ml et mesuré en chambre d'Ussing sur des fragments jéjunaux de souris. Les résultats sont exprimés en ($\mu\text{A}/\text{cm}$) et sont représentés en moyenne \pm écart type. L'histogramme représente la moyenne de 3 expériences pour chaque concentration de PM. (*: Signification par rapport au contrôle (glucose 10 mM), $P < 0,05$).

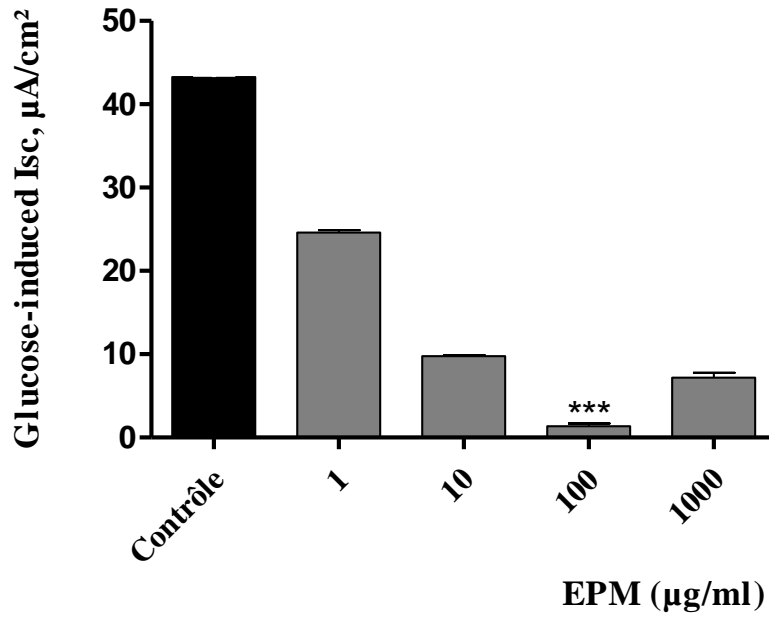


Figure 47: Courant de court-circuit (Isc) induit par le glucose en absence ou en présence de concentrations croissantes d'EPM [1, 10, 100, 1000] µg/ml et mesuré en chambre d'Ussing sur des fragments jéjunaux de souris. Les résultats sont exprimés en (µA/cm) et sont représentés en moyenne ± écart type. L'histogramme représente la moyenne de 3 expériences pour chaque concentration d'EPM. (*: Signification par rapport au contrôle (glucose 10 mM), P<0,05).

Pour mieux visualiser l'effet obtenu de la PM et de l'EPM aux doses respectives de 60 mg/ml et de 100 µg/ml. La mesure de la tension trans-épithéliale glucose/margines/carbachol et glucose/EPM/ carbachol a été effectuée et les résultats sont consignés dans les figures 48 et 49 respectivement.

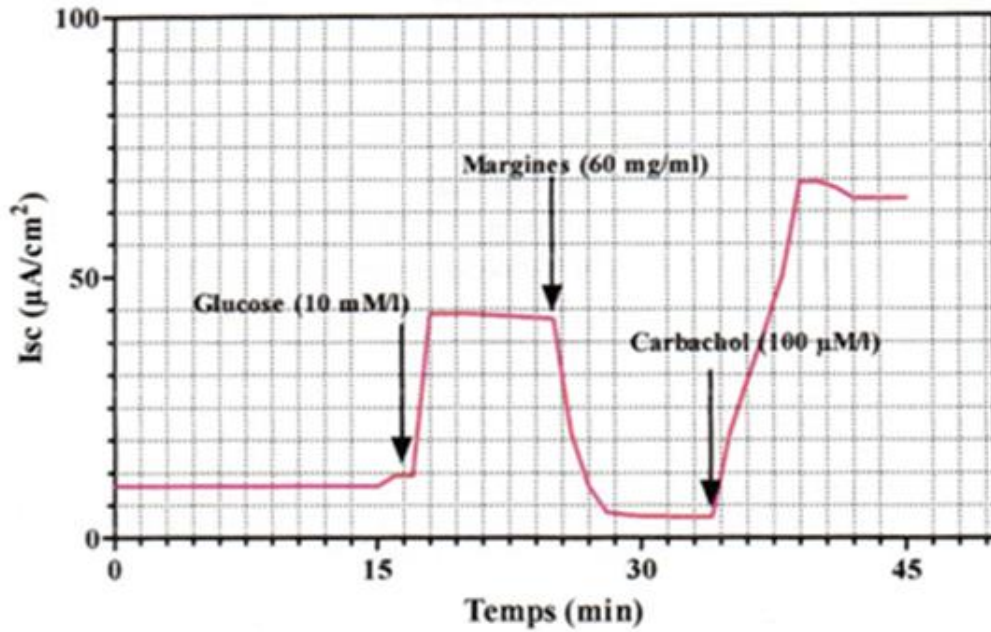


Figure 48: Le courant court-circuit (Isc) en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ traduisant l'effet du glucose (10 mM/l), margines (60 mg/ml) et du Carbachol (100 $\mu\text{M}/\text{l}$). Les mesures sont réalisées sur l'intestin de souris obtenu d'une surface de $0,5 \text{ cm}^2$ en chambre d'Ussing.

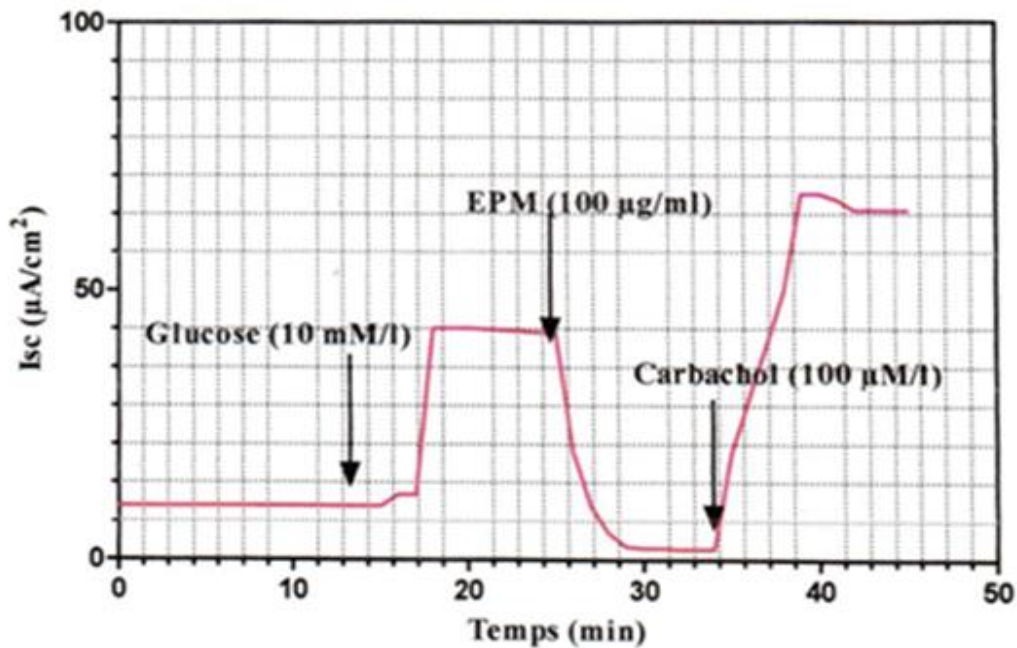


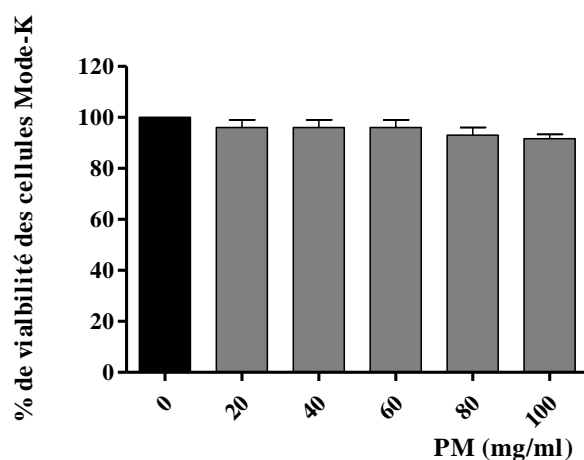
Figure 49: Le courant court-circuit (Isc) en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ traduisant l'effet du glucose (10 mM/l), margines (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et du Carbachol (100 $\mu\text{M}/\text{l}$). Les mesures sont réalisées sur l'intestin de souris obtenu d'une surface de $0,5 \text{ cm}^2$ en chambre d'Ussing.

2.4.4. Résultats du test toxicité des cellules Mode-K

Avant de tester l'effet de la PM et de l'EPM, nous avons vérifié leur effet sur la viabilité des cellules intestinales de souris Mode-K, ce test est très important si l'on envisage d'utiliser la PM et de l'EPM chez l'homme. Avant de tester l'effet de la PM et de l'EPM sur les cellules Mode-K, nous avons vérifié la cytotoxicité de ces derniers, en incubant les cellules Mode-K en présence de différentes concentrations de polyphénols allant de 0 à 100 µg/ml pendant 30 min, les cellules mortes laissent pénétrer le bleu de trypan, ce qui les colorent en bleu, contrairement aux cellules vivantes qui restent transparentes.

Les résultats (Figure 50) montrent que la PM et l'EPM n'ont eu aucun effet cytotoxique sur les cellules Mode-K, même à des concentrations plus fortes, le taux de viabilité des cellules Mode-K dépasse les 95 %, le taux de cellules mortes n'est donc pas significatif ($p > 0,05$).

A



B

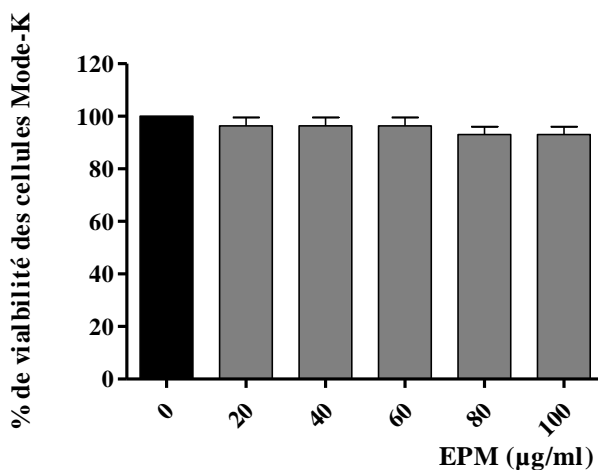


Figure 50: Test toxicité de la poudre de margines (A) et de l'extrait phénolique des margines (B) sur la lignée cellulaire Mode-K de souris. Les cellules intestinales Mode-K sont incubées à des concentrations croissantes de PM [0 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100] mg/ml et d'EPM [0 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100] µg/ml, et la viabilité est évaluée après 30 min d'incubation par le test d'exclusion de bleu de Trypan. Les résultats sont exprimés en % de cellules vivantes après traitement par rapport aux cellules contrôles non traitées. Les résultats sont exprimés en moyenne de 3 essais ($p > 0,05$).

2.4.5. Analyse des cellules intestinales de souris Mode-K et des membranes intestinales des souris avec le Western blot

2.4.5.1. Western blot des membranes de la lignée cellulaire intestinale de souris Mode-K

➤ Résultats des contrôles sur SGLT-1 et PKC

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les concentrations de 30 mg/ml et de 10 µg/ml de la PM et des EPM testées respectivement sur les cellules intestinales de souris Mode-K diminuent le niveau de la bande du SGLT-1 active qui possède un poids moléculaire de 72 kDa, ainsi que le niveau de la bande de la protéine PKC (43 kDa) par rapport au contrôle positif représenté par le PMA seul (10 ng/ml). La figure 51 et 52 indiquent que le PMA utilisé comme contrôle positif induit une forte augmentation de l'expression de SGLT-1 et de la PKC au niveau des membranes de la lignée cellulaire Mode-K par rapport au contrôle négatif représenté par les cellules Mode-K au repos (sans aucune stimulation).

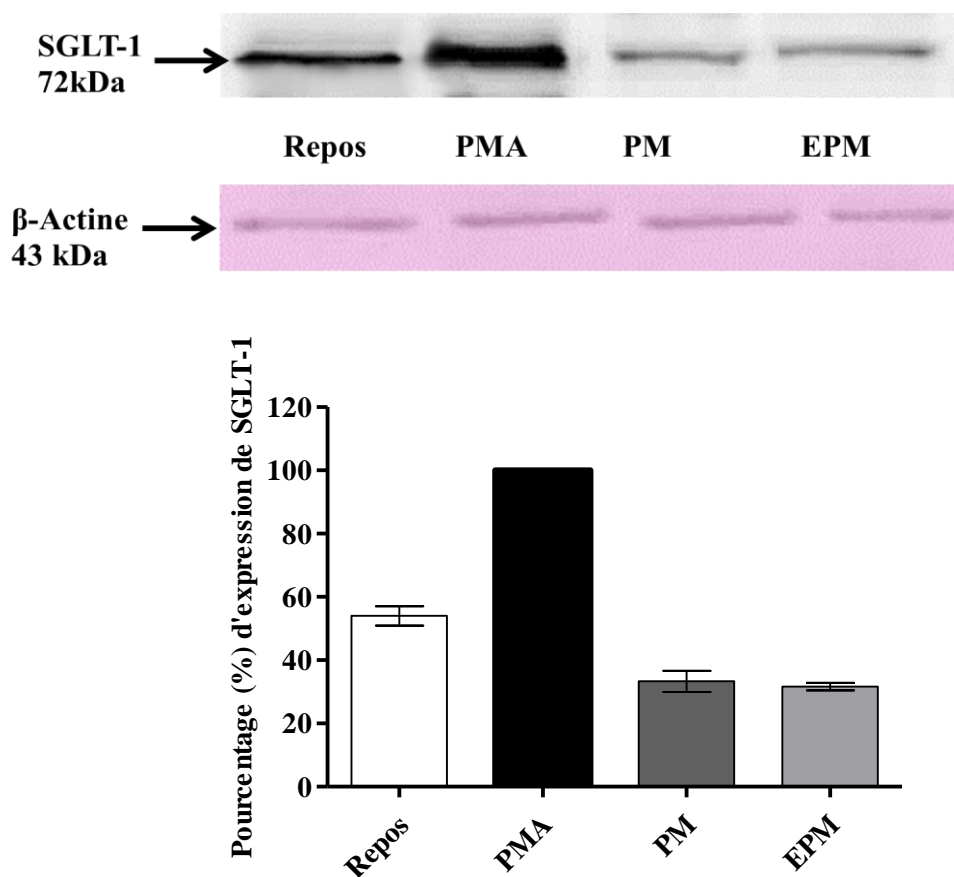


Figure 51: Expression de la protéine SGLT-1 dans la lignée de cellules intestinales Mode-K de souris en présence de la poudre ou de l'extrait phénolique de margines et en absence du PMA. Les cellules intestinales Mode-K sont traitées avec les concentrations 30 mg/ml, 10 µg/ml, 10ng/ml de la poudre de margines (PM), de l'extrait phénolique de margines (EPM) et du phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) (contrôle positif) respectivement pendant 30 min et les teneurs en protéines ont été suivies par analyse du Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. L'expérience a été répétée 3 fois. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type.

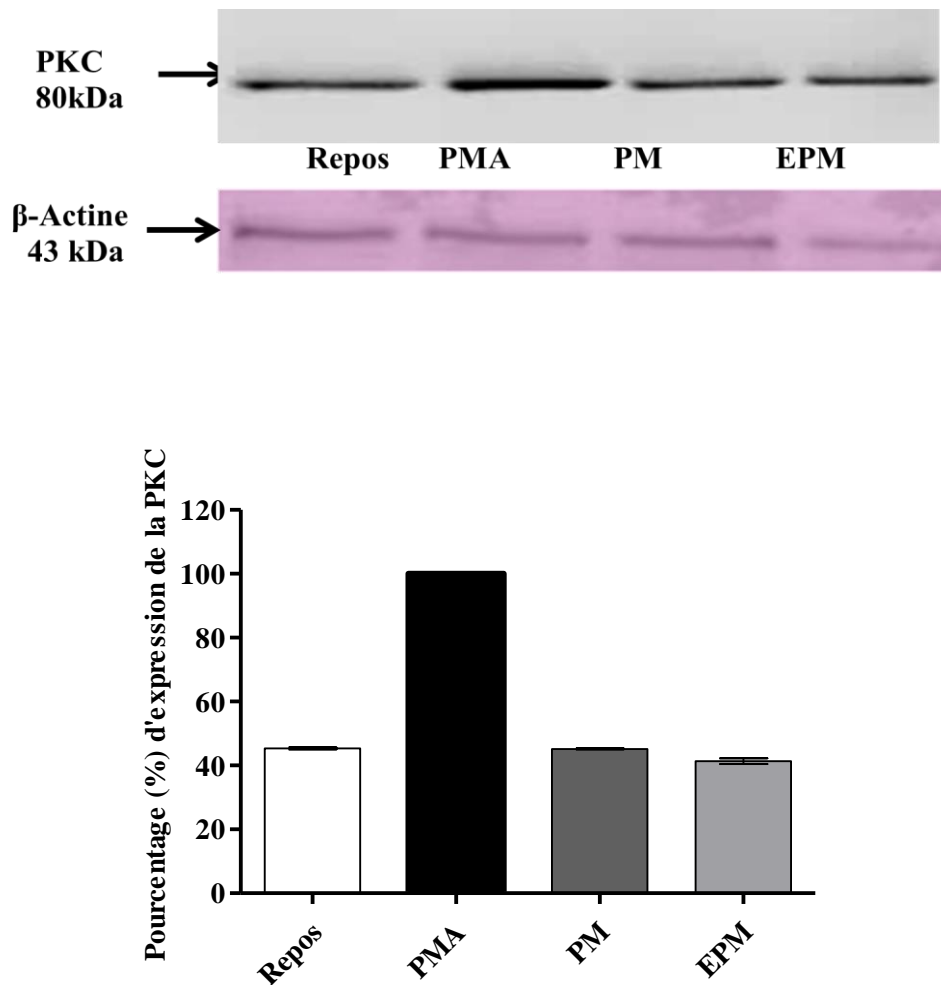


Figure 52: Expression de la PKC dans la lignée de cellules intestinales Mode- K de souris en présence de la poudre ou de l'extrait phénolique de margines et en absence du PMA. Les cellules intestinales Mode-K sont traitées avec les concentrations 30 mg/ml, 10 μ g/ml, 10ng/ml de poudre de margines (PM), de l'extrait phénolique de margines (EPM) et du phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) respectivement pendant 30 min et les teneurs en protéines ont été suivies par analyse du Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. L'expérience a été répétée 3 fois. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type.

➤ **Action de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur SGLT-1 et PKC en présence du PMA**

En présence du PMA la PM et l'EPM ont provoqué une diminution de cette expression par l'inactivation du PMA. La figure 53 indique une inhibition hautement significative ($p < 0,001$) de 60 % pour la PM et de 70 % pour l'EPM par rapport à la réponse au PMA. En outre, l'analyse Western Blot (figure 54) a montré que l'expression de PKC au niveau des membranes a été augmentée en présence du PMA et que la PM et l'EPM ont réduit cette réponse de 45 % et 55 % respectivement ($p < 0,001$). Les données de cette expérience sont cumulées et représentées par l'histogramme dans les figures 53 et 54, Les données de cette étude indiquent que la PM et l'EPM ont induit une inhibition concomitante de la translocation SGLT-1 et de la PKC au niveau des membranes de la lignée cellulaire Mode-K.

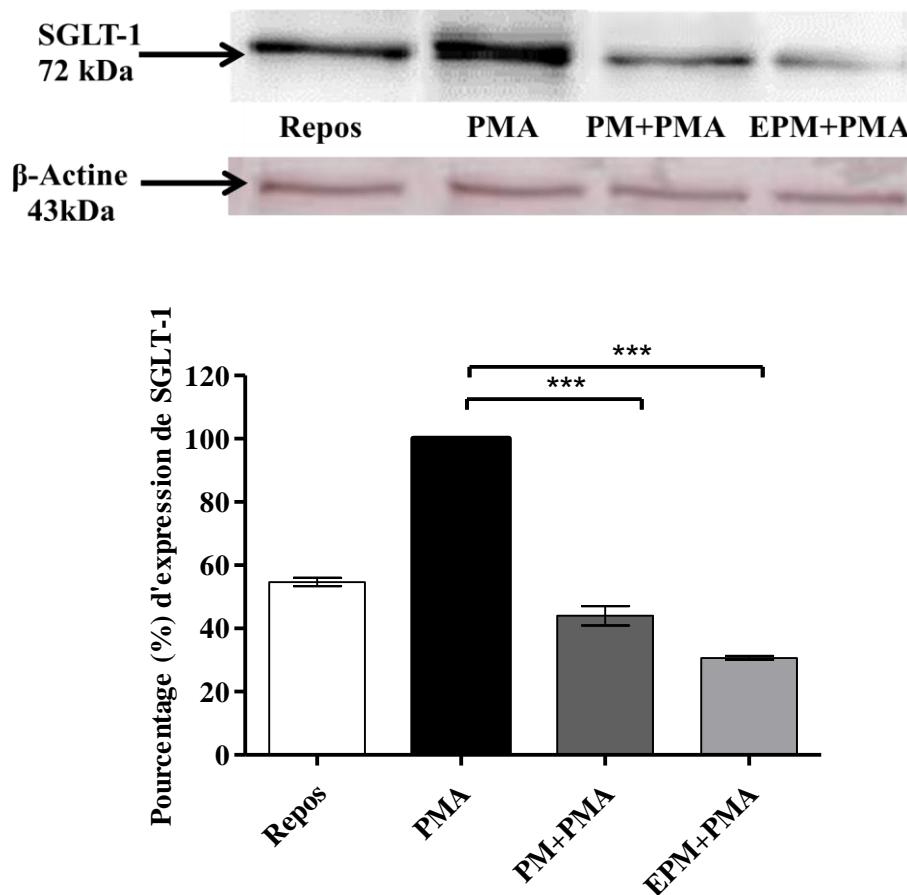


Figure 53: L'expression de la protéine SGLT-1 dans la lignée de cellules intestinales Mode-K de souris en présence de la poudre ou de d'extrait phénolique de margines et en présence du PMA. Les cellules intestinales Mode-K sont traitées avec les concentrations 30 mg/ml, 10 µg/ml, 10 ng/ml de la poudre de margines (PM), l'extrait phénolique de margines (EPM) en présence du phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) respectivement pendant 30 min et les teneurs en protéines ont été suivies par analyse du Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. L'expérience a été répétée 03fois. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type. (*: Signification par rapport au contrôle (PMA 10 ng/ml), $P < 0,05$).

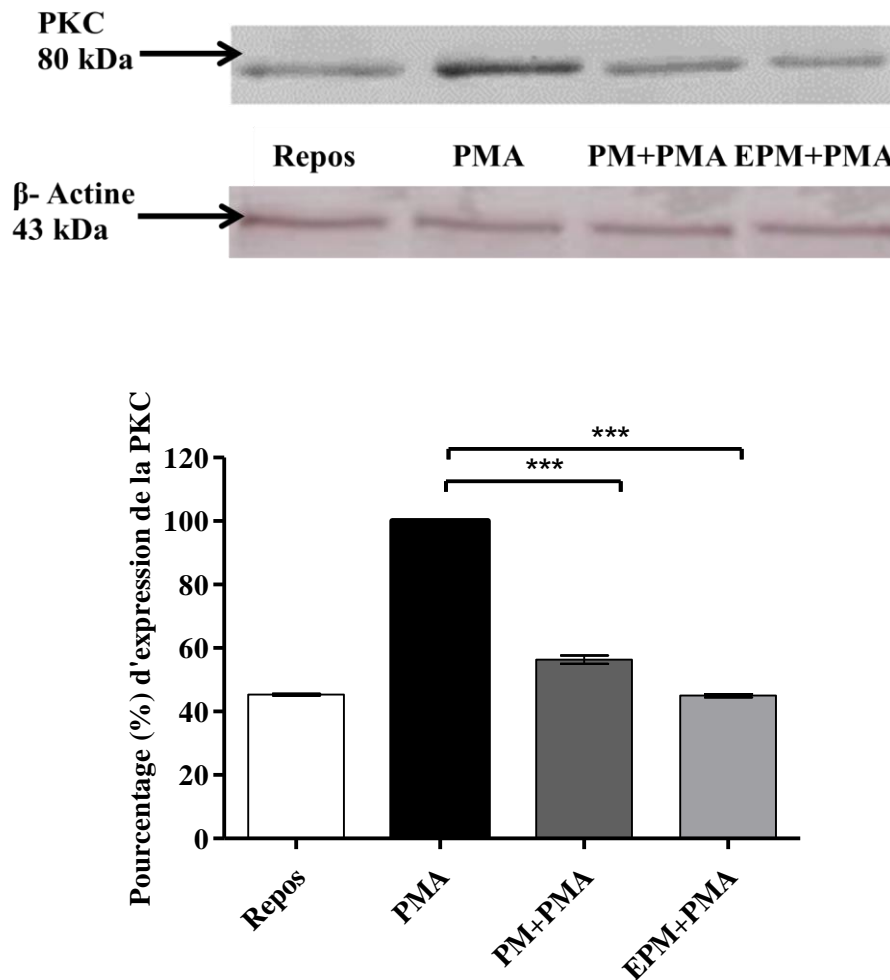


Figure 54:L'expression de la PKC dans la lignée de cellules intestinales Mode-K de souris en présence de la poudre ou de l'extrait phénolique de margines et en présence du PMA. Les cellules intestinales sont traitées avec les concentrations 30 mg/ml, 10 µg/ml de la poudre de margines (PM), de l'extrait phénolique de margines (EPM) respectivement en présence du phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) à 10 ng/ml pendant 30 min et les teneurs en protéines ont été suivies par analyse du Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. L'expérience a été répétée trois fois. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type. (*: Signification par rapport au contrôle (PMA 10ng/ml), $P < 0,05$).

2.4.5.2. Western blot des membranes intestinales de souris

➤ Résultats des contrôles sur SGLT-1 et PKC

Les résultats obtenus dans cette étude (figure 55 et 56) montrent que les concentrations de 4 g/kg et de 500 mg/kg choisies de la PM seule et de l'EPM seul testées respectivement diminuent le niveau de la bande du SGLT-1 active qui possède un poids moléculaire de 72 kDa, ainsi que le niveau de la bande de la protéine PKC (43 kDa) par rapport au contrôle

positif représenté par le glucose seul (1g/kg) au niveau des membranes intestinales. En effet le glucose seul induit une forte augmentation de l'expression de SGLT-1 au niveau de la membrane de la bordure en brosse (MBB) par rapport au contrôle négatif (eau distillée (ED)).

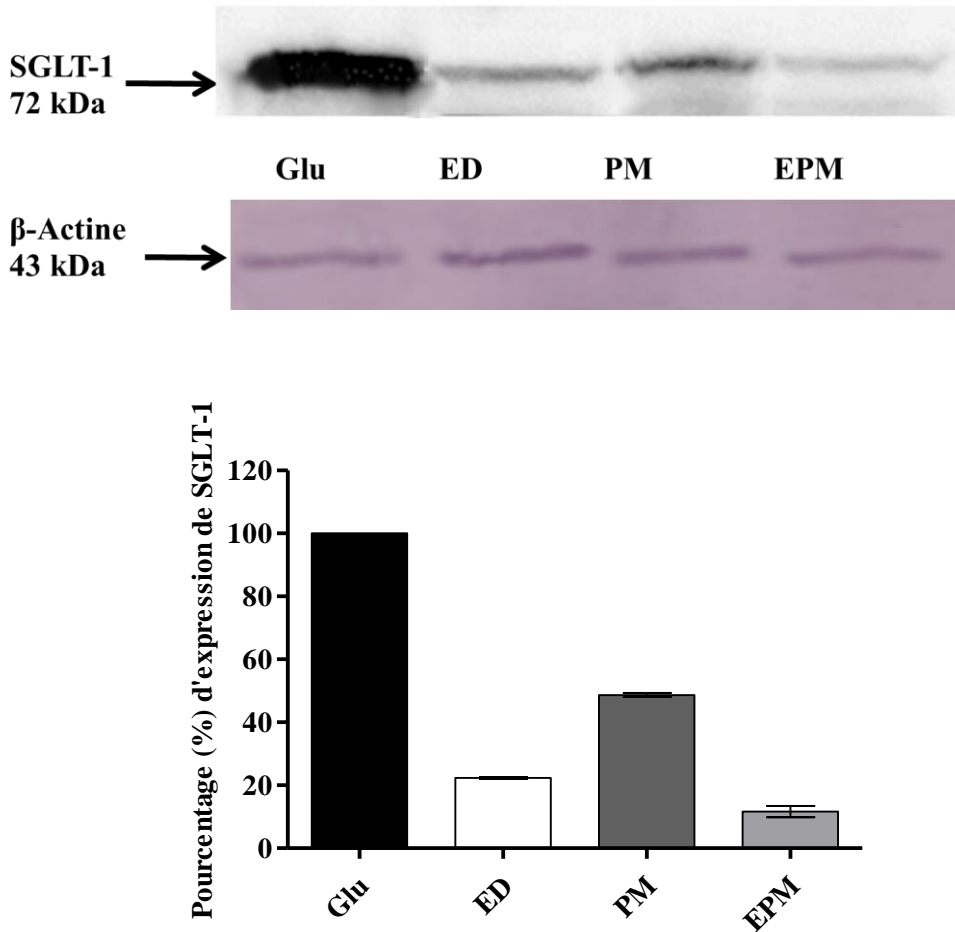


Figure 55 :L'expression de la protéine SGLT-1 au niveau de cellules intestinales après gavage des souris avec la poudre ou l'extrait phénolique de margines et en absence du glucose : Les souris ont été gavées avec du glucose 1g/kg (Glu : contrôle positif), eau distillée (ED : contrôle négatif), poudre de margines (PM) 4 g/kg, 500 mg/kg d'extrait phénolique de margines (EPM) respectivement après 15 min du traitement. Les teneurs en protéines ont été suivies par analyse du Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. L'expérience a été répétée 3 fois. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type.

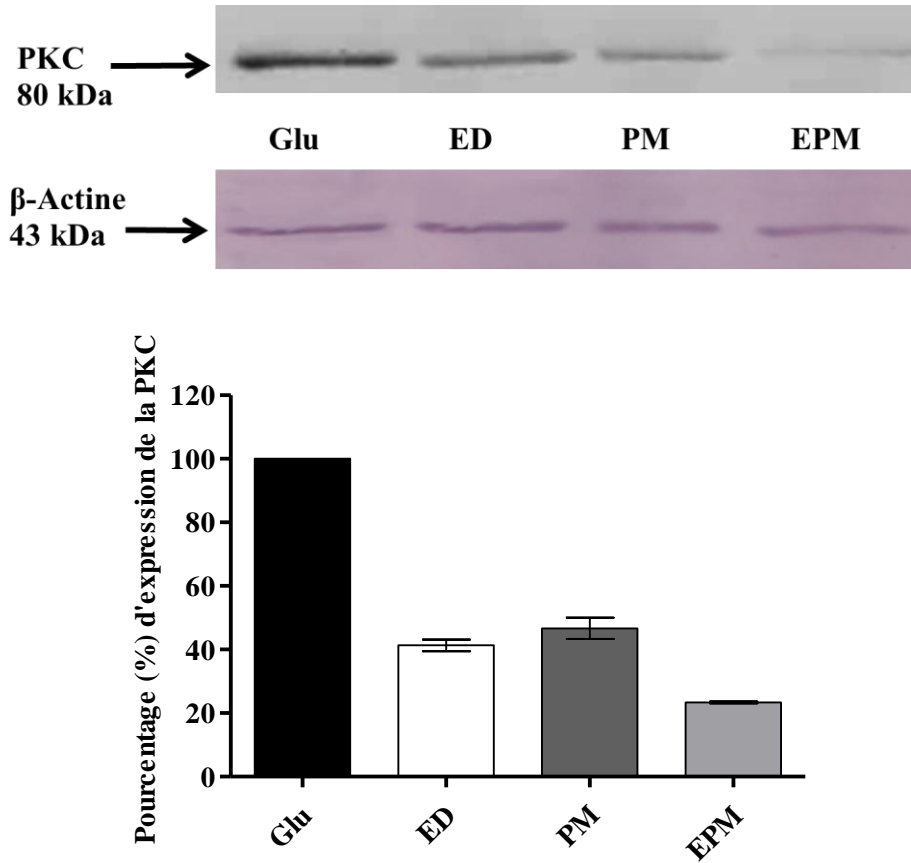


Figure 56 :L'expression de la PKC au niveau de cellules intestinales après gavage des souris avec la poudre ou l'extrait phénolique de margines et en absence du glucose : Les souris ont été gavées avec du glucose 1g/kg (Glu : contrôle positif), eau distillée (ED : contrôle négatif), poudre de margines (PM) 4 g/kg, 500 mg/kg d'extrait phénolique de margines (EPM) respectivement après 15 min du traitement. Les teneurs en protéines ont été suivies par analyse du Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. L'expérience a été répétée 3 fois. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type.

➤ **Résultats de l'action de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur SGLT-1 et PKC en présence du glucose**

En présence du glucose la PM et l'EPM ont provoqué une diminution de l'expression de SGLT-1. La figure 57 indique une réduction hautement significative ($p < 0,001$) de 60 % et de 88 % respectivement par rapport à la réponse au glucose. En outre, l'analyse Western Blot (figure 58) a montré que l'expression de la PKC dans les MBB a été augmentée avec l'ingestion du glucose et que la PM et l'EPM ont réduit cette réponse de 30 % ($p < 0,01$) et 70 % ($p < 0,001$) respectivement. Les données de cette expérience sont cumulées et représentées par les histogrammes représentés par les figures 57 et 58. Les données indiquent aussi que la PM et l'EPM ont induit une inhibition concomitante de la translocation SGLT-1 et de la PKC dans les MBB *in vivo*.

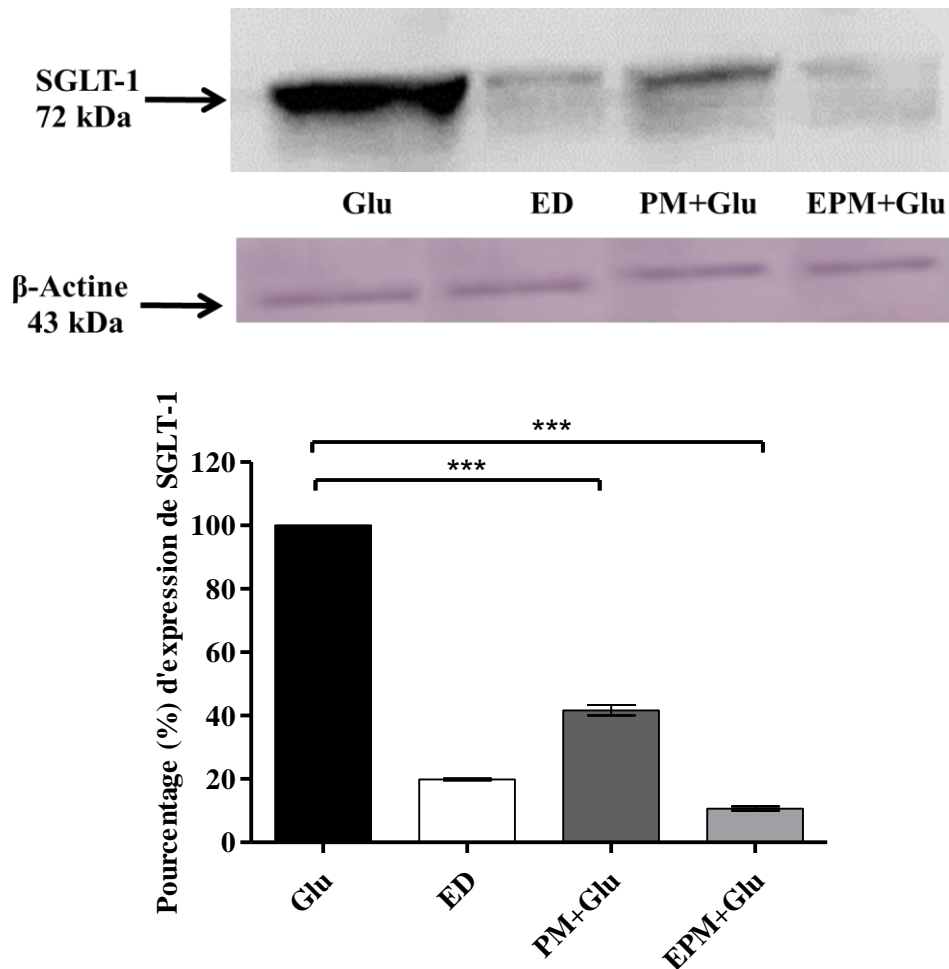


Figure 57: L'expression de la protéine SGLT-1 au niveau de l'intestin de souris après gavage avec la poudre ou de l'extrait phénolique de margines et en présence du glucose : Les souris ont été gavées avec du glucose 1 g/kg en absence et en présence de poudre de margines (PM) 4 g/kg, 500 mg/kg d'extrait phénolique de margines (EPM) respectivement après 15 min de traitement. Les teneurs en protéines ont été suivies par analyse du Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine cible est indexée à celle de l'actine. L'expérience a été répétée 3 fois. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type. Les

valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type. (*: Signification par rapport au contrôle (Glu 1g/kg), $P<0,05$).

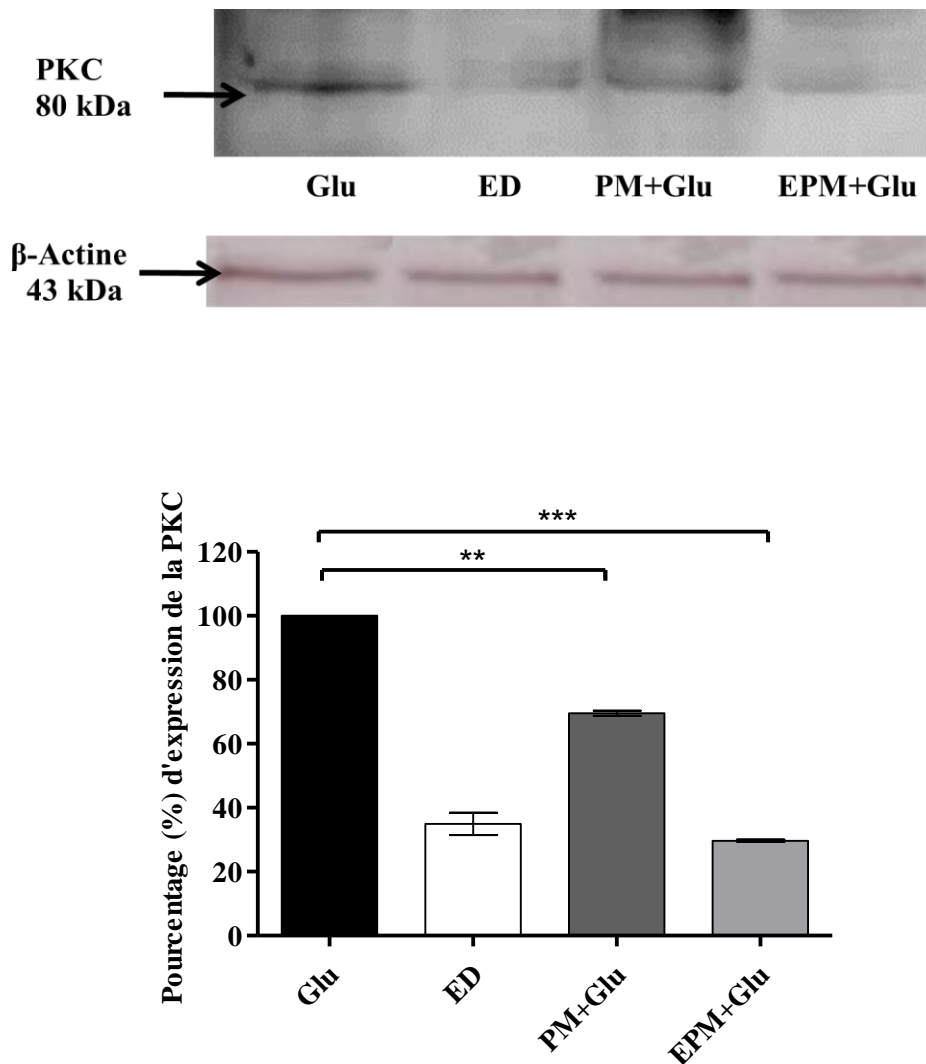


Figure 58: L'expression de la PKC au niveau de l'intestin de souris après gavage avec la poudre ou de l'extrait phénolique de margines et en présence du glucose : Les souris ont été gavées avec du glucose 1 g/kg (Glu) en absence et en présence de poudre de margines (PM) 4 g/kg, 500 mg/kg d'extrait phénolique de margines (EPM) respectivement après 15 min de traitement. Les teneurs en protéines ont été suivies par analyse du Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine cible est indexée à celle de l'actine. L'expérience a été répétée 3 fois. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type. (*: Signification par rapport au contrôle (Glu 1g/kg), $P<0,05$).

Le présent travail est la première investigation portant sur les effets hypoglycémiantes de la PM et d'EPM. L'hyperglycémie en particulier le DT2 est une conséquence de la combinaison de la production élevée de glucose endogène, associée aux taux plus élevés de la gluconéogenèse, aux processus de la glycogénolyse et à l'absorption réduite du glucose par les tissus périphériques (ABDUL-WAHED *et al.*, 2014). Récemment, il a été démontré que la régulation de l'absorption intestinale du glucose par le co-transporteur Na⁺/glucose SGLT-1 est l'une des clés dans le traitement du diabète (BAUD *et al.*, 2016). Ainsi, la recherche et / ou le développement de nouveaux composés qui corrigent l'absorption intestinale seront importants pour fournir de nouvelles options pour le traitement du diabète (LENEY *et al.*, 2009). En outre, une attention récente a été accordée à l'étude de l'activité antidiabétique de nombreuses espèces végétales à travers le monde, en testant différents modèles et méthodes expérimentales (PATEL *et al.*, 2012 ; GIOVANNINI *et al.*, 2016).

La consommation de l'huile d'olive et les polyphénols de l'huile d'olive ont été largement discutés dans un grand nombre de travaux et ont recommandé leurs utilisations thérapeutiques en médecine préventive pour leurs propriétés antidiabétiques, anti-athérosclérotiques et anti-inflammatoires (SCODITTI *et al.*, 2014). L'huile d'olive a été revendiquée comme étant très efficace dans le traitement du DT2 (ZHANG *et al.*, 2008).

D'après la littérature consultée, les margines d'olives brutes et l'extrait phénolique total de ces margines n'ont pas eu l'attention des chercheurs dans leurs investigations sur le plan pharmacologique. Seul l'hydroxytyrosol purifié des margines a suscité cet intérêt notamment vis à vis de son activité hypoglycémiantes chez les rats *Wistar* diabétiques induit par l'alloxane qui a été rapporté par HAMDEN *et al.* (2009). Mais on connaît peu l'effet des margines sur la santé humaine. Dans ce contexte, les efforts de recherche ont été orientés vers la valorisation de ce sous-produit issu de l'extraction de l'huile l'olive pour la production de divers composés d'intérêt tels que les composés phénoliques (RAMOS *et al.*, 2013). Cependant, les informations sur la sécurité sanitaire des margines sont essentielles, car les plantes médicinales sont facilement accessibles par la population et d'autre part, divers effets toxicologiques ont été observés après utilisation abusive des préparations à base de plantes. Les souris sont couramment utilisées pour des études expérimentales de la toxicité aiguë des extraits végétaux, après administration orale à fortes doses (MU *et al.*, 2011). Les données de notre étude ont montré que les doses testées de la PM et de l'EPM ne présentaient aucun effet de toxicité aiguë chez les souris jusqu'à la dose de 8 g/kg et 1000 mg/kg pour la PM et les EPM respectivement.

Ainsi, nous avons étudié l'effet de la PM et de l'EPM sur la tolérance au glucose chez les souris mâles C57BL/6.J. Les doses de 0,5 à 4 g/kg pour la PM et de 10 mg/kg à 500 mg/kg pour l'EPM ont été choisies pour évaluer l'activité hypoglycémiantes de ces derniers. Après mesure de la glycémie des souris, les résultats du test ont démontré un effet bénéfique de la PM et de l'EPM dans la régulation de la glycémie et qui est dose dépendante.

L'activité de la PM et de l'EPM à différentes concentrations sur le tissu intestinal de souris a été aussi entreprise visant le co-transporteur glucose sodium dépendant SGLT-1 en utilisant le système polarisé de la chambre d'Ussing. Après l'état d'équilibre (40 min), la muqueuse jéjunale (côté muqueux) est mise en contact avec du D-glucose (10 mmol/l) et l'activité de SGLT-1 a suivi une augmentation dépendante du Na⁺ dans le courant de court-circuit (Isc). Les co-transporteurs constituent une classe importante de protéines

transmembranaires et leur rôle consiste à coupler le gradient électrochimique favorable d'union à un substrat afin d'acheminer ce dernier de l'autre côté de la membrane plasmique contre son gradient de concentration (WRIGHT *et al.*, 2011). L'archétype des protéines qui effectuent ce type de transport est le co-transporteur glucose sodium dépendant SGLT-1. SGLT-1 est une protéine de 72 kDa qui utilise le gradient électrochimique du Na⁺ afin d'accumuler le glucose dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle et du tubule proximal rénal où elle est responsable d'environ 10 % de la réabsorption du glucose contenu dans le filtrat glomérulaire. Cette protéine est exprimée à la membrane apicale de ces cellules et c'est la pompe Na⁺/K⁺ -ATPase basolatérale qui maintient le gradient de Na⁺ requis pour fournir l'énergie nécessaire au co-transport (KIRK *et al.*, 2013). La fonction de SGLT-1 fait partie des mécanismes responsables de l'homéostasie qui maintiennent entre 4 et 6 mM la concentration de glucose qui circule dans le sang (WRIGHT *et al.*, 2011).

Aucune information n'est disponible sur l'effet et le mécanisme d'action des margines brutes et peu d'informations sont présentes sur l'effet des polyphénols sur le transport intestinal du glucose, en particulier en utilisant la chambre d'Ussing (CLARKE, 2009). Dans notre étude, la PM et l'EPM inhibent l'absorption de D-glucose par le co-transporteur Na⁺/glucose (SGLT-1). Considéré comme une molécule clé dans la régulation de l'entrée du glucose. En effet le SGLT-1 est le transporteur majeur du glucose dans l'intestin (WRIGHT et TURC, 2004), son activité est fortement régulée par des peptides et hormones (DUCROC *et al.*, 2005 ; BELHARBI *et al.*, 2009 ; DRAY *et al.*, 2013).

L'étude de l'expression du SGLT-1 et PKC par le Western blot a été aussi effectuée en présence et en absence de la PM et de l'EPM *in vivo* sur l'intestin des souris et *in vitro* sur la lignée cellulaire intestinale de souris Mode K. Une réduction du niveau de la bande du SGLT-1 a été observée pour les concentrations testées et une réduction de la bande de PKC a été observée par rapport aux contrôles positifs. L'inhibition de l'activité de SGLT-1 par la PM et l'EPM dans notre étude dépendait de sa translocation vers la bordure en brosse intestinale ainsi que la participation de PKC, un effecteur clé dans le transport du glucose (HELLIWELL *et al.*, 2003 ; POULSEN *et al.*, 2015).

La PKC appartient à une superfamille des sérine-thréonine kinases. Cette famille se compose de 11 isoenzymes qui sont exprimés de façon omniprésentes dans tous les tissus de l'organisme humain (AZZI *et al.*, 1992). La PKC est principalement impliquée dans la phosphorylation des protéines cibles contrôlant l'activation et l'inhibition directement ou indirectement de nombreux processus cellulaires. La famille des PKC joue un rôle clé dans de nombreuses fonctions biologiques telles que l'apoptose, la prolifération cellulaire, la régulation de la transcription, les réponses immunitaires, signalisation cellulaire, apprentissage et la mémoire (DAS *et al.*, 2016). Les PKC sont également impliquées dans les maladies cardiovasculaires comme la cardiopathie ischémique aiguë et les maladies cardiaques chroniques et l'insuffisance cardiaque (PALANIYANDI *et al.*, 2009), l'accident vasculaire cérébral, les complications du rénales liées au diabète (ISHII *et al.*, 1996) diverses affections dermatologiques y compris le psoriasis (MAIOLI et VALACCHI, 2010), les états pathologiques neurologiques, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (MOCHLY-ROSEN *et al.*, 2012). L'un des principaux objectifs des chercheurs dans l'étude de la PKC et de ces isoenzymes comme cible thérapeutique est de développer des ligands puissants et sélectifs pour réguler la signalisation des PKC principalement dans ces états pathologiques

(DAS et *al.*, 2016). En effet beaucoup de travaux ont démontré divers effets des polyphénols dans la modulation de l'activité des PKC parmi ces polyphénols; le resvératrol, Epigallocatechine 3-gallate (EGCG), la quercétine, l'acide tannique, l'acide ellagique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide protocatechuique ont été largement étudiés (DAS et *al.*, 2016). Les transporteurs primaires qui opèrent des mouvements de D-glucose dans l'intestin grêle comprennent le co-transporteur Na⁺-D-glucose SGLT-1 et GLUT2 (GORBOULEV et *al.*, 2012). Le glucose intestinal est activement transporté par Na + / glucose co-transporter-1 (SGLT-1) et passivement par GLUT2. Des preuves ont été présentées selon lesquelles SGLT-1 assure la médiation de la plus grande partie du transport de D-glucose dans la membrane de la bordure en brosse intestinale (MBB) des entérocytes, indépendamment de la charge de glucose. SGLT-3b, un second co-transporteur Na + -D-glucose fonctionnel dans la MBB de la souris, ne contribue pas de manière significative au transport du glucose. Après une charge élevée en glucose, certains GLUT2 sont incorporés dans la MBB, mais cela a un impact mineur sur l'absorption du glucose dans l'intestin grêle (GORBOULEV et *al.*, 2012). Dans la présente étude, les mécanismes responsables des effets de la PM et de l'EPM peuvent être impliqués dans la régulation négative de l'expression de la PKC jéjunale qui elle diminue l'expression de SGLT-1. En effet le SGLT-1 comprend un site consensus de phosphorylation par la PKC, et donc la phosphorylation du transporteur pourrait contrôler son activité (WRIGHT et *al.*, 1997 ; BELHARBI et *al.*, 2009). Ces données sont conformes à nos résultats, montrant que la PM et l'EPM inhibent l'activité de SGLT-1 et sa translocation au niveau de la MBB de l'intestin grêle chez les souris traitées. BAUD et *al.* (2016) ont démontré que la diminution de l'apport simultané de glucose et de sodium ainsi que la modulation du trafic intestinal du sodium endogène contribueraient aussi à l'amélioration du contrôle du glucose sanguin. Ces résultats sont en faveur d'une exploration plus approfondie afin de trouver de nouvelles molécules alternatives pour prévenir ou traiter le DT2. Il a été prouvé que l'intestin joue un rôle important dans la régulation de l'absorption du glucose exogène. MEDDAH et *al.* (2009) ont signalé que les entérocytes (LE GALL et *al.*, 2007) et les cellules entéroendocrines (MARGOLSKEE et *al.*, 2007) pouvaient agir ensemble à travers des récepteurs du goût sucré et ainsi le SGLT-1 détecte le glucose entrant. La modulation de SGLT-1 par les peptides digestifs (DUCROC et *al.*, 2005 ; DRAY et *al.*, 2013) et les neuropeptides (DUCROC et *al.*, 2007) pourraient constituer un signal périphérique pour l'hypothalamus afin de contrôler rapidement la glycémie et l'ingestion de la nourriture. Ce signal est susceptible d'être très important car le DT2 se caractérise par une absence d'activité neuronale hypothalamique après l'ingestion du glucose (VIDARSDOTTIR et *al.*, 2007). Il est intéressant dans ce contexte que la PM et l'EPM à de faibles concentrations puisse contrôler l'activité de SGLT-1 du côté luminal rapidement. Cet effet est analogue à celui caractérisé par l'hormone leptine une hormone digestive peptidique qui régule les réserves de graisses dans l'organisme (EL-ZEIN et KREYDIYYEH, 2013), l'apeline qui est un peptide qui régule l'homéostasie du glucose et qui est produit par les cellules digestives proximales (DRAY et *al.*, 2013), les neuropeptides tels que les orexines (DUCROC et *al.*, 2007) et les polyphénols (CHAN and LEUNG, 2015).

NISTOR et *al.* (2010) ont démontré aussi le même effet sur l'expression de SGLT-1 en utilisant l'extrait éthanolique d'une plante médicinale appelée *Rhododendron Tomentosum* parmi 17 plantes issues de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James du nord du

Québec au Canada sur la lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale Caco-2. Les travaux d'ALZAIID *et al.* (2013) sur l'extrait phénolique de baies sauvages enrichies en anthocyanines (cyanidines 44,5 %; delphinidines 26,1 % ; petunidines 14,4 %; malvidines 8,9 %) n'ont démontré aucun effet sur SGLT-1, par contre une réduction significative de l'expression de GLUT2 a été observée par rapport au contrôle sans extrait sur la lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale Caco-2. Les connaissances de la modulation de l'absorption intestinale et la réabsorption rénale du glucose ne cessent de s'intensifier. Les deux processus sont réalisés par des transporteurs de glucose dépendants du Na⁺ (SGLTs). Le SGLT-1 et le SGLT-2 représentent des cibles potentielles dans le développement des médicaments pour normaliser la glycémie chez les patients diabétiques (BAUD *et al.* (2016). Le composé le plus étudié pour élucider ces effets est la phloridzine. En 1922, il a été montré pour la première fois que le transport intestinal du glucose est diminué suite à une exposition à la phloridzine un flavonoïde glucoside extrait des pommes (CHAO et HENRY, 2010) et en 1962, ALVARADO démontre que cette diminution est due à une inhibition compétitive du transport du glucose dépendant du sodium à travers la membrane en brosse des entérocytes. Malheureusement les applications cliniques de ce dernier sont limitées à cause de son hydrolyse par les β -glucosidases intestinales. Pour surmonter ce problème, plusieurs analogues ont été synthétisés chimiquement à partir de la phloridzine comme la canagliflozine et dapagliflozine (CHAO et HENRY, 2010). Des études cliniques récentes rapportées par BAUD *et al.* (2016) ont confirmé le potentiel thérapeutique de l'inhibition intestinale de SGLT-1, en utilisant deux analogues de la phloridzine (GSK-1614235 et KGA-2727) sur des rats et des patients normaux recevant une alimentation riche en glucides ce qui a fait baissé la glycémie. En effet l'administration dose-dépendante de ces deux analogues a entraîné une amélioration du contrôle du glucose chez les patients atteints de DT2 (DOBBINS *et al.*, 2015). Ces composés peuvent être administrés oralement et plusieurs d'entre eux ont un effet inhibiteur plus puissant que la phloridzine, mais leur application clinique nécessite des investigations supplémentaires (CHAO et HENRY, 2010 ; DOBBINS *et al.*, 2015). D'autres polyphénols comme ceux présents dans le thé vert (epigallocatechine gallate (EGCG) et epicatechine gallate (ECG)) diminuent le transport intestinal du glucose probablement par une inhibition compétitive du SGLT-1 (MARTEL *et al.*, 2010). Dans son étude, JOHNSTON (2005) suggère que les flavonoïdes glycosides inhibent le transport actif du glucose tandis que les aglycones inhibent le transport facilité du glucose dans son étude sur la lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale Caco-2. Outre les catéchines, d'autres composés polyphénoliques exercent le même effet sur l'absorption intestinale du glucose. La quercétine-3-O-glucoside et la quercétine-4-O- glucoside exerçaient leurs effets par une inhibition compétitive du SGLT-1 alors que la quercétine-3-O-galactoside, quercétine-3-O-glucorhamnoside (rutine) et quercétine aglycone sont dépourvues de cet effet (MARTEL *et al.*, 2010). Les acides ; caféique, férulique et chlorogénique ont provoqué une inhibition de l'absorption intestinale du glucose par l'inhibition du SGLT-1 au niveau de la MBB chez le rat. L'effet anti-hyperglycémiant *in vivo* sur des rats diabétiques de l'acide caféique ou de l'acide chlorogénique sont probablement le résultat d'une action directe sur les tissus périphériques plutôt que le résultat d'une inhibition de l'absorption de glucose au niveau de la MBB intestinale (JOHNSTON *et al.*, 2005). Cet effet instantané est probablement dû à une compétition des composés phénoliques pour le site de liaison du glucose au transporteur ou à

une dissipation du gradient de sodium à travers la MBB (PARK et *al.*, 2014). La phloridzine et certains composés phénoliques comme l'acide chlorogénique et l'acide tannique, qui sont présents dans certains extraits de plantes sont connus d'exercer leur effet inhibiteur via ces mécanismes (PARK et *al.*, 2014). HAMDEN et *al.* (2009) ont démontré de bons effets antidiabétique et antioxydant de l'hydroxytyrosol extrait des margines d'olives sur des rats diabétiques. En effet l'administration de l'hydroxytyrosol pendant deux mois à une dose de 20 mg/kg a diminué de 55 % le taux de glucose plasmatique par rapport aux rats diabétiques non traités. L'étude du pancréas après sacrifice des souris traitées par l'hydroxytyrosol a démontré un effet protecteur des cellules β -pancréatiques de celui-ci contre les dommages et la mort induite par le stress oxydatif. HAMDEN et *al.* (2009) ont rapporté que l'effet antidiabétique de l'hydroxytyrosol semble être lié au piégeage des radicaux libres et à son activité anti-inflammatoire. Dans d'autres études, les effets hypoglycémiantes des composés polyphénoliques alimentaires ont été attribués : à l'inhibition de la digestion des glucides en inhibant l' α -amylase salivaire et pancréatique, à l'inhibition de l' α -glucosidase dans la MBB intestinale, à l'inhibition de l'absorption du glucose ou la stimulation de la sécrétion d'insuline et à la protection des cellules β -pancréatiques contre la glucotoxicité. En outre, les composés phénoliques peuvent supprimer la libération du glucose du foie et améliorer leur absorption dans les tissus périphériques en modulant la signalisation intracellulaire (KIM et *al.*, 2016). Par ailleurs, plusieurs plantes médicinales sont à l'origine des médicaments modernes utilisés aujourd'hui. Parmi ces derniers, la metformine extraite d'une plante appelée *Galega officinalis*, a été beaucoup utilisée traditionnellement dans le traitement du DT2 (CUSI et DE FRONZO, 1998). En effet les plantes médicinales jouent un rôle important dans la prévention et le traitement du DT2, spécialement dans les pays en voie de développement où les ressources sont faibles et les assurances médicales sont limitées (EZURUIKE et PRIETO, 2014). Si cette approche fonctionnait, elle aurait le mérite non seulement de réduire l'apport glucidique, mais aussi d'abaisser la quantité énergétique, ce qui exercerait aussi un effet direct sur le poids corporel et, donc un effet sur l'obésité. La stratégie de limiter la biodisponibilité des nutriments par l'inhibition de la digestion ou de l'absorption est souvent utilisée dans des approches thérapeutiques pour de nombreux désordres tels que l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires (CHAIT et ECKEL., 2016). Dans notre étude, cette même démarche a été employée pour tester l'efficacité de la PM et de l'EPM *in vitro* et *in vivo*.

Conclusion générale et perspectives

Le verger oléicole mondial destiné à la production d'huile d'olive est en pleine expansion et se concentre à plus de 95 % 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 qui impactent fortement sur l'environnement. La valorisation de ce sous-produit comme source de molécules à haute valeur ajoutée a fait l'objet de cette thèse.

Dans cette thématique, nous nous sommes intéressés à la caractérisation physicochimique des margines, à l'extraction et à la caractérisation de leurs contenus en composés phénoliques, en vue d'étudier leur potentiel antioxydant, antifongique et leur action hypoglycémiant sur un modèle cellulaire murin d'origine intestinal, les cellules Mode-K et sur un modèle animal murin, les souris saines C57BL/6J.

La caractérisation physicochimique des margines étudiées a montré un contenu appréciable en polyphénols avec un taux de 5,29 g en EAG/100 g de poudre de margines. Concernant la caractérisation des polyphénols par HPLC. L'analyse a révélé que les composés phénoliques contenus dans l'EPM sont en majorité, l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide gallique, l'acide *p*-coumarique, l'acide protocatechique, l'oleuropeine, l'acide vanillique et l'acide caféique. L'hydroxytyrosol représente le pic le plus élevé avec une proportion de 54,23%, l'hydroxytyrosol (3, 4-dihydroxyphényléthanol, HT) qui est le composé phénolique majeur dans les margines suivi de l'acide protocatechique avec proportion de l'ordre de 14,35 %. Ces deux derniers se distinguent comme des composés à forte valeur ajoutée, dû à leurs diverses activités biologiques, notamment leur activité anti-oxydante qui est bénéfique pour la santé humaine.

Les potentialités anti-oxydantes de ces deux produits par rapport aux antioxydants standards à savoir l'acide ascorbique et le trolox ont été évaluées par divers méthodes ; piégeage directe des radicaux libres par la méthode du DPPH• et de l'ABTS^{•+} et le pouvoir réducteur du fer.

Les résultats obtenus ont révélé des capacités anti-oxydantes importantes pour la PM et l'EPM. Un fort pouvoir de piégeage du radical DPPH• par l'EPM a été enregistré et classé comme suit : EPM > trolox > Acide ascorbique > PM > Acide caféique > acide gallique. La valeur de l'IC50 la plus basse est lue avec 25 µg/ml de l'EPM. Par ailleurs l'acide ascorbique a manifesté un pouvoir de piégeage du radical ABTS^{•+} plus important que celui de l'EPM à la même dose test de 20 µg/ml. Cependant le pouvoir de piégeage du radical ABTS^{•+} de l'EPM reste supérieur à celui du Trolox qui est un antioxydant de référence et de la PM à la même concentration. Cette activité peut être classée comme suit : acide ascorbique > EPM > Trolox > PM. Un fort pouvoir de réduction du fer de l'EPM a été aussi enregistré. En effet l'EPM a présenté une capacité importante à réduire le Fer avec une IC50 de 17,08 µg/ml en comparaison avec celle des standards utilisés (trolox et l'acide ascorbique) avec des IC50 de 18,21 µg/ml et de 17,89 µg/ml respectivement. La capacité de réduction du fer est classé comme suit : EPM > acide ascorbique > PM > trolox. Les capacités anti-oxydantes révélées *in vitro* sont en relation directe avec le contenu en métabolites secondaires de chaque produit testé et dépendent de l'ensemble des substances anti-oxydantes, de leur nature, leur quantité, leur structure et de toutes les interactions moléculaires qui peuvent agir de façon synergique pour faire hausser cette activité qui peut être très utile pour renforcer l'organisme dans le cas

de situation de stress oxydatif et de prévenir les différentes pathologies qui peuvent survenir suite à une attaque radicalaire.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude d'autres activités biologiques et les potentialités que peuvent avoir ces produits *in vitro* et *in vivo* à savoir les capacités antifongique, anti-aflatoxinogène et hypoglycémiant.

Les résultats de cette étude montrent clairement que la PM et l'EPM sont capables d'inhiber la croissance fongique sur milieu liquide SMKY et sur le maïs broyé choisi comme matrice alimentaire. Cette inhibition est rangée entre 15,04 % et 100 %. La PM et les composés phénoliques contenus dans l'EPM provoquent l'inhibition totale de la souche aflatoxinogène *Aspergillus flavus*. De plus les potentialités de ces deux produits ne se limitent pas à une action antifongique mais vont jusqu'à une action anti-aflatoxinogène dont l'EPM reste le plus puissant. Effectivement la production de l'AFB1 observée dans le milieu liquide SMKY avec une concentration de 250 mg/L d'EPM pendant 7 jours d'incubation a abouti à un maximum de réduction de l'AFB1 de 100 %.

Concernant l'effet hypoglycémiant de la PM et l'EPM, les résultats du test d'innocuité *in vivo* n'ont révélé aucune toxicité remarquable chez les souris males C57BL/6J jusqu'à la dose de 8 g/kg et 1000 mg/kg pour la PM et les EPM respectivement. Les doses de 0,5 à 4 g/kg pour la PM et de 10 mg/kg à 500 mg/kg pour l'EPM ont été choisies pour évaluer l'activité hypoglycémiant de ces derniers. Après mesure de la glycémie des souris, les résultats du test ont montré un effet bénéfique de la PM et de l'EPM dans la régulation de la glycémie et qui est dose dépendante.

L'activité de la PM et de l'EPM à différentes concentrations sur le tissu intestinal de souris a été aussi entreprise, visant le co-transporteur SGLT-1 en utilisant le système polarisé de la chambre d'Ussing. Dans notre étude, la PM et l'EPM inhibent l'absorption de D-glucose par le co-transporteur SGLT-1, considéré comme une molécule clé dans la régulation de l'entrée du glucose.

L'étude de l'expression du SGLT-1 et de la PKC *in vivo* au niveau de MBB de l'intestin des souris après gavage et *in vitro* et sur la lignée cellulaire intestinale de souris Mode-K a été aussi effectuée par le Western blot en présence et en absence de la PM et de l'EPM. L'étude des membranes intestinales de souris a révélée une réduction du niveau d'expression du co-transporteur SGLT-1. Une réduction significative de 60 % et de 88 % a été observée pour les concentrations testées de 4 g/kg et 500 mg/kg de la PM et d'EPM respectivement et une réduction de 30 % et 70 % de l'intensité de la bande de la PKC pour les mêmes concentrations ont été observée par rapport au contrôle positif (glucose seul 1g/kg). L'étude de la lignée cellulaire intestinale de souris Mode-K indique une inhibition significative de SGLT-1 de 60 % pour la PM et de 70 % pour l'EPM par rapport à la réponse au PMA (molécules de synthèse). La PM et l'EPM ont réduit de 45 % et 55 % respectivement de l'intensité de la bande de la PKC pour les concentrations testées qui sont de 30 mg/ml, 10 µg/ml respectivement par rapport à la réponse au PMA (10 ng/ml).

Ces résultats peuvent envisager l'utilisation de ces molécules dans le domaine agroalimentaire. En effet, par leurs richesses en substances bioactives la PM et l'EPM ont la capacité de réduire significativement la population fongique d'*A. flavus* et de limiter ainsi la contamination des grains, des semences et des cultures et de prévenir la production des aflatoxines et peuvent être aussi le moyen de lutte non seulement dans les champs mais après

récolte et au moment de la conservation des produits végétaux. Ces substances peuvent constituer une alternative aux substances chimiques nocives pour l'environnement et la santé dans le bio-contrôle de la flore fongique et mycotoxique. Ces résultats, justifient des recherches futures mettant l'accent sur les propriétés antifongiques des sous-produits de l'huile d'olive et leur utilisation possible en tant qu'alternative pour contrôler la croissance microbienne dans les denrées alimentaires stockées. Entre autre par leur action anti-oxydante, ils peuvent contribuer à l'amélioration de la durée de vie d'un aliment et de ses propriétés organoleptiques en protégeant ses constituants contre l'oxydation.

Dans le domaine de la santé ces molécules peuvent avoir des applications surtout pour la prévention des maladies liées au stress oxydant, ainsi que dans la régulation de la glycémie. En réduisant l'absorption intestinale du glucose via SGLT-1 qui elle-même dépend de la PKC.

Il serait intéressant à l'avenir de compléter cette étude par l'exploration d'autres voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la régulation de l'homéostasie et du métabolisme glucidique (voies de PKA, PI-3 Kinase, ERK, AMPK) chez les cellules périphériques insulino-sensibles (hépatocytes, adipocyte...etc.) et de voir l'effet de la PM et de l'EPM chez un modèle animal de DT2.

Par ailleurs, Il serait nécessaire aussi d'isoler et de caractériser la ou les molécules potentiellement anti-oxydantes des fractions les plus actives des margines, de déterminer la toxicité de ces produits purs et de préciser les doses LD50 sur des modèles animaux.

Références bibliographiques

-A-

- ABAD-GARCÍA B., BERRUETA LA., LÓPEZ-MÁRQUEZ DM., CRESPO-FERRER I., GALLO B. and VICENTE F. (2007).** Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 87-96.
- ABBAS HK., WILKINSON JR., ZABLOTOWICZ RM., ACCINELLI C., ABEL CA., BRUNS H A. and WEAVER M A. (2009).** Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28(2-3), 142-153.
- ABDELMOATY MA., IBRAHIM MA., AHMED NS. and ABDELAZIZ MA. (2010).** Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of quercetin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25, 188-192.
- ABDUL-WAHED A., GAUTIER-STEIN A., CASTERAS S., SOTY M., ROUSSEL D., ROMESTAING C., GUILLOU H., TOURETTE JA., PLECHE N., ZITOUN C., GRI B., SARDELLA A., RAJAS F. and MITHIEUX G. (2014).** link between hepatic glucose production and peripheral energy metabolism via hepatokines. *Molecular Metabolism*, 3, 531-543.
- ABIDA KALSOOM K., REHANA R., NIGHAT F., SADAF M., SADULLAH M., SARA K., NYLA J and GHULAM M. (2015).** Pharmacological activities of protocatechuic acid. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 72 (4) 643-650.
- ABU KHAYER M., COWDHURY M B., AKRATOS C S., VAYENAS DV. And PAVLOU S. (2013).** Olive mill waste composting: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 108-119.
- ACHAK M., OUAZZANI N., YAACOUBI A. and MANDI L. (2008).** Modern olive mill effluent characterization and their treatment by coagulation-flocculation using lime and aluminium sulphate. *Revue des Sciences de l'Eau*, 21 (1), 53-67.
- ACHAK M., OUAZZANI N. and MANDI L. (2011).** Organic pollutants removal from olive mill wastewater by a combined system of a sand filter and an aquatic plant system. *Revue des Sciences de l'Eau*, 24(1), 35-51.
- ADA. (2010).** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 33 (1). S62-S69.
- AFSSA. (2009).** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Rapport final, Mars 2009. 261p.
- AGGOUN M., ARHAB R., CORNU A., PORTELLI J., BARKAT M. and GRAULET B. (2016).** Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process. *Food Chemistry*, 209, 72-80.
- AGUILERA M., QUESADA MT., DEL ÁGUILA VG., MORILLO JA., RIVADENEYRA RA., RAMOS-CORMENZANA A. and MONTEOLIVA-SÁNCHEZ M. (2008).** Characterisation of *Paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. *Bioresource Technology*, 99 (13), 5640-5644.

- AHARONI A. and GALILI G. (2011).** Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 239-44.
- AISSAM H. (2003).** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. Université sidimohamed ben abdellah. Fes. Tunisie. 156p.
- AIT BADDI G., CEGARRA J., MERLINA G., REVEL J.C. and HAFIDI M. (2009).** Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste-wheat straw mixture. *Journal of Hazardous Materials*. 165(1-3), 1119-23.
- ALBURQUERQUE JA., GONZALVEZ J., GARCIA D. and CEGARRA J. (2004).** Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91(2), 195-200.
- ALIBERT G., RANJEVA R. and BOUDET AM. (1977).** Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiologie végétale*, 15, 279-301.
- ALLOUCHE N., FKI I. and SAYADI S. (2004).** Towards a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 267.
- ALVARADO F. and CRANE RK. (1962).** Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine, *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 56, 170-172.
- ALVARADO F. (1967).** Hypothesis for the interaction of phlorizin and phloretin with membrane carriers for sugars. *Biochimica et Biophysica Acta*, 135, 483-495.
- ALZAID F., CHEUNG HM., PREEDY VR. and SHARP PA. (2013).** Regulation of glucose transporter expression in human intestinal Caco-2 cells following exposure to an anthocyanin-rich berry extract. *PLoS One*, 8(11), e78932.
- AMARAL CARLA., MARCO S. LUCAS., JOA˜O COUTINHO., ANTONIO L. CRESPI., MARIA DO ROSAˆRIO ANJOS A. and CÉLIA PAIS B. (2008).** Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal. *Bioresource Technology*, 99, 7215-7223.
- AMEYAWI EO., KOFFUOR GA., ASAREI KK., KONJAI D., DU-BOISI A., KYEI S., FORKUO AD. and OWUSU MENSAH RNA. (2016).** Cryptolepine, an indoloquinoline alkaloid, in the management of diabetes mellitus and its associated complications. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(3), 263-273.
- AMIOT MJ., FLEURIET A. and MACHEIX J J. (1989).** Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28, 67-69.
- AMRO B., ABURJAI T. and AL-KHALIL S. (2002).** Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia*, 73(6), 456-461.
- ANDREASEN M F., LANDBO A.K., CHRISTENSEN L P., HANSEN A. and MEYER A. S. (2001).** Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4090-4096.
- ANINI Y. and BRUBAKER PL. (2003).** Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* 52: 252-259.

ANONYME 1. ONFAA. (Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires). Juin **2016**. Bilan de la campagne oléicole 2015/2016 « Segment huile d'olive ». République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche.

ANONYME 2. ONFAA (Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires). Juin **2014**. Marché International de l'huile d'olive Juin 2014. République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche.

ANONYME 3. ONFAA (Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires). Octobre **2016**. Note de conjoncture. Suive de la campagne oléicole 2016/2017. République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche.

ANONYME 4.ONFAA. (Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires). Février **2016**.

Bilan du commerce extérieur algérien des céréales 2015. République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche.

ANONYME 5. ONFAA. (Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires). Mai **2017**. Note de conjoncture. Le commerce international des céréales. République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche.

ANONYME 6. (2013). Conductivité théorie et pratique. Guide pour des Mesures Fiables en pH-métrie, Ionométrie et Conductimétrie. Radiometer analytical SAS, France.52p.

ANONYME 7. (2011). MYCOTOXINES : Guide d'utilisation des kits immunoenzymatiques format microplaques (kits ELISA).Institut de Recherches Technologiques Agro-Alimentaires des Céréales. Version 2.30p.

AOAC. (2005). Food Composition; Additives; Natural Contaminants. subchapter1: Mycotoxins/subchapter 2 Aflatoxins.Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis (17th ed), Vol. II. Chapter 49: 1-42. Washington.

ARAÚJO M., PIMENTEL F B., ALVES R C.and OLIVEIRA M B P P. (2015). Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 200-211.

ARNAO M., CANO A.and ACOSTA M. (2001).The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*,73, 239–244.

ASANO N., IKEDA K., KASAHARA M., ARAI Y and KIZU H. (2004). Glycosidase-inhibiting pyrrolidines and pyrrolizidines with a long side chain in *Scilla peruviana*. *Journal of Natural Products*, 67, 846–850.

ASFI M., OUZOUNIDOU G., PANAJIOTIDIS S., THERIOS I.and MOUSTAKAS M.(2012). Toxicity effects of olive-mill wastewater on growth, photosynthesis and pollen morphology of spinach plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 69-75.

ASIF A. (2014). The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern.*Journal of Education and Health Promotion*,3,1.

- ASTORECA AL., DALCERO AM., FERNANDEZ PINTO V. and VAAMONDE G. (2011).** A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in poultry feeds. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 38–43.
- ATAS M., YARDIMCI Y. and TEMIZEL A. (2012).** A new approach to aflatoxin detection in chili pepper by machine vision. *Computers and Electronics in Agriculture*, 87, 129–141.
- ATTIA ES., AMER AH. and HASANEIN MA. (2017).** The hypoglycemic and antioxidant activities of garden cress (*Lepidium sativum* L.) seed on alloxan-induced diabetic male rats. *Natural Product Research*, 13, 1-5. doi: 10.1080/14786419.2017.1413564.
- ATWAL R. (2003).** In vitro Antimicrobial Activity Assessment of zymox otic solution Against a Broad Range of Microbial Organisms. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 1 (3), 240-252.
- AZIZ NH., FARAG SE., MOUSA LA A. and ABO-ZAID MA. (1998).** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, 93, 43-54.
- AZZI A., BOSCOBOINIK D. and HENSEY C. (1992).** The protein kinase C family. *European journal of biochemistry*, 208(3), 547-557.

-B-

- BAHADORAN Z., MIRMIRAN P. and AZIZI F. (2013).** Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12(1), 43.
- BALASUNDRAM N., SUNDRAM K. and SAMMAN S. (2006),** Phenolic compounds in plant and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- BASSANI B., ROSSI T., DESTEFANO D., PIZZICHINI D., CORRADINO P., MACRI N., NOONAN DM., ALBINI A. and BRUNO A. (2016).** Potential chemopreventive activities of a polyphenol rich purified extract from olive mill wastewater on colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 27, 236-248.
- BATAILLE D., DALLE S., HANI EH., LONGUET C., COSTES S. and FONTES G. (2004).** Physiopathologie de la secretion du glucagon. *Annales d'Endocrinologie*, 65 (1), 24-27.
- BATTILANI P., TOSCANO P., VAN DER FELS-KLERX H. J., MORETTI A., CAMARDO LEGGIERI M., BRERA C., RORTAIS A., GOUMPERIS T. and ROBINSON T. (2016).** Aflatoxin B₁ contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6, 24328.
- BAUD G., DAOUDI M., HUBERT T., RAVERDY V., PIGEYRE M., HERVIEUX E, DEVIENNE M., GHUNAIM M., BONNER C., QUENON A., PIGNY P., KLEIN A., KERR-CONTE J., GMYR V., CAIAZZO R. and PATTOU F. (2016).** Bile Diversion in Roux-en-Y Gastric Bypass Modulates Sodium-Dependent Glucose Intestinal Uptake. *Cell Metabolism*, 23, 547-553.
- BEDOUHENE S., MOULTI-MATI F., MY-CHAN DANG P. and EL-BENNA J. (2017).** Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the *N*-formyl-methionyl-leucyl-

phenylalanine-induced neutrophil degranulation and chemotaxis via AKT, p38, and ERK1/2 MAP-Kinase inhibition. *Inflammopharmacology*, 25 (6) 673–680.

BENDARYR E., FRANCISRR., ALI H.M.G., SARWAT M.I. and EL HADY S. (2013). Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 173-181.

BENDINI A., CERRETANI L., CARRASCO-PANCORBO A., GÓMEZ-CARAVACA A.M., SEGURA-CARRETERO A., FERNANDEZ-GUTIERREZ A. and LERCKER G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12, 1679-1719.

BEN-SASSI A., BOULARBAH A., JAOUAD A., WALKER G. and BOUSSAID A. (2006). A comparison of olive oil mill wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*, 41, 74–78.

BENYAHIA N and ZEIN K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) à l'atelier «Pollution and Development issues in the Mediterranean Basin» du 28 janvier 2003 dans le cadre de la 2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II) du 28-29 janvier 2003 à Lausanne, Suisse.

BENOUFAFA S. (2014). L'olivier, une culture millénaire à la conquête de grands espaces. *HuffPostMaghreb*. Publication: 12/07/2014 14h13 CEST, Mis à jour: 12/07/2014 16h17 CEST.

BERTHODE A., BILLARDELLO B. and GEOFFROY S. (1999). Polyphénols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. *Analysis*, 27, 750-757.

BEYER M., KLIX M.B., KLINK H. and VERREET J A. (2006). Quantifying the effects of previous crop, tillage, cultivar and triazole fungicides on the deoxynivalenol content of wheat grain - A review. *Journal for Plant Diseases and Plant Protection*, 113, 241-6.

BHATNAGAR D., CARY JW., EHRLICH K., YU J. and CLEVELAND TE. (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*, 162, 155–166.

BHATNAGAR-MATHUR P., SUNKARA S., BHATNAGAR-PANWAR M., WALIYAR F. and SHARMA K K. (2015). Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, 234, 119–132.

BHATTACHARJEE N., DUA TK., KHANRA R., JOARDARS., NANDY A., SAHA A., DE FEO V. and DEWANJEE S. (2017). Protocatechuic Acid, a Phenolic from *Sansevieria roxburghiana* Leaves, Suppresses Diabetic Cardiomyopathy via Stimulating Glucose Metabolism, Ameliorating Oxidative Stress, and Inhibiting Inflammation. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 251. doi: 10.3389/fphar.2017.00251.

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 Journal of Separation Science*, 26, 409-416.

BLIKA P S., STAMATELATOU K. and KORNAROS M. (2009). Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global NEST Journal*, 11(3), 364-372.

- BLUMA R., AMAIDEN M R. and ETCHEVERRY M.(2008a).** Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B1 accumulation by *Aspergillus* section *Flavi*. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 114–125.
- BLUMA R., AMAIDEN MR., DAGHERO J. and ETCHEVERRY M. (2008b).** Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 203–214.
- BLUMA RV. and ETCHEVERRY MG. (2008c).** Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, 25, 324-334.
- BOREL P. (2014).** Biodisponibilité des phytomicronutriments : Mécanismes impliqués et stratégies d'amélioration. *Innovations Agronomiques*, 42, 27-37.
- BOUDI M., CHEHAT F and CHERIET F. (2013).** Compétitivité de la filière huile d'olive en Algérie : cas de la wilaya de Bejaia. *Les cahiers du CREAD*, 105/106, 89-112.
- BRADFORD MM. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER ME. and BERSSET C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- BRENES M., HIDALGO F., GARCIA A., RIOS J., GARCIA P., ZAMORA R. and GARRIDO A. (2000).** Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77 (7), 710-716.
- BRIANTE R., LA CARA F., TONZIELLO MP., FEBBRIO F and NUCCI R. (2001).** Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic beta-glycosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3198-3203.
- BRIANTE R., PATUMI M., FEBBRAIO F. and NUCCI R. (2004).** Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic beta-glycosidase. *Journal of Biotechnology*, 111, 67–77.
- BROCHARD G. and LE BACLE C. (2009).** Mycotoxines en milieu de travail: Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. *Dossier médico-technique*, INRS. TC128 N° 119, 299-323.
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER ME. and BERSSET C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- BROWNLEE HE., HEDGER J and SCOTT I M. (1992).** Effect of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 40, 227-232.
- BRUNETON J. (2001).** Plantes Toxiques: Végétaux Dangereux pour l'Homme et les Animaux, second Ed. Lavoisier, Paris, pp. 241-242.
- BRUNETON. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie des plantes médicinales. Techniques et Documentation, 3^{ème} Ed, Lavoisier, Paris, 1120p.
- BRYDEN WL. (2012).** Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134-158.
- BURT SA. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in

foods. *International journal of food microbiology*, 94 (3), 16 – 167.

-C-

CAIRNS V., HOPE R. and MAGAN N. (2003).Environmental factors and competing mycoflora affect growth and ochratoxin production by *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Aspects of Applied Biology*, 68, 81-90.

CALVO AM., BOK J., BROOK W and KELLER NP. (2004).veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4733-4739.

CAPORASO N., DIEGO F. and GENOVESE A. (2017).Use of phenolic compounds from olive mill wastewater as valuable ingredients for functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-13. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1343797>.

CARVALHO H DE O., SOUZA BSF., DOS SANTOS IVF., RESQUE RL., KEITA H., FERNANDES CP. and CARVALHO JCT. (2016). Hypoglycemic effect of formulation containing hydroethanolic extract of *Calophyllum brasiliense* in diabetic rats induced by streptozotocin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 634–639.

CARY JW. and CALVO AM. (2008). Regulation of *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Toxin Reviews*, 27, 347-70.

CASA R., D'ANNIBALE A., PIERUCCETTI F., STAZI SR., SERMANI GG. and CASCIO BL. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50 (8), 959-966.

CASALINO E., CALZARETTI G., SBLANO C., LANDRISCINA V., TECCE MF. and LANDRISCINA C. (2002). Antioxidant effect of hydroxytyrosol (DPE) and Mn²⁺ in liver of cadmium-intoxicated rats. *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology and Pharmacology*, 133(4), 625–32.

CASSANO A., CONIDI C., GIORNOL. and DRIOLIE. (2013). Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 248-249, 185-193.

CASSELBRANT A., MALINAUSKAS M., MARSCHALL HU., WALLENIUS V. and FÄNDRIKS L. (2015). Angiotensin II exerts dual actions on sodium-glucose transporter 1-mediated transport in the human jejunal mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 50(9), 1068-75. doi: 10.3109/00365521.2015.1019557.

CASTERA-ROSSIGNOL A. and BOSQUE F. (1994). Nouvelle approche des antioxydants. *OCL. Oléagineux, corps gras, lipides A* 1 (2), 131-143.

CATTHAREEYA T., PAPIROM P., CHANLUN S. and KUPITTAYANANT S. (2013). *Talinum paniculatum* (jacq.) gertn: a medicinal plant with potential estrogenic activity in ovariectomized rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 478-485.

CAYUELA ML., MILLNER PD., MEYER SLF. and ROIG A. (2008). Potential of olive mill waste and compost as biobased pesticides against weeds, fungi, and nematodes. *Science of the Total Environment*, 399, 11–18.

- CELMA AR., ROJAS S., LOPEZ F., MONTERO I. and MIRANDA T. (2007).** Thin-layer drying behaviour of sludge of olive oil extraction. *Journal of Food Engineering*, 80, 1261-1271.
- CHAGAS VT., FRANÇA LM., MALIK M and DE ANDRADE PAES AM. (2015).** Syzygium cumini (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 6,259.
- CHAIT A and ECKEL R H. (2016).** Lipids, Lipoproteins, and Cardiovascular Disease: Clinical Pharmacology Now and in the Future. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(3), 804-814. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3940>.
- CHAN LK. and LEUNG PSM. (2015).** Multifaceted interplay among mediators and regulators of intestinal glucose absorption: potential impacts on diabetes research and treatment. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 309, E887–E99.
- CHAMPEIL A., DORE T. and FOURBET JF. (2004).** *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*, 166, 1389-415.
- CHAO EC and HENRY RR. (2010).** SGLT2 inhibition — a novel strategy for diabetes treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 551–559.
- CHEESEMAN CL. and O'NEILL D. (1998).** Basolateral D-glucose transport activity along the crypt-villus axis in rat jejunum and upregulation induced by gastric inhibitory peptide and glucagon-like peptide-2. *Experimental Physiology*, 83, 605–616.
- CHEN Y G., LI P., LI P., YAN R., ZHANG X Q., WANG Y., ZHANG XT., YE W C. and ZHANG QW. (2013).** α -Glucosidase Inhibitory Effect and Simultaneous Quantification of Three Major Flavonoid Glycosides in *Microctis folium*. *Molecules*, 18, 4221-4232; doi:10.3390/molecules18044221.
- CHHATRE S., NESARI T., SOMANI G., KANCHAN D. and SATHAYE S. (2014).** Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. *Pharmacognosy Reviews*. 8(15), 45-51. doi:10.4103/0973-7847.125530.
- CHIMI H. (1997).** Sous-produits de la transformation des olives : Possibilités de valorisation et de traitement des margines. *Cours international sur l'amélioration de la qualité de l'huile d'olive*, 30-11.
- CHIMI H. (2006).** Technologies d'extraction d'huile d'olive et gestion de sa qualité. Transfert de technologie en agriculture, MAPM/DERD, 141, 1-4.
- CHINAPHUTI A. and AUKKASARAKUL S. (2008).** Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production using herbal extracts. *Journal of Biotechnology*, 136S, S751–S759.
- CHIRA K., SUH JH., SAUCIER C. and TEISSEDRE PL. (2008).** Les polyphénols du raisin, article de synthèse. *Phytothérapie*, 6, 75–82.
- CHOUCHENE A, JEGUIRIM M, TROUVE G, FAVRE-REGUILLON A. and LE BUZIT G. (2010).** Combined process for the treatment of olive oil mill wastewater: absorption on sawdust and combustion of the impregnated sawdust. *Bioresource Technology*, 101(18), 6973-82. doi: 10.1016/j.biortech.2010.04.017.

- CHOUCHENE A, JEGUIRIM M, FAVRE-REGUILLON A, TROUVE´ G, LE BUZIT G, KHIARI B.and ZAGROUBA F. (2012).**Energetic valorisation of olive mill wastewater impregnated on low cost absorbent: sawdust versus olive solid waste. *Energy*, 39,74–81.
- CHRISTENSEN M. (1981).** A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 73, 1056-1084.
- CLARKE LL. (2009).**A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine.*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(6), G1151-1166.
- COMMISSION EUROPEENNE. (2006).**Règlement (CE) No1881/2006 de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). *Journal Officiel de la Communauté Européenne*, L364, 05-24.
- COMMISSION EUROPEENNE. (2007).**Règlement (CE)No1126/2007 de la Commission du 28 septembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 1881/ 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs. *Journal Officiel de la Communauté Européenne*, L255, 14-7.
- COMMISSION EUROPEENNE. (2010).**Règlement No 105/2010 du 5 février 2010 modifiant le règlement (CE) No 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne l'ochratoxine A. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, L35/7.
- COTE CD., ZADEH-TAHMASEBI M., RASMUSSEN B A., DUCA. F A and LAM TKT. (2014).**Hormonal Signaling in the Gut. *The Journal of Biological Chemistry*, 289 (17), 11642-11649.
- COI(Conseil oléicole international).** Novembre 2014. Huile d'olive. Production.
- COI (Conseil oléicole international).** Novembre 2016. NEWSLETTER – MARCHÉ OLÉICOLE Bilans mondiaux de l'huile d'olive – Campagne 2015/16 et 2016/17.
- COI (Conseil oléicole international).** Novembre 2017. NEWSLETTER – MARCHÉ OLÉICOLE Bilans mondiaux de l'huile d'olive – Campagne 2016/17 et 2017/18.
- COLE RJ. and COX RH. (1981).** Handbook of toxic fungal metabolites. *Academic Press*, New York. 937 pp.
- COLE RJ. and SCHWEIKERT MA. (2003).** Handbook of secondary fungal metabolites. *Academic Press (Elsevier Science)*, USA, Volume I, 547- 569.
- COOPER KA., CHOPRA M. and THURNHAM DI. (2004).**Wine polyphenols and promotion of cardiac health. *Nutrition Research Reviews*, 17, 111–129.
- COTELLE N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topic in medicinal chemistry*,1, 569- 590.
- COS P., YING L., CALOMME M., HU J.P., CIMANGA K., VAN POEL B., PIETERS L., VLIENTINCK A.V.and BERGHE D.K. (1998).** Structure –activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavenger. *Journal of natural products*, 61, 71-76.
- COS P., DE BRUYNE T., HERMANS N., APERS S., BERGHE DV. andVLIETINCK AJ.(2004).** Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current Medicinal Chemistry*,11(10),1345-1359.

- COSSU R., BLAKEY N. and CANNAS P.(1993).** Influence of codisposal of municipal solid waste and olive vegetation water on the anaerobic digestion of a sanitary landfill. *Water Science and Technology*, 27 (2), 261-271.
- COTTY P J. (1989).** Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*, 79,808-814.
- CRAWFORD JM., THOMAS PM., SCHEERER JR., VAGSTAD AL., KELLEHER NL.and TOWNSEND CA. (2008).**Deconstruction of iterative multidomain polyketidesynthase function. *Science*, 320, 243-246.
- CRESPY V., MORAND C., BESSON C., COTELLE N., VEZIN H., DEMIGNE C. and REMESY C. (2003).** The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*,284, G980-988.
- COWAN M.(1999).** Plant Product as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.
- CURTIS M., JOLLY A., BUDRY B., RICHARD T., AWUAHB., SIMON C., FIALOR B., JOHNATHAN T. and WILLIAMS C. (2009).** Examining the structure of awareness and perceptions of groundnut aflatoxin among Ghanaian health and agricultural professionals and its influence on their actions. *The Journal of Socio-Economics*, 38, 280–287.
- CUSI K.and DEFRONZO RA.(1998).** Metformin: a review of its metabolic effects.journal: *Diabetes Review* , 6, 98-131.

-D-

- DA CRUZ CABRAL L., PINTO V.F. and PATRIARCA A. (2013).** Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 1–14.
- DANELLAKIS D., NTAIKOUB L., 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*.*Aquatic Toxicology*, 101, 358–366.
- D’ARCHIVIO M., FILESI C., VARI R., SCAZZOCCHIO B. and MASELLA R. (2010).**Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies.*International Journal of Molecular Sciences*,11(4), 1321–1342.
- DAOHONG Z., PEIWU L., QI Z., WEN Z., YANLING H., XIAOXIA D. and JUN J. (2009).** Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure. *Analytica Chimica Acta*, 636, 63–69.
- DAS J., RAMANI R. and OLUFEMI SURAJU M. (2016).** Polyphenol Compounds and PKC Signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1860 (10), 2107–2121.
- DAVIES N D., IYER S K. and DIENERU L. (1987).** Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1593–1595.
- DE GASPARO M., CATT KJ., INAGAMI T., WRIGHT JW.and UNGER T.(2000).** International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.*52(3), 415-472.

- DEIANA M., ARUOMA O I., BIANCHI M D P., SPENCER J P E., KAUR H., HALLIWELL B., AESCHBACH R., BANNI S., DESSI MA. and CORONGIU F P. (1999).** Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 762-769.
- DE LA CASA JA., LORITE M., JIMENEZ J. and CASTRO E.(2009).** Valorisation of wastewater from two-phase olive oil extraction in fired clay brick production. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 271–278.
- DELLA RAGIONE F., CUCCIOLLA V., BORRIELLO A., DELLA PIETRA V., PONTONI G., RACIOPPI L., MANNA C., GALLETTI P. and ZAPPIA V.(2000).** Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome C-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278, 733-739.
- DELGADO-VIRGEN F. and GUZMAN-DE-PEÑA D.(2009).** Mechanism of sterigmatocystin Biosynthesis Regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. *Brazilian Journal Microbiology*, 40(4), 1517-1590.
- DE MARCO E., SAVARESE M., PADUANO A. and SACCHI R .(2007).** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 104, 858–867.
- DERBEL S and GHEDIRA K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 3(1), 28–34.
- DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F and MICHAUD P. (2013).** Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48, 1532–1552.
- DEY LMD, ANOJA S, ATTELE DDS. and CHUN-SU YUAN MD. (2002).** Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine Review*, 7(1), 45-58.
- DHOUB A, ALOUI F, HAMAD N, SAYADI S. (2005).** Complete detoxification of olive mill wastewaters by integrated treatment using the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* followed by anaerobic digestion and ultrafiltration. *Biotechnology*, 4, 153–162.
- DIDRY N., PINKA M. and TORCK M. (1982).** Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *grindelia*. *Plant Medicine Phytotherapy*, XVI, 7-15.
- DIRCKX JH. (1998).** The Honeyed Siphon: Diabetes Mellitus Past, Present and Future. *Perspectives Fall*. 35-41.
- DJERIDANE A., YOUSFI M., NADJEMI B., VIDAL N., LESGARDS JF., STOCKER P. (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. Review article. *European Food Research and Technology*, 224, 801-809.
- DOBBINS RL., GREENWAY FL., CHEN L., LIU Y., BREED SL., ANDREWS SM., WALD JA., WALKER A. and SMITH CD. (2015).** Selective sodium-dependent glucose transporter 1 inhibitors block glucose absorption and impair glucose-dependent insulinotropic peptide release. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(11), G946-954.

- DOWD PF. (1998).** Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, 19, 307-350.
- DRAY C., SAKAR Y., VINEL C., DAVIAUD D., MASRI B., GARRIGUES L., WANECQ E., GALVANI S., NEGRE-SALVAYRE A., BARAK LS., MONSARRAT B., BURLET-SCHILTZ O., VALET P., CASTAN-LAURELL I. and DUCROC R. (2013).** The intestinal glucose–apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterol*, 144, 771-780.
- DUARTE J., PEREZ O., ZARZUELO A., JIMENEZ J., PEREZ-VIZCAINO F. and TAMARGO J. (1993).** Effects of oleuropeoside in isolated guinea-pig atria. *Planta Med*, 59, 318-322.
- DUBOIS M., GILLES KA., HAMILTON JK., REBERS, PA. and SMITH F. (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- DUCROC R, GUILMEAU S, AKASBI K, DEVAUD H, BUYSE M. and BADO A. (2005).** Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes* 54: 348–354.
- DUCROC R., VOISIN T., EL FIRAR A. and LABURTHE M. (2007).** Orexins control intestinal glucose transport by distinct neuronal, endocrine, and direct epithelial pathways. *Diabetes*, 56, 2494-2500.
- DUTTON MF., EHRlich K. and BENNETT JW. (1985).** Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, M1 and M2. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1392–1398.

-E-

- EDWARDS S G. (2003).** *Fusarium* mycotoxins in UK wheat. *Aspects of Applied Biology*, 68, 35-42.
- EDWARDS S G. (2004).** Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153, 29-35.
- EHRENKRANZ JRL., LEWIS NG., RONALD KAHN C. and ROTH J. (2005).** Phlorizin: a review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 21(1), 31-38.
- EL-ABBASSI A., KIAI H. and HAFIDI A. (2012).** Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*, 132, 406-412.
- EL-ABBASSI A., KHAYET M. and HAFIDI A. (2011).** Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 45, 4522 -4530.
- EL-ABBASSI A., SAADAoui N., KIAI H., RAITI J. and HAFIDI A. (2017).** Potential applications of olive mill wastewater as biopesticide for crops protection. *Science of the Total Environment*, 576, 10–21.
- EL-HAJJOUJI H. (2007).** Evolution des caractéristiques physico-chimiques, spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries d'olive au cours de traitements biologique et chimique. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de toulouse. École doctorale : Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Spécialité : Ecologie et Agrosystèmes, 163 p.

- EL-ZEIN O. and KREYDIYYEH SI. (2013).** Leptin inhibits glucose intestinal absorption via PKC, p38MAPK, PI3K and MEK/ERK. *PLoS One*, 8(12), e83360.
- EROĞLU E., GÜNDÜZ U., YÜCEL M., TÜRKER L. and EROĞLU I. (2004).** Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 163-171.
- EROĞLU E., EROĞLU I., GÜNDÜZ U., TÜRKER L. and YÜCEL M. (2006).** Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1527-1535.
- EROĞLU E., EROĞLU I., GÜNDÜZ U. and YÜCEL 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 Bioenergy*, 33, 706-711.
- ESMAIL A., ABED H., FIRDAOUS M., CHAHBOUN N., MENNANE Z., BERNY E. and OUHSSINE M. (2014).** Étude physico-chimique et microbiologique des margines de trois régions du Maroc (Ouazzane, Fès Boulman et Béni Mellal) [Physico-chemical and microbiological study of oil mill wastewater (OMW) from three different regions of Morocco (Ouazzane, Fes Boulman and Béni Mellal)]. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5 (1), 121-126.
- ESMAIL A., CHAHBOUN N., MENNANE Z., AMIYARE R., ABED H., BARRAHI M., QEBIBO A., OUHSSINE M. and BERNY E H. (2015).** Étude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis-à-vis de souches pathogènes. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6 (3), 869-876.
- ESRA S., AKTAS SEDAT I and LALE E. (2001).** Characterization and lime treatment of olive-mill wastewater. Technical Note. *Water Research*, 35(9). 2336-2340.
- EZURUIKE UF. and PRIETO JM. (2014).** The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: pharmacological and toxicological considerations. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(2), 857-924.

-F-

- FABIANI R., DE BARTOLOMEO A., ROSIGNOLI P., SERVILI M., MONTEDORO G F. and MOROZZI G. (2002).** Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention*, 11, 351-358.
- FAO. (2004).** Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Food and Nutrition, Paper vol 81, Rom.
- FARAG RS., DAW ZY. and ABO-RAYA SH. (1989).** Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J Food Science*, 54, 74-76.
- FENTE CA., ORDAZ JJ., VAZQUEZ BI., FRANCO CM. and CEPEDA A. (2001).** New additive for cultural media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 4858-4862.

- FERNANDEZ-BOLAÑOS J., RODRIGUEZ G., RODRIGUEZ R., GUILLEN R. and JIMENEZ A. (2006).** Potential use of olive by-products Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas Y Aceites*, 57 (1), 95-106.
- FERREIRA FD., KEMMELMEIER C., ARROTEIA CC., COSTA CL., MALLMANN CA., JANEIRO V., DIAS FERREIRA FM., MOSSINI SAG., SILVA EL. and MACHINSKI M. (2013).** Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa L.* and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, 136, 789-793.
- FREYCHET P. (1988).** Mécanisme d'action de l'insuline. *Médecine/ Sciences*, 4, 70-71.
- YAN JIANG and JAMES C. FLEET. (2012).** Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate activated signaling pathways on 1α , 25 dihydroxyvitamin D3 regulated human 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase gene expression in differentiated Caco-2 cells. *J Cell Biochem*, 113(5), 1599–1607.
- FID (2017).** *Diabètes Atlas IDF. Fédération Internationale du Diabète. 8ème Edition.*
- FKI I., ALLOUCHE N. and SAYADI S. (2005).** The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93 (2), 197-204.
- FOLIN O. and CIOCALTEAU V. (1927).** On tyrosine and tryptophan determination in protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-650.
- FOURNEL A., MARLIN A., ABOT A., PASQUIO C., CIRILLO C., CANI P. D. and KNAUF C. (2016).** Glucosensing in the gastrointestinal tract: Impact on glucose metabolism. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(9), G645–G658.
- FRANK CLU. (1992).** Toxicologie, Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Masson. Paris. 361p.
- FRANZOLIN MR., GAMBALE W., CUERO RG. and CORREA B. (1999).** Interaction between toxigenic *Aspergillus flavus* Link and mites (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank) on maize grains: effects on fungal growth and aflatoxin production. *Journal of Stored Products Research*, 35, 215-224.
- FRESCO P., BORGES F., DINIZ C. and MARQUES M P M. (2006).** New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 22, 747–766.

-G-

- GALANAKIS CM., TORNBERG E. and GEKAS V. (2010 a).** Clarification of high-added value products from olive mill wastewater. *Journal Food Engineering*, 99, 190–197.
- GALANAKIS CM., TORNBERG E. and GEKAS V. (2010 b).** Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs. *LWT-Food Science and Technology*, 43(7), 1018-1025.
- GALANAKIS C. M. (2012).** Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87.

- GALIATSATOU P., METAXAS M., ARAPOGLOU D. and KASSELOURI-RIGOPOULOU V. (2002).** Treatment of olive mill waste water with activated carbons from agricultural by-products. *Waste Management*, 22, 803.
- GARCIA D., RAMOS A.J., SANCHIS V. and MARIN S. (2012).** Effect of *Equisetum arvense* and *stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. *International journal of food microbiology*, 153, 21-27.
- GAYATHRI M. and KANNABIRAN K. (2008).** Antidiabetic and ameliorative potential of ficus bengalensis bark extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23 (4), 394-400.
- GERASOPOULOS K., STAGOS D., KOKKAS S., PETROTOS K., KANTAS D., GOULAS P. and KOURETAS D. (2015).** Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 42-49.
- GEISER DM., DORNER JW., HORN BW. and TAYLOR JW. (2000).** The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 169-179.
- GEORGIADOU M., DIMOU A. and YANNIOTIS S. (2012).** Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, 26, 580-586.
- GESSNER DK, RINGSEIS R. and EDER K. (2017).** Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(4), 605-628.
- GIN H and RIGALLEAU V. (1999).** Diabétiques et diabète. *EMC- Endocrinology nutrition*. 10-366-R-10: 6p.
- GIOVANNINI P, HOWES MJR. and EDWARDS SE. (2016).** Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America. *Journal of Ethnopharmacology*, 184, 58-71.
- GOLINSKI P., KOSTECKI M., LASOCKA I., WISNIEWSKA H., CHELKOWSKI J. and KACZMAREK Z. (1996).** Moniliformin accumulation and other effects of *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. on kernels of winter wheat cultivars. *Journal of Phytopathology*, 144, 495-499.
- GONTHIER MP., VERNY MA., BESSON C., RÉMÉSY C. and SCALBERT A. (2003).** Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the Gut microflora in rats. *Journal of Nutrition*, 133, 1853-1859.
- GONZÁLEZ-MUÑOZ M J., LUQUE S, ÁLVAREZ JR. and COCA J. (2003).** Recovery of phenol from aqueous solutions using hollow fibre contactors. *Journal of Membrane Science*, 213, 181-193.
- GORBOULEV V., SCHÜRMAN A., VALLON V., KIPP H., JASCHKE A., KLESSEN D., FRIEDRICH A., SCHERNECK S., RIEG T., CUNARD R., VEYHL-WICHMANN M., SRINIVASAN A., BALEN D., BRELJAK D., REXHEPAJ R., PARKER HE., GRIBBLE FM., REIMANN F., LANG F., WIESE S., SABOLIC I., SENDTNER M., KOEPEL H. (2012).** Na⁺-D-glucose Cotransporter SGLT-1 is Pivotal for Intestinal Glucose Absorption and Glucose-Dependent Incretin Secretion. *Diabetes*, 61(1), 187-196.

- GORLACH J., RAESECKE H. R., RENTSCH D., REGENASS M., ROY P., ZALA M., KEEL C., BOLLER T., AMRHEIN N. and SCHMID J. (1995).** Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proceeding of National Academy of Sciences*. U.S.A, 92, 3166–3170.
- GUAN X., STOLL B., LU X., TAPPENDEN KA., HOLST JJ., HARTMANN B. and BURRIN DG. (2003).** GLP-2-mediated up-regulation of intestinal blood flow and glucose uptake is nitric oxide-dependent in TPN-fed piglets. *Gastroenterology*, 125, 136–147.
- GUENDOUZE-BOUCHEFAA N., MADANI K., CHIBANE M., BOULEKBACHE-MAKHLOUF L., HAUCHARD D., KIENDREBEOGO M., STÉVIGNYE C., NDJOLO OKUSAF P. and DUEZ P. (2015).** Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 70, 459–466.
- GUILMEAU S., BUYSE M., TSOCAS A., LAIGNEAU JP. and BADO A. (2003).** Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. *Diabetes*, 52, 1664–1672.
- GUNAY A and CETIN M. (2013).** Determination of aerobic biodegradation kinetics of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85, 237-242.

-H-

- HABAUZIT V. and MORAND C. (2012).** Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 3(2), 87-106.
- HAHLBROCK K. and SCHEEL D. (1989).** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 347-369.
- HAJIAGHAALIPOUR F., KHALILPOURFARSHBAFI M. and ARYA A. (2015).** Modulation of Glucose Transporter Protein by Dietary Flavonoids in Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Biological Sciences*, 11(5), 508-524.
- HAMDEN K, ALLOUCHE N, DAMAK M, ELFEKI A. (2009).** Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste *in vitro* and in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 180, 421-432.
- HAMDI M. (1992).** Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 37, 155-163.
- HAMDI M. (1993).** Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment, A review. *Bioprocess and Bioprocess Engineering*, 8, 209-214.
- HANHINEVA K., TÖRRÖNEN R., BONDIA-PONS I., PEKKINEN J., KOLEHMAINEN M., MYKKÄNEN H. and POUTANEN K. (2010).** Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Science*, 11(4), 1365-1402.
- HALE AL. (2003).** Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds differentiating russet nrkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis. *Office of Graduate Studies of Texas A & M University. Genetics*. 260p.

- HALES N. (2016).** Grain and Feed Annual in Algeria. Global Agricultural Information Network. Report number: AG1601.12p.
- HALLIWELL B. (1994).** Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutritional Review*, 52, 253-265.
- HAMDEN K., ALLOUCHE N., DAMAK M. and ELFEKI A. (2009).** Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 180 (3), 421–432.
- HAMDI M. (1991).** Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, 36, 173–178.
- HAMDI M. (1996).** Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. A review. *Process Biochemistry*, 31(2), 105-110.
- HAMDI M and ELLOUZ R. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. *Environmental Technology*, 14, 183–188.
- HANAFI F., ASSOBEI O. and MOUNTADAR M. (2010).** Detoxification and discoloration of moroccan olive mill wastewater by electrocoagulation. *Journal of Hazardous Materials*, 174 (1-3), 807- 812.
- HARBORNE J B. (1989).** General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). *Methods in plantbiochemistry: Plant phenolics*. New York: Academic Press. (1), 1–28.
- HARRIS B. and STAPLES C.R. (1992).** The Problems of Mycotoxins in Dairy Cattle Rations. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. IFAS. Extension. DS31.5p.
- HARVEY AL, EDRADA-EBEL R.and QUINN RJ (2015).** The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14,111–129.
- HASKARD C., BINNION C.and AHOKAS J. (2000).** Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemistry and Biology Interaction*, 128, 39-49.
- HÄTTENSCHWILER S.and VITOUSEK PM. (2000).** The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Tree*, 15, 238–243.
- HAYASE F. and KATO M. (1984).** Antioxidant compounds of sweet potatoes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 30, 37-46.
- HELLIWELL PA., RUMSBY MG.and KELLETT GL. (2003).** Intestinal sugar absorption is regulated by phosphorylation and turnover of protein kinase C β II mediated by phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 28644–28650.
- HENNEBELLE T., SAHPAZ S.and BAILLEUL F.(2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1, 3-6.
- HERRMANN KM and WEAVER LM. (1999).** THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50,473-503.
- HERMANS MP. (1998).** Diabète de type 2 et adaptation thérapeutique. *Louvain Med*, 118, S2-S8.

- HERRERO M., TEMIRZODA TN., SEGURA-CARRETERO A., QUIRANTES R, PLAZA M.and IBÁÑEZ E.(2011).** New possibilities for the valorization of olive oil by-products.*Journal of Chromatography A*,1218(42), 7511-7520.
- HESSELTINE C W. (1976).** Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds; in: <Mycotoxins and other fungal related food problems> edited by Rodricks, J.V., Advances in Chemistry Series No. 149., American Chemical Society, Washington DC, USA.
- HIOFALO B., LIOTTA L., ZUMBO A. and CHIOFALO V. (2004).** Administration of olive cake for ewe feeding: Effect on milk yield and composition. *Small Ruminant Research*, 55,169–176.
- HIRSH AJ.and CHEESEMAN CI. (1998).**Cholecystokinin decreases intestinal hexose absorption by a parallel reduction in SGLT1 abundance in the brushborder membrane. *Journal of Biological Chemistry*,273, 14545–14549.
- HITOKOTO H., MOROZUMI S., WAUKE T., SAKAI S.and KURATA H. (1980).** Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 818-822.
- HOLLMAN PC., CASSIDY A., COMTE B., HEINONEN M., RICHELLE M., RICHLING E., SERAFINI M., SCALBERT A., SIES H.and VIDRY S. (2011).** The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *Journal of Nutrition*, 141, 989S-1009S.
- HOLMES RA., BOSTON RS.and PAYNE G.A. (2008).** Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbial Biotechnol*, 78, 559-572.
- HORN BW., DORNER JW., GREENE RL., BLANKENSHIP PD.and COLE RJ.(1994).** Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds. *Mycopathol*, 125, 179–191.
- HSIEH DPH.and MATELES RI. (1970).**The relative contribution of acetate and glucose to aflatoxin biosynthesis. *Biochimica Biophysica Acta*,208, 482-486.
- HUA S S T. (2002).** Biocontrol of *Aspergillus flavus* by Saprophytic Yeast, Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial; in: «Proceedings of the 3rd FungalGenomics, 4th Fumonis and 16th Aflatoxin Elimination Workshops», Savannah, GeorgiaUSA.
- HUYBRECHTS B., TANGNI E.K., DEBONGNIE P., GEYS J. and CALLEBAUT A. (2013).** Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles: une revue. *Cahiers Agricultures*, 22, 202-215.
- HUONG B T M., TUYEN L D., TUAN DH., BRIMER L.and DALSGAARD A. (2016).**Dietary exposure to aflatoxin B1, ochratoxin A and fumonisins of adults in Lao Cai province, Viet Nam: A total dietary study approach. *Food Chemical Toxicology*, 98, 127-133.

-I-

IARC (International Agency for Research on Cancer).(1993).Aflatoxins *In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans. Some naturally-occurring substances: Food Items and Constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*, 56, 359-362. Lyon, France.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2012). Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 100F: 225-244. Lyon, France.

ICHIISHI E., LI XK. and IORIO EL. (2016). Oxidative Stress and Diseases: Clinical Trials and Approaches. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 1-3.

ISHII H., JIROUSEK MR., KOYA D., TAKAGI C., XIA P., CLERMONT A ET AL. (1996). Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science*, 272, 728–731.

-J-

JANSSON SP., ANDERSSON DK. and SVÄRDSUDD K. (2016). Mortality and cardiovascular disease outcomes among 740 patients with new-onset Type 2 diabetes detected by screening or clinically diagnosed in general practice. *Diabetic Medicine*, 33(3), 324-31. doi: 10.1111/dme.13019.

JAOUANI A., SAYADI S., VANTHOURNHOUT M., and PENNINGCKX M. (2003). Potent fungi for decolourization of olive oil mill wastewater. *Enzyme Microbial Technology*, 33, 802–809.

JAYASHREE T. and SUBRAMANYAM C. (2000). Oxidative stress a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 981-5.

JEGUIM M., CHOUCHE A., REGUILLON AF., TROUVE G and LE BUZIT G. (2012). A new valorisation strategy of olive mill wastewater: Impregnation on sawdust and combustion. *Resources Conservation and Recycling*, 59, 4–8.

JEMAIH., EL FEKI A. and SAYADIS. (2009). Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8798–8804.

JOHNSTON K., SHARP P., CLIFFORD M. and MORGAN L. (2005). Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal caco-2 cells. *FEBS Letters*, 579 (7), 1653-1657.

JORGE AP., HORST H., DE SOUSA E., PIZZOLATTI MG. and SILVA FR. (2004). Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interaction*, 149, 89-96.

JUNG UJ., LEE MK., JEONG KS. and CHOI MS. (2004). The hypoglycaemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *Journal of Nutrition*, 134, 2499–2503.

JUSTINO CIL., PEREIRA R., FREITAS AC., ROCHA-SANTOS TAP., PANTELEITCHOUK TSL. and DUARTE AC. (2012). Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology* 21(2), 615–629.

-K-

KABAK B., DOBSON ADW. and VAR I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 593-619.

- KALOGERAKIS N., POLITI M., FOTEINIS S., CHATZISYMEON E. and MANTZAVINOS D. (2013).** Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *Journal Environmental Management*, 128, 749-58.
- KAMENI A., IMELE H. and MBANYA NJ.(2002).** An alternative heat treatment for milk pasteurization in Cameroon. *International Journal of Dairy Technology*, 55 (1), 40–43.
- KAPELLAKISIE., TSAGARAKISKP.,AVRAMAKIC. and ANGELAKISAN.(2006).** Olive mill wastewater management in river basins: A case study in Greece. *Agricultural Water Management*, 82 (3), 354-370.
- KAPELLAKIS IE., TSAGARAKIS KP.andCROWTHER J C.(2008).** Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(1), 1–26.
- KAVVADIASV., DOULAMK., KOMNITSASK.and LIAKOPOULOUN.(2010).** Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *Journal of Hazardous Materials*, 182 (1–3), 144-155.
- KEBIECHE M. (2009).** Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de Doctorat Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences. Option biochimie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri. Constantine.
- KELLETT G L. and BROT-LAROCHE E. (2005).** Apical GLUT2 a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes*, 54, 3056-3062.
- KELLY PJ., CLARKE PM., HAYES AJ., GERDTHAM UG., CEDERHOLM J., NILSSON P., ELIASSON B.and GUDBJORNSDOTTIR S. (2014).** Predicting mortality in people with type 2 diabetes mellitus after major complications: a study using Swedish National Diabetes Register data. *Diabetic Medicine*, 31(8),954-62. doi: 10.1111/dme.12468.
- KESARI A N., RAJESH KUMAR GUPTA.and WATAL G. (2005).** Hypoglycemic effects of *Murraya koenigii* on normal and alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*. 97 (2), 247-251.
- KHAN MA., AFRIDI RA., HASHIM S., KHATTAK AM., AHMAD Z., WAHID F.and CHAUHAN BS. (2016).** Integrated effect of allelochemicals and herbicides on weed suppression and soil microbial activity in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Crop Protection*, 90, 34-39.
- KHOUFI S., FEKI F. and SAYADI S.(2007).** Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes, *Journal of Hazardous Materials*, 142, 58–67.
- KHOUFI S., LOUHICHI A.and SAYADI S.(2015).** Optimization of anaerobic co-digestion of olive mill wastewater and liquid poultry manure in batch condition and semi-continuous jet-loop reactor. *Bioresource Technology*, 182, 67-74.
- KIM Y., KEOGH JB.and CLIFTON PM. (2016).** Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*, 8, 17.
- KNIGHT JA., SHAUNA A. and JAMES MR. (1972).** Chemical Basis of the Sulfo-phospho-vanillin Reaction for estimating total serum lipids. *Clinical Chemistry*, 18, 199-202.

- KOBAYASHI Y., SUZUKI M., SATSU H., ARAI S., HARA Y., SUZUKI K., MIYAMOTO Y. and SHIMIZU M. (2000).** Green tea polyphenols inhibit the sodium dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5618–5623.
- KOSEGARTEN CE., MANI-LOPEZ E., PALOU E., LOPEZ-MALO A. and RAMIREZ-CORONA N. (2016).** Estimation of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different formulation factors by means of kinetic, probabilistic, and survival models. 9th International Conference on Predictive Modelling in Food. *Procedia Food Science*, 7, 85 – 88.
- KOTSOU M., MARI I., LASARIDI K., CHATZIPAVLIDIS I., BALIS C. and KYRIACOU A. (2004).** The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology*, 26, 113-121.
- KOZAK JA., MISLER S. and LOGOTHETIS DE. (1998).** Characterization of a Ca^{2+} -activated K^{+} current in insulin-secreting murine β TC-3 cells. *Journal of Physiology*, 509(2), 355–370.
- KRAVCHENKO LV., MOROZOV SV. and TUTEL'YAN V A. (2003).** Effects of Flavonoids on the Resistance of Microsomes to Lipid Peroxidation *In Vitro* and *Ex Vivo*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 136 (6), 572-5.
- KRINSKY NI. (1992).** Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 200 (2), 248-254.
- KUMAR A. and ELLIS B E. (2001).** The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiology*, 127, 230-9.
- KUMAR V., BASU M S. and RAJENDRAN TP. (2008).** Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27, 891-905.
- KUMAR D. and KALITA P. (2017).** Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. *Foods*, 6(1), 8.
- KUROKAWA T. and ISHIBASHI S. (1991).** Insulin regulates Na^{+} /glucose cotransporter activity in rat small intestine. *Biochimica Biophysica Acta Biomembranes*, 1063, 90–94.
- KURTZMAN CP., HORN BW. and HESSELTINE CW. (1987).** *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53, 147–158.

-L-

- LACEY J. (1986).** Factors affecting mycotoxin production; in: «Mycotoxins and phycotoxins» edited by Steyn P. S. and Vleggaar R., 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.
- LAFKA T I., LAZOU A E., SINANOGLU V J. and LAZOS E S. (2011).** Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, 125, 92–98.
- LAGROUH F., DAKKA N. and BAKRI Y. (2017).** The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal de Mycologie Médicale*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.04.008>.

- LAKHTAR H., ISMAILI-ALAOUI M., ANTONIOS PHILIPPOUSSIS A., PERRAUD-GAIME I. and ROUSSOS S. (2010).** Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64 (3), 167-172.
- LANDETE JM. (2013).** Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 53(7), 706-721.
- LANGSETH W., HOIE R. and GULLORD M. (1995).** The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985-1990. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B: Soil and Plant Science*, 45, 63-67.
- LAPOINTE G (2004).** Notions de Toxicologie. 2ème édition. Commission de la santé et de la sécurité du travail (Québec, Canada), 16-20.
- LARIF M., ZARROUK A., SOULAYMANI A. and ELMIDAOU A. (2013).** New innovation in order to recover the polyphenols of olive mill wastewater extracts for use as a biopesticide against the *Euphyllura olivina* and *Aphis citricola*. *Research on Chemical Intermediates*, 39, 4303-4313.
- LEE-HUANG S., ZHANG L., HUANG PL., CHANG Y T. and HUANG PL. (2003)** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 307, 1029 -1037.
- LEE OH., LEE BY., LEE J., LEE HB., SON JY., PARK CS., SHETTY K and KIM YC. (2009).** Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, 100 (23), 6107-6113.
- LEBLANC M-C. and SAINT-HILAIRE M. (2002).** Doit-on s'inquiéter du pouvoir cancérigène des mycotoxines chez l'humain ? Projet d'intégration en microbiologie BIO600. Université de Sherbrooke : Sherbrooke, 67 p.
- LEFRANCOIS J. (2007).** Dynamiques et origines des matières en suspension sur de petits bassins versants agricoles sur schiste. Thèse de doctorat en Sciences de la terre. Faculté des Sciences de la Matière. Université de Rennes 1, France.
- LE GALL M., TOBIN V., STOLARCZYK E., DALET V., LETURQUE A. and BROTLAROCHE E. (2007).** Sugar sensing by enterocytes combines polarity, membrane bound detectors and sugar metabolism. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 834-843.
- LEGER CL., CARBONNEAU MA., MICHEL F., MAS E., MONNIER L., CRISTOL JP. and DESCOMPS B. (2005).** A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. *European Journal Clinical Nutrition*, 59(5), 727-30.
- LENEY SE. and TAVARÉ JM. (2009).** The molecular basis of insulin stimulated glucose uptake: signaling, trafficking and potential drug targets. *Journal of Endocrinology*, 203, 1-18.
- LEO (Leveraging Economic Opportunities). (2016).** Évaluation des contraintes sanitaires et phytosanitaires (sps) de la politique commerciale dans les chaînes de valeur du maïs et de l'élevage en Afrique de l'ouest Nigéria, Ghana, Côte D'ivoire, Burkina Faso & Mali. Rapport n° 37. 161p. Septembre 2016.

- LEON BM. and MADDOX TM. (2015).** Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World Journal of Diabetes*, 6(13), 1246-1258.
- LEOUIFOUDI I, HARNAFI H. and ZYAD A. (2015).** Olive Mill Waste Extracts: Polyphenols Content, Antioxidant, and Antimicrobial Activities. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2015, 714138. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/714138>
- LEY SH, HAMDY O, MOHAN V. and HU FB. (2014).** Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. *Lancet*, 383(9933):1999-2007. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60613-9.
- LI D., WANG P., LUO Y., ZHAO M and CHEN F.(2015).** Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1729-1741.
- LI J., SUO D. and SU X. (2010).** Binding Capacity for Aflatoxin B1 by Different Adsorbents. *Agricultural Sciences in China*, 9(3), 449-456.
- LI X., WANG X., CHEN D., and CHEN S. (2011).** Antioxidant activity and mechanism of protocatechuic acid *in vitro*. *Functional Foods in Health and Disease*, 7, 232–244.
- LI Y., KONG W., LI M., LIU H. ZHAO X. and YANG S. (2016).** *Litsea cubeba* essential oil as the potential natural fumigant: inhibition of *Aspergillus flavus* and AFB1 production in licorice. *Industrial crops and products*, 80, 186-193.
- LIANG Z., LI J., HE Y., GUAN S., WANG N., JI C. and NIU T. (2008).** AFB1 biodegradation by a new strain—*Stenotrophomonas*. sp. *Agricultural Science in China*, 7, 1433–1437.
- LIANG D., XING F., NIMALJS., LIU X., WANG L., HUA H, ZHOU L , ZHAO Y, WANG Y, L YANG . (2015).** Inhibitory Effect of Cinnamaldehyde, Citral, and Eugenol on Aflatoxin Biosynthetic Gene Expression and Aflatoxin B₁ Biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Science*, 80(12), M2917-24. doi: 10.1111/1750-3841.13144.
- LILLO C., LEA US. and RUOFF P. (2008).** Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell and Environment*, 31, 587–601.
- LIM EK., DOUCET CJ., LI Y., ELIAS L., WORRALL D., SPENCER SP., ROSS J. and BOWLES DJ. (2002).** the activity of arabidopsis glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 586-92.
- LIPPS PE. and DEEP IW. (1991).** Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. *Plant Disease*, 75, 828-833.
- LITCHFIELD JT Jr. and WILCOXON F. (1949).** A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96(2), 99-113.
- LITTLE T J., HOROWITZ M. and FEINLE-BISSET C. (2005).** Role of cholecystokinin in appetite control and body weight regulation. *Obesity Reviews*, 6, 297–306.
- LIU Y., MCKEEVER LC. and MALIK NSA. (2017).** Assessment of the Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract Against Foodborne Bacterial Pathogens. *Front Microbiol*, 8, 113.

LIU BH., HSU YT., LU CC. and YU FY. (2013). Detecting aflatoxin B1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*, 30, 184–189.

LOPES M., ARAUJO C., AGUEDO M., GOMES N., ALVES G C., TEIXEIRA J A and BELO I. (2009). The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 533–537.

LOPEZ PM., MORA PG., WYSOCKA W., MAIZTEGUI B., ALZUGARAY ME., ZOTO HD. and BORELLI M.I. (2004). Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *European Journal of Pharmacology*, 504, 139-142.

LOPEZ-POSADAS R., BALLESTER I., ABADIA A., SUAREZ MD., ZARZUELO A., MARTINEZ-AUGUSTIN O. and SANCHEZ DE MEDINA F. (2008). Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. *Biochemical Pharmacology*, 76, 495–506.

LOUADJ L. and GIUFFRÈ A M. (2010). Analytical characteristics of olive oil produced with three different processes in Algeria. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 87, (3), 186-195.

LYKAS C., VAGELAS I. and GOUGOULIAS N. (2014). Effect of olive mill wastewater on growth and bulb production of tulip plants infected by bulb diseases. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12, 233.

-M-

MA J., MO H., CHEN Y., DING D and HU L. (2014). Inhibition of Aflatoxin Synthesis in *Aspergillus flavus* by three structurally modified lentinans. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 3860-3870.

MACHEIX. J-J., FLEURIET A., CHRISTIAN JAY –ALLMEND. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Collection Biologie. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne. 216p.

MAGAN N. and ALDRED D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 131–139.

MAGOHA H., KIMANYA M., DE MEULENAER B., ROBERFROID D., LACHAT C. and KOLSTEREN P. (2014) Association between aflatoxin M1 exposure through breast milk and growth impairment in infants from Northern Tanzania. *World Mycotoxin J*, 7(3), 277–84.

MAIOLI E. and VALACCHI G. (2010). Rottlerin: bases for a possible usage in psoriasis. *Current Drug Metabolism*, 1, 11(5), 425-430.

MAKUN HA., GBODI TA., TIJANI AS., ABAI A. and KADIR GU. (2007). Toxicological screening of fungi isolated from millet (*Pennisetum* spp.) during the rainy and dry Harmattan seasons in Niger State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 6, 34-40.

MALONE MH. and ROBICHAUD RC. (1962). A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*, 25, 320-332.

- MANNA C., MIGLIARDI V., GOLINO P., SCOGNAMIGLIO A., GALLETTI P., CHIARIELLO M. et al. (2004).** Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(8), 461–466.
- MANNA C., GALLETTI P., MAISTO G., CUCCIOLLA V., D'ANGELO S. and ZAPPIA V. (2000).** Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *Febs Letters*, 470(3), 341–4.
- MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., RÉMÉSY C. and JIMÉNEZ L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5), 727–47.
- MANSOUR-BENAMAR M., SAVOIE J.M., CHAVANT L.(2013).** Valorization of solid olive mill wastes by cultivation of a local strain of edible mushrooms. *Comptes Rendus Biologies*, 336(8), 407-415. DOI: 10.1016/j.crv.2013.07.004.
- MAOX., GUC., CHEND., YUB and HEJ. (2017).** Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. *Oncotarget*, 8(46), 81649–81661.
- MARBRY T.J. and ULUBLEN A. (1980).** Chemistry and utilization of phenylpropanoïdes including Flavonoïdes, Coumarins and lignans. *Journal of Agriculture. Food Chemistry*, 28, 188-196.
- MARGOLSKEE RF., DYER J., KOKRASHVILI Z., SALMON KS., ILEGEMS E., DALY K., MAILLET EL., NINOMIYA Y., MOSINGER B. and SHIRAZI-BEECHEY SP.(2007).** T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proceeding of the National Academy Science USA*, 104, 15075-15080.
- MARIN S., SANCHIS V., ARNAU F., RAMOS A J. and MAGAN N. (1998).** Environmental factors *in vitro* interactions and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102, 831-837.
- MARIN S., RAMOS A.J., CANO-SANCHO G. and SANCHIS V. (2013).** Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- MARTEL F., MONTEIRO R. and CALHAU C. (2010).** Effect of polyphenols on the intestinal and placental transport of some bioactive compounds. *Nutrition Research Reviews*, 23, 47–64.
- MARTINEZ-MIRANDA M., TABORDA-OCAMPO G. and ROSERO-MOREANO M.(2015).** Validation of a high performance liquid chromatography method for aflatoxins determination in corn arepas. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 26 (4), 797-803.
- MASQUELIER J., DUMON M. C. and DUMAS J. (1979).** Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique*, 1, 101-104.
- MATEO EM., GOMEZ JV., GIMENO-ADELANTADO JV., ROMERA D, MATEO-CASTRO R. and JIMENEZ M.(2017).** Assessment of azole fungicides as a tool to control growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ and B₂ production in maize. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. 34(6), 1039-1051. doi: 10.1080/19440049.2017.1310400.
- MATOS M J., SANTANA L., URIARTE E., ABREU OA., MOLINA E and YORDI E G.(2015).** Coumarins — An Important Class of Phytochemicals. World's largest Science, Technology & Medicine, Chapter 5, 113-140. <http://dx.doi.org/10.5772/59982>.

- MATSUDA H., NISHIDA N. and YOSHIKAWA M. (2002).** Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of myrciacitrins III, IV, and V. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(3), 429-431.
- MEDDAH B, DUCROC R, EL ABBES FM, ETO B, MAHRAOUI L, BENHADDOU AA, MARTINEAU LC, CHERRAH Y.and HADDAD PS. (2009).** *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 419-424.
- MEKKI A, DHOUIB A.and SAYADI S. (2007).** Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. *Journal of Environmental Management*, 84, 134-140.
- MEKKI A., DHOUIB A., FEKI F.and SAYADI S. (2008).** Assessment of toxicity of the untreated and treated olive mill wastewaters and soil irrigated by using microbiotests. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 69, 488–495.
- MEKKI A., DHOUIB A.and SAYADI S. (2009).** Evolution of several soil properties following amendment with olive mill wastewater. *Progress in Natural Science*, 19, 1515-1521.
- MEKKI A., DHOUIB A.and SAYADI S. (2013).** Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth. *International Journal Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 2(1),1–7.
- MICHAILIDES M., PANAGOPOULOS P., AKRATOS CS., TEKERLEKOPOULOU AG.and VAYENAS DV. (2011).** A full-scale system for aerobic biological treatment of olive mill wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86, 888–892.
- MILLER G L. (1959).** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- MIRANDA T., ESTEBAN A., ROJAS S., MONTERO I.and RUIZ A. (2008).** Combustion Analysis of Different Olive Residues. *International Journal of Molecular Science*, 9(4), 512-525.
- MITCHELL D., PARRA R., ALDRED D. and MAGAN N. (2004).** Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 439–445.
- MIURA T., TAKAGI S .and ISHIDA T. (2012).** Management of Diabetes and Its Complications with Banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) and Corosolic Acid. *Evidence Based Complement and Alternative Medicine*, 871495.
- MOCHLY-ROSEN D., DAS K.and GRIMES KV. (2012).** Protein kinase C, an elusive therapeutic target?. *Nature Review Drug Discovery*, 11(12), 937-57.
- MOHAMMED A, KUMAR D.and RIZVI SI. (2015).** Antidiabetic potential of some less commonly used plants in traditional medicinal systems of India and Nigeria. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(1), 78-85.
- MOHAMMED A, IBRAHIM MA.and ISLAM MS. (2014).** African medicinal plants with antidiabetic potentials: A review. *Planta Medica*, 80, 354-377.
- MOHAMMEDI Z., BACHIK S. and BELKAROUBE N. (2010).** Potentiel antifongique et anti aflatoxinogène des huiles essentielles d'une plante endémique *Thymus fontanesii* Boissand Reut. *Les technologies de laboratoire*, 5 (19), 10-15.

- MOLINA-ALCAIDE E. and NEFZAOUI A. (1996).** Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38, 227–235.
- MORENO E C., GARCIA G T., ONO M A., VIZONI É., KAWAMURA O., HIROOKA E Y. and ONO EYS. (2009).** Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chemistry*, 116(1), 220-229.
- MORGAN EL, MACE OJ, AFFLECK J. and KELLETT GL. (2007).** Apical GLUT2 and Cav1.3: regulation of rat intestinal glucose and calcium absorption. *Journal of Physiology*, 580(2), 593-604.
- MOSS MO. and FRANK JM. (1985).** Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Transactions of the British Mycological Society*, 84, 585-590.
- MOUNCIF M., TAMOH S., FAID M. and ACHKA-BEGDOURI A. (1993).** A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste waters in Morocco. *Grasas Aceites*, 44, 335-338.
- MU LH, HUANG ZX, LIU P, HU Y. and GAO Y. (2011).** Acute and subchronic oral toxicity assessment of the herbal formula Kai-Xin-San. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 351-357.
- MURPHY PA., HENDRICH S., LANDGREN C. and BRYANT CM. (2006).** Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, 71, 51-65.

-N-

- NADOUR M. (2015).** Extraction, caractérisation des polysaccharides et des polyphénols issus des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides à visée alimentaire. Thèse de doctorat en Sciences biologiques. Option : Biochimie appliquée et biotechnologies. Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi – Ouzou.
- NAKAZAWA F. (1922).** Influence of phloridzin on intestinal absorption. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 3, 288-294.
- NARENDER T., KHALIQ T., SINGH AB., JOSHI MD., MISHRA P., CHATURVEDI JP., SRIVASTAVA AK., MAURYA R. and AGARWAL SC. (2009).** Synthesis of alpha-amyrin derivatives and their *in vivo* antihyperglycemic activity. *Eurorean Journal of Medicinal Chemistry*, 44(3), 1215-1222.
- NAZZARO F., FRATIANNI F., DE MARTINO L., Coppola R. and DE FEO V. (2013).** Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6(12), 1451-1474.
- NEFZAOUI A. (1991).** Valorisation des sous-produits de l'olivier. *Options Méditerranéennes - serie Séminaires*, 16, 101-108.
- NESCI A. and ETCHEVERRY M. (2009).** Effect of natural maize phytochemicals on *Aspergillus* section *Flavi* sclerotia characteristics under different conditions of growth media and water potential. *Fungal Ecology*, 2, 44-51.

- NIAOUNAKIS M. and HALVADAKIS CP. (2006).** Olive processing waste management: literature review and patent survey. Waste Management Series. London: Elsevier second ed. Elsevier, Amsterdam. (pp. 23-24, 237-240).
- NIJVELDT RJ., VAN NOOD E., VAN HOORN DE., BOELENS PG., VAN NORREN K. and VAN LEEUWEN PA. (2001).** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418-425.
- NISTOR BLA., MARTINEAU LC., BENHADDOU-ANDALOUSSI A., ARNASON JT., LEVY É. and HADDAD PS. (2010).** Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(2), 473-82.
- NISHIMURA H. (2001).** "Angiotensin receptors—evolutionary overview and perspectives." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 128(1), 11-30.
- NITSCHJ. P. and NITSCHC. (1961).** Synergistes naturels des auxines et des gibbérelines. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 108 (9), 349-362.
- NKAMBO W., ANYAMA NG., and B ONEGI. (2013).** *In vivo* hypoglycemic effect of methanolic fruit extract of *Momordica charantia* L. *African Health Science*, 13(4), 933–939.
- N'TCHA C., SINA H., KAYODÉ APP., GBENOU JD. and BABA-MOUSSA L. (2017).** Antimicrobial Activity and Chemical Composition of (Kpètè-Kpètè): A Starter of Benin Traditional Beer Tchoukoutou. *BioMed Research International*, 1-10.
- NOUBIGH A., ABDERRABBA M. and PROVOST E. (2007).** Temperature and addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *Jouranl of Chemical Thermodynamics*, 39, 297-303.
- NYCHAS GJE. (1995).** Natural antimicrobial from plants. In *New Methods of Food Preservations* ed. Gould GW. pp. 58-89. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional.

-O-

- OBIED HK., ALLEN MS., BEDGOOD DR., PRENZLER PD., ROBARDS K. and STOCKMANN R. (2005).** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 53, 823–837.
- OBID H K., BEDGOOD JR D R., PRENZLER P D. and ROBARDS K. (2007).** Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1238-1248.
- OGAWA E., HOSOKAWA M., HARADA N., YAMANE S., HAMASAKI A., TOYODA K., FUJIMOTO S., FUJITA Y., FUKUDA K., TSUKIYAMA K., YAMADA Y., SEINO Y. and INAGAKI N. (2011).** The effect of gastric inhibitory polypeptide on intestinal glucose absorption and intestinal motility in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 404(1), 115-120.
- OKAMURA H., MIMURA A., YAKOU Y., NIWANO M. and TAKAHARA Y. (1993).** Antioxydant Activity of Tannins and Flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, 33, 557-561.
- OKUDA T., KIMURA Y., YOSHIDA T., HATANO T., OKUDA H. and ARICHI S. (1983).** Studies on activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effect of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 31 (5), 1625-1631.

- OLDENBURG E, HÖPPNER F, ELLNER F, WEINERT J. (2017).** Fusarium diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. *Mycotoxin Research*, 33(3), 167-182.
- OMS. (2008).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. 5ème édition, de la population et de la réforme hospitalière. Organisation mondiale de la Santé. Ministère de la santé, 106p.
- OMS.(2016).** Global report on diabetes. Organisation mondiale de la santé. 84 pages(<http://www.who.int>).
- OTA A.and ULRIH NP. (2017).**An Overview of Herbal Products and Secondary Metabolites Used for Management of Type Two Diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, 8,436. doi: 10.3389/fphar.2017.00436
- OU S.and KWOK KC. (2004).** Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in food. *Jouranal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1261–1269.
- OYAIZU M. (1988).** Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Journal Japanese Society for Food Science and Technology*, 35, 771-775.
- OYEBOLA D, TAIWO E, IDOLOR G, ALADA A, OWOEYE O.and ISEHUNWA G. (2011).** Effect of adrenaline on glucose uptake in the rabbit small intestine. *African Journal of Medicine and Medical Science*,40, 225–233.

-P-

- PALANIYANDI SS., SUN L., FERREIRA JCB and MOCHLY-ROSEN D.(2009).** Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target?. *Cardiovascular Research*, 82, 229–239.
- PARK JH., BAE JH., IM S-S.and SONG D-K. (2014).** Green tea and type 2 diabetes. *Integrative Medicine Research*, 3, 4–10.
- PATEL MB.and MISHRA S. (2011).** Hypoglycemic activity of alkaloidal fraction of *Tinospora cordifolia*. *Phytomedicine*,15-18(12),1045-52. doi: 10.1016/j.phymed.2011.05.006.
- PATEL DK., KUMAR R., LALOO D.and HEMALATHA S.(2012).** Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(5), 411-420.
- PANAGOUE EZ., SKANDAMIS PN.and NYCHAS JE. (2003).** Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 146–156.
- PANDEY AK., SONKER N.and SINGH P. (2016).** Efficacy of some essential oils against *Aspergillus flavus* with special reference to *Lippia alba* oil an inhibitor of fungal proliferation and aflatoxin B₁ production in green Gram seeds during storage. *Journal of Food Science*, 81(4), 928-934. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13254>.
- PAPP E., H-OTTA K., ZARAY G.and EMIL MINCSOVICS E. (2002).** Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal*, 73, 39–46.
- PASSONE MA., GIRARDI NS.and ETCHEVERRY M. (2012).** Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus section Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *International Journal of Food Microbiology*,159, 198-206.

- PASSONE MA., GIRARDI NS.and ETCHEVERRY M.(2013).** Antifungal and antiaflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. *LWT- Food Science and Technology*, 53, 434-444.
- PAQUETTE M. (2015).** Effets bénéfiques d'un supplément riche en polyphénols de fraises et de canneberges sur la sensibilité à l'insuline et le profil de risque cardiometabolique chez des hommes et des femmes résistants à l'insuline. Maîtrise en nutrition. Maître ès sciences (M.Sc.). Université de LAVAL. Québec, Canada.
- PARK DL.and LIANG B.(1993).** Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 334.
- PETRAKIS C. (2006).** Olive Oil. *Chemistry and Technology*. (Second Edition), Pages 191–223.
- PETRONI A., BLASEVICH M., SALAMI M., PAPINI N., MONTEDORO GF.and GALLI C. (1995).** Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*. 78, 151–160.
- PFAENDTNER J and BROADBELT LJ. (2008).** Mechanistic modeling of lubricant degradation. 1. Structure– reactivity relationships for free-radical oxidation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47 (9), 2886-2896.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1999).** Les agents des mycotoxycoses. In « Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Section de l'alimentation et de la nutrition. *Technique et Documentation, Lavoisier*. Paris, 1-14 pages.
- PFOHL-LESZKOWICZ A. (2009).** Mycotoxins: a cancer risk factor. *African. Journal of Cancer*, 1, 42-55.
- PHILIP DIW, CLARK PM, HALES CN.and OSMOND C.(1994).** Understanding oral glucose tolerance: comparison of glucose or insulin measurements during the oral glucose tolerance test with specific measurements of insulin resistance and insulin secretion. *Diabetic Medicine*, 11, 286-292.
- PINENT M., CASTELL-AUVÍ A., GENOVESE ML, SERRANO J., CASANOVA A., BLAY M.and ARDEVOL A. (2016).** Antioxidant effects of proanthocyanidin-rich natural extracts from grape seed and cupuassu on gastrointestinal mucosa. *Journal of the Science and Food Agric*, 96(1), 178-182.
- PINTO R.T.P., LINTOMEN L., LUZ L.F.L., WOLF-MACIEL M.R. (2005).** Strategies for recovering phenol from wastewater: thermodynamic evaluation and environmental concerns. *Fluid Phase Equilibria*, 228-229, 447-457.
- PITT JI., BASILICO JC., ABARCA ML. and LOPEZ C. (2000).** Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38, 41-6.
- PITT JI.and HOCKING A.D. (1997).** Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London.
- PITT JI and HOCKING AD. (2006).** Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*, 162(3), 233-243.
- POCAI A. (2013).** Action and therapeutic potential of oxytomodulin. *Molecular metabolism*, 3 (2014), 241–251.

POLZONETTI V., EGIDI D., VITA A., VINCENZETTI S. and NATALINI P. (2004). Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food Chemistry*, 88, 11–15.

POULSEN SB., FENTON RA. and RIEG T. (2015). Sodium-glucose cotransport. *Current Opinion Nephrology and Hypertension*, 24(5), 463–469.

PROCIDA G. and CECCON L. (2006). Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill waste waters. *Analytical Chimica Acta*, 561, 103–106.

PSOTOVA J., LASOVSKY J. and VICAR J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers*, 147, 147–153.

-Q-

QUESADA I., TUDURI´ E., RIPOLL C. and NADAL A. (2008). Physiology of the pancreatic α -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology*, 199, 5–19.

-R-

RAGAZZI E. and VERONESE G. (1973). Quantitative analysis of phenolic compounds after thin layer chromatographic separation. *Journal of Chromatography A*, 77, 369-375.

RAMOS-COMENZANA A., MONTEOLICA-SANCHEZ M. and LOPEZ M.J. (1995). Bioremediation of alpechin. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 35, 249-268.

RAMOS P., SANTOS SAO, GUERRA AR., GUERREIRO O., FELÍCIO L., JERÓNIMO E., SILVESTRE AJD. and DUARTE D. (2013). Valorization of olive mill residues: antioxidant and breast cancer antiproliferative, activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Industrial Crops and Product*, 46, 359-368.

RANALLI A. (1992). Microbiological treatment of oil mill waste waters. *Grasas y Aceites*, 43, 16–19.

RANALLI A., POLLASTRI L., CONTENUTO S., IANNUCCI E. and LUCERA L. (2003 a). Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(2), 57-67.

RANALLI A., LUCERA L. and CONTENUTO S. (2003 b). Antioxidizing Potency of Phenol Compounds in Olive Oil Mill Wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (26), 7636–7641.

REBOUX G. (2006). Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46, 208–212.

REDDY KRN., REDDY CS. and MURALIDHARAN K. (2009a). Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93 (2), 53-57.

REDDY KRN., REDDY CS. and MURALIDHARAN K. (2009b). Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control*, 20, 173–178.

- REDDY KRN., SALLEH B., SAAD B., ABBAS HK., ABEL CA. and SHIER WT. (2010).** An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29, 3-26.
- REDDY CS. and REDDY K. (2010).** In vitro activity of fungicides and non-conventional chemicals on *Aspergillus spp.* and aflatoxin contamination in rice. Conference: 4th advances against aspergillosis <http://www.advancesagainstaspergillosis.org/2010/index.html>.
- REJESSEKF. (2003).** Analyse des eaux: aspects réglementaires et techniques. *Science Technologique et Environnement*. Bordeaux : CRDP d'aquitaine.
- RIAZ M., ZIA-UL-HAQ M. and SAAD M. (2016).** Anthocyanins Effects on Carcinogenesis, Immune System and the Central Nervous System. In: Anthocyanins and Human Health: Biomolecular and therapeutic aspects. *Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition*. eBook. Springer, pp125-138.
- RIBA A. (2008).** Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxines A dans la filière blé en Algérie. Thèse de doctorat. Faculté des sciences biologiques et agronomiques. UMMTO. 169p.
- RIBEREAU-GAYON P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris, 254 p.
- RIOBO SERVAN P. (2013).** Obesity and diabetes. *Nutr Hosp*, 5, 138-43. doi: 10.3305/nh.2013.28.sup5.6929.
- RICES-EVANS. (2001).** Flavonoids as antioxidant. *Current medicinal chemistry*, 8, 797-807.
- RICES-EVANS C.A., MILLER N J. and PAGANGA G. (1996).** Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- RICHARD JL. (2007).** Some major mycotoxins and their mycotoxicoses. An overview. *International Journal of Food and Microbiology*, 119, 3-10.
- RICHARD N., ARNOLD S., HOELLER U., KILPERT C., WERTZ K. and SCHWAGER J. (2011).** Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Medica*, 77(17), 1890-7.
- ROBARDS K., PRENZLER PD., TUCKER G., SWATSITANG P. and GLOVER W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.
- ROBSON AS., SANTOS., ANDERSON J., FERREIRA and ANA CRISTINA SIMOES E SILVA. (2008).** Recent advances in the angiotensin-converting enzyme²-angiotensin (1-7)-Mas axis. *Experimental Physiology – Review Article*, 93(5), 519-527.
- RODIER J. (1996).** Analyse de l'eau : Eaux naturelles, Eaux résiduaires, Eaux de mes. 8^{ème} Edition., Dunod, Paris.
- RODRIGUES F., PIMENTEL FB., OLIVEIRA MBPP. (2015).** Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. *Industrial Crops and Products*, 70, 116-124.
- RODRIGUEZ G., LAMA A., TRUJILLO M., ESPARTERO JL., FERNANDEZ-BOLAÑOS J. (2009).** Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4- dihydroxyphenylglycol. *LWT Food Science and Technology*. 42, 483-490.

- ROIG A., CAYUELA M.L., SANCHEZ-MONEDERO M.A. (2006).**An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26(9), 960-969.
- ROMERO C., BRENES M., GARCÍA P. and GARRIDO A. (2002).** Hydroxytyrosol 4-beta-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3835-3839.
- ROSENSTOCK J., CEFALU WT., LAPUERTA P., ZAMBROWICZ B., OGBAA I., BANKS P. and SANDS A.(2015).** Greater Dose-Ranging Effects on A1C Levels Than on Glucosuria With LX4211, a Dual Inhibitor of SGLT1 and SGLT2, in Patients With Type 2 Diabetes on *Metformin* Monotherapy. *Diabetes Care*, 38, 431-438.

-S-

- SAADI I., LAOR Y., RAVIV M. and MEDINA S. (2007).** Land spreading of olive mill wastewater: Effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. *Chemosphere*, 66 (1), 75-83.
- SAEED S., MOSA-AL-REZA HA., FATEMEH N., and SAEIDEH D.(2012).** Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of guar gum on streptozotocin-induced diabetes in male rats. *Pharmacognosy Magazine*, 8(29), 65–72. doi: 10.4103/0973-1296.93328.
- SAHLI Z.(2009).** Produits de terroir et développement local en Algérie, cas des zones rurales de montagnes et de piémonts. *Options Méditerranéennes*, 89, 306-338.
- SAKIHAMA YASUKO., COHEN MICHAEL F., GRACE STEPHEN C., YAMASAKI HIDEO. (2002).** Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67–80.
- SAMSON R., LEGENDRE J.B., CHRISTEN R., FISCHER-LE SAUX M., ACHOUAK W. and GARDAN L. (2005).** Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1415-1427.
- SAMSON RA., HONG SB. and FRISVAD JC. (2006).** Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44, 133–148.
- SAMSON RA., VISAGIE CM., HOUBRAKEN J., HONG SB., HUBKA V., KLAASSEN CHW., PERRONE G., SEIFERT KA., SUSCA A., TANNEY JB., VARGA J., KOCSUBE S., SZIGETI G., YAGUCHI T. and FRISVAD JC. (2014).** Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–73.
- SAQER M. et HERZALLAH. (2009).** Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Analytical Methods. Food Chemistry*, 114, 1141–1146.
- SARNI-MANCHADO P. and CHEYNIER V. (2006).** Les Polyphénols en Agroalimentaire. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. 398p
- SARRIS D., MATSAKAS L., AGGELIS L., KOUTINAS AA. and PAPANIKOLAOU S. (2014).** Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends

into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. *Industrial Crops and Products*, 56, 83–93.

SAYADI S., ALLOUCH N., JAOUA M. and ALAOUI F.(2000). Detrimental effect of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotraitement. *Process Biochem*, 35(7), 725-735.

SCHEIDEGGER K A. and PAYNE GA. (2003). Unlocking the secrets behind secondary metabolism, A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, 22, 427–463.

SCHMID J. and AMRHEIN N. (1995). Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry*, 39 (4), 737-749.

SCHMIDT FR. and ESSER K. (1985). Aflatoxins: medical, economic important and prospects for control. *Process Biochemistry*, 20, 167.

SCHWINGSHACKL L., LAMPOUSI AM., PORTILLO MP., ROMAGUERA D., HOFFMANN G and BOEING H.(2017). Olive oil in the prevention and management of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies and intervention trials. *Nutrition & Diabetes*, 7, e262. doi:10.1038/nutd.2017.12.

SCODITTI E, CAPURSO C, CAPURSO A. and MASSARO M. (2014). Vascular effects of the Mediterranean diet-Part II: Role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vascular Pharmacology*, 63, 127-134.

SCOMA A., BERTIN B., ZANAROLI G., FRARACCIO F. and FAVA F.(2011). A physicochemical–biotechnological approach for an integrated valorization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, 102(22), 10273-10279.

SEINOY., MAEKAWA R., OGATA H. and HAYASHI Y. (2016). Carbohydrate-induced secretion of glucose dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1. *Journal of Diabetes Investigation*, 7(1), 27-32.

SERHAN MF. and KREYDIYYEH SI. (2010). Insulin down-regulates the Na⁺/K⁺ ATPase in enterocytes but increases intestinal glucose absorption. *General and Comparative Endocrinology*, 167, 228–233.

SERVILI. M. and MONTEODORO G. (2002). Contribution of phenolic compounds in virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 602-613.

SERVILI M., ESPOSTO RS., FABIANI S., URBANI A., TATICCHI F., MARIUCCI R., SELVAGGINI. and MONTEODORO. GF. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Review. Inflammopharmacology*, 17, 76–84.

SERVILI MAURIZIO., SELVAGGINI ROBERTO., ESPOSTO SONIA., TATICCHI AGNESE., MONTEODORO GIANFRANCESCO. and MOROZZI GUIDO.(2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. Review. *Journal of Chromatography, (A)*, 1054, 113–127.

SESINK AL., ARTS IC., DE BOER VC., BREEDVELD P., SCHELLENS JH., HOLLMAN PC. and RUSSEL FG.(2005). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Molecular Pharmacology*, 67(6), 1999-2006.

- SEYOUM A., ASRES K., EL- FIKY F.K. (2006).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of phytochemistry*, 67, 2058-2070.
- SHAHPIRI Z., BAHRAMSOLTANI R., HOSEIN FARZAEI M., FARZAEI F. and RAHIMI R. (2016).** Phytochemicals as future drugs for Parkinson's disease: a comprehensive review. *Reviews in the Neurosciences*, 27(6), 651–668.
- SHAO Y., HU Z., YU Y., MOU R., ZHU Z. and BETA T. (2018).** Phenolic acids, anthocyanins, proanthocyanidins, antioxidant activity, minerals and their correlations in non-pigmented, red, and black rice. *Food Chemistry*, 239, 733-741.
- SHEN S-C and CHANG W-C (2013).** Hypotriglyceridemic and hypoglycemic effects of vescalagin from Pink wax apple [*Syzygium samarangense* (Blume) Merrill and Perry cv. Pink] in high-fructose diet-induced diabetic rats. *Food Chemistry*, 136 (2), 858-863.
- SILVA .BY SANDRA., LUCÍLIA GOMES., FAUSTO LEITÃO., MARIA BRONZE., ANA V COELHO. and LUÍS VILAS BOAS. (2010).** Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Food Science and Technology*, 61 (2), 157-164.
- SINGLETON V L. and ROSSI J A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-115.
- SMITH JE. and MOSS MO. (1986).** Mycotoxins, formation, analysis and significance. 148 S., 54 Abb., 52 Tab. Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore 1985. John Wiley & Sons John. Book Review, 26(5), 312p.
- SREENIVASA MY., DASS RS. and CHARIT RAJ AP. (2011).** Mycological evaluation of maize grains produced in Karnataka (India) for the post harvest fungal contamination. *World Applied Sciences Journal*, 13 (4), 688-692.
- SRINIVASAN S., MUTHUKUMARAN J., MURUGANATHAN U., VENKATESAN RS. and JALALUDEEN AM. (2014).** Antihyperglycemic effect of syringic acid on attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in experimental diabetic rats. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 4, 595–602.
- SRINIVASAN P., SUBRAMANIYAN V., KOTHANDARAMAN S. and PALANI M. (2017).** Anti-diabetic activity of quercetin extracted from *Phyllanthus emblica* L. fruit: *In silico* and *in vivo* approaches. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. In Press, Accepted Manuscript. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.10.005>.
- SRIVASTAVA B., SINGH P., SHUKLA R. and DUBEY NK. (2008a).** A novel combination of the essential oils of *Cinnamomum camphora* and *Alpinia galanga* in checking aflatoxin B1 production by a toxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 693–697.
- SRIVASTAVA A K., ARA A., BHARGAVA P., MISHRA Y., RAI S. P. and RAIL C. (2008b).** A rapid and cost-effective method of genomic DNA isolation from cyanobacterial culture, mat and soil suitable for genomic fingerprinting and community analysis. *Journal of Applied Phycology*, 19, 373–382.
- STARK A A. (2001).** Mechanisms of action of aflatoxin B1 at the biochemical and molecular levels In *Microbial Food Contamination*. Boca. Raton, FL: CRC Press. (C.L. Wilson and S. Droby, eds). pp. 47–60.

- STAVRIC B. and MATULA T I.(1992).** Flavonoïds in food. Their significance for nutrition and health. *Biochemistry and Clinical Applications*, 274- 294.
- STIPCEVIC T., PILJAC J. and VANDEN BERGHE D. (2006).** Effect of different flavonoids on collagen synthesis in human fibroblasts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61,29–34.
- STÜMPPEL F., SCHOLTKA B.and JUNGERMANN K. (1997).** A new role for enteric glucagon-37: acute stimulation of glucose absorption in rat small intestine. *FEBS Letters*, 410, 515–519.
- SULTANA B., NASEER R.and NIGAM P. (2015).** Utilization of agro-wastes to inhibit aflatoxins synthesisby *Aspergillus parasiticus*: A biotreatment of three cereals for safe longterm storage. *Bioresource Technology*, 197, 443-450.
- SUNG-HYE C., CHANG-HEE L., MI-RAN J., YOUNG-WOOK S., SANG-MOK LEE, IN-SUN C., SO-HEE K.and DAI-BYUNG K. (2008).** Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Analytical Methods. Food Chemistry*,107, 1283–1288.
- SWAMI S B., THAKOR N S J., PATIL MM.and HALDANKAR PM. (2012).** Jamun (*Syzygium cumini* (L.)): A Review of Its Food and Medicinal Uses. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 1100-1117.

-T-

- TABUC C. (2007).** Flore fongique de differents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, spécialité : pathologie, mycologie, génétique et nutrition. Institut national polytechnique de toulouse et de l'université de bucarest. 190 p.
- TAHANI N., SERGHINI-CAID H., OUZOULINE M.and ELAMRANI A. (2008).** Mycologie du blé tendre : qualité technologique du grain et conséquences sur les produits finis. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 7 (1), 27-32.
- TAKAÇ S.and KARAKAYA A. (2009).** Recovery of phenolic antioxidants from olive mill wastewater. *Recent Patent in Chemical Engineering*, 2, 230-237.
- TAKAGI M., UNO S., KOKUSHI E., SHIGA S., MUKAI S., KURIYAGAWA T., TAKAGAKI K., HASUNUMA H., MATSUMOTO D., OKAMOTO K., SHAHADA F., CHENGA T., DEGUCHI E.and FINK-GREMMELS J. (2011).** Measurement of urinary zearalenone concentrations for monitoring natural feed contamination in cattle herds: On-farm trials 1. *Journal of Animal Science*, 89, 287-296.
- TAN Y., CHU X., SHEN GL.and YU RQ. (2009).** A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice. *Analytical Biochemistry*, 387,82-86.
- TAPPER E J., POWELL D W. and MORRIS S M. (1978).** Cholinergic-adrenergic interactions on intestinal ion transport. *American. Journal of Physiology*, 235, G402-G409.
- TATSADJIEU NL., ETOA FX., MBOFUNG CMF.and NGASSOUM MB. (2008).**Effect of *Plectranthus glandulosus* and *Ocimum gratissimum* Essential Oils on Growth of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin B1 Production. *TROPICULTURA*, 26 (2), 78-83.
- TATSADJIEU NL.,JAZET DONGMO PM., NGASSOUM MB., ETOA F-X.andMBOFUNG CMF. (2009).** Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from

Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control*, 20, 161-166.

THULÉ PM. (2012). Mechanisms of current therapies for diabetes mellitus type 2. *Advances in Physiology Education*, 36, 275-283.

THORENS B. (2003). Incrélines, sécrétion d'insuline et diabète. *Medecine/Sciences*, 19, 860-863.

TIONG SH., LOOI CY., ARYA A., WONG WF., HAZNI H., MUSTAFA MR. and AWANG K. (2015). Vindogentianine, a hypoglycemic alkaloid from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae). *Fitoterapia*. 102, 182-188. doi: 10.1016/j.fitote.

TOBIN V, LE GALL M, FIORAMONTI X, STOLARCZYK E, BLAZQUEZ AG, KLEIN C, PRIGENT M, SERRADAS P, CUIF MH, MAGNAN C, LETURQUE A. and BROT-LAROCHE E. (2008). Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* 57: 555–562, 2008.

TOLA M and KEBEDE B. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food and Agriculture*, 2, 1191103.

TROVATO A., FORESTIERI A M., IAUK L., BARBERA R., MONFORTE MT. and GALATI E.M. (1993). Hypoglycaemic activity of different extracts of *Olea europaea* L. in the rat. *Plantes Médicinale et Phytothérapie*, 26, 300-308.

TUCK KL. and HAYBALL PJ. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 636-644.

TURANO E., CURCIO S., DE PAOLA M. G., CALABRO V. and IORIO G. (2002). An integrated centrifugation–ultrafiltration system in the treatment of olive mill wastewater. *Journal of Membrane Science*, 206, 519-531.

TURNER WB. (1971). Fungal metabolites. Published by *Academic Press*, London.

ÜNAL KM. (1994). Polyphénols, *o*-diphénols et acides phénoliques totaux dans les grignons d'olive et la margines, *OLIVAE*, 15, 34-35.

-U-

USSING HH and ZERAHN K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 23, 110-127.

-V-

VARGA J., RIGO K., TOTH B., TEREN J. and KOZAKIEWICZ Z. (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 29–36.

VESELY D., VESELA D. and JELINEK R. (1983). Comparative assessment of the aflatoxin B1, B2, G1, G2 and M1 embryotoxicity in the chick embryo, *Toxicology Letters*, 15, 297-302.

- VIDAL K., GROSJEAN I., REVILLARD JP., GESPACH C.and KAISERLIAN D. (1993).**Immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene: Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line.*Journal of Immunological Methods*, 166 (1), 63-73.
- VIDARSDOTTIR S., SMEETS PA., EICHELSHEIM DL., VAN OSCH MJ., VIERGEVER MA., ROMIJN JA., VAN DER GROND J.and PIJL H.(2007).** Glucose ingestion fails to inhibit hypothalamic neuronal activity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 56, 2547-2550.
- VISIOLI F., BELLOSTA S. and GALLI C. (1997).** Cardioprotective properties of olive oil-derived polyphenols. *Atherosclerosis*, 134, 336.
- VISIOLI F., BELLOSTA S. and GALLI C. (1998).** Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Science*, 62, 541-546.
- VISIOLI F., CARUSO D., PLASMATI E., PATELLI R., MULINACCI N., ROMANI A., GALLI G.and GALLI C. (2001).** Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma.*Free Radical Research*, 34(3), 301-5.
- VISIOLI F.and GALLI C. (2002).** Biological properties of olive oil phytochemicals. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 42 (3), 209–221.
- VISIOLI F.and HAGEN TM. (2007).**Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: Focus on micronutrients. *Pharmacological Research*, 55(3), 199-206.
- VISIOLI F., BELLOMO G.and GALLI C. (1998).** Free-radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, 60–64.
- VUPPALA S., DI PALMA L., CIANFRINI C.and STOLLER M.(2017).**Flocculation and Nanofiltration Processes with Insight of Fouling Phenomena for the Treatment of Olive Mill Wastewater. *Chemical Engineering Transactions*, 60, 265-270.

-W-

- WACOO AP., WENDIRO D., VUZI PC.and HAWUMBA JF. (2014).** Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. *Journal of Applied Chemistry*, 2014, Article ID 706291, 15 pages.
- WEISSHAAR B.and JENKINS GI.(1998).**Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation.*Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), 251-7.
- WELZENBACH K., GAGNON SR.and MAKUCH J. (2009).** Use of Industrial Byproducts in Agriculture (Report).Water Quality Information Center, National Agricultural Library, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Beltsville, Maryland USA.
- WICKLOW DT.and SHOTWELL OL. (1983).** Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 1–5.
- WILD CP., HUDSON GJ., SABBIONI G., CHAPOT B., HALL AJ., WOGAN GN., WHITTLE H., MONTESANO R.and GROOPMAN JD. (1992).** Dietary intake of

aflatoxins and the level of aflatoxin in peripheral blood in the Gambia, West Africa, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1, 229-234.

WILDERMUTH M C., DEWDNEY J., WU G. and AUSUBEL F M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 562–565.

WALTNER-LAW ME., WANG X.L., LAW BK., HALL RK., NAWANO M. and GRANNER DK. (2002). Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 34933–34940.

WANG Z., WU J., ZHOU Q., WANG Y. and CHE T. (2015). Berberine Nanosuspension Enhances Hypoglycemic Efficacy on Streptozotocin Induced Diabetic C57BL/6 Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5. Article ID 239749. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/239749>.

WILLIAMS M. and SHARP P. (2002). Regulation of jejunal glucose transporter expression by forskolin. *Biochim Biophys Acta*, 1559, 179–185.

WONG TP., HO KY., NG EKW., DEBNAM ES. and LEUNG PS. (2012). Upregulation of ACE2-ANG-(1–7)-Mas axis in jejunal enterocytes of type 1 diabetic rats: implications for glucose transport. *AJP Endocrinology and Metabolism*, 303, E669–E681.

WONG TP., CHAN LKY. and LEUNG PS. (2015). Involvement of the niacin receptor GPR109a in the local control of glucose uptake in small intestine of type 2 diabetic mice. *Nutrients*, 7, 7543–7561.

WRIGHT EM., HIRSCH JR., LOO DD. and ZAMPIGHI GA. (1997). Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *Journal of Experimental Biology*, 200, 287–293.

WRIGHT EM., LOO DD. and HIRAYAMA BA. (2011). Biology of human sodium glucose transporters. *Physiology Reviews*, 91, 733–794.

WRIGHT E. and TURC E. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch*, 447, 510–518.

WU J., CHEN M., SHI S., WANG H., LI N., ANSU N., LIU R., HUANG Z., JIN H., JI X. and WANG S. (2017). Hypoglycemic effect and mechanism of a pectic polysaccharide with hexenuronic acid from the fruits of *Ficus pumila* L. in C57BL/KsJ db/db mice. *Carbohydrate Polymers*, 178, 209-220.

-X-

XU XM., PARRY DW., NICHOLSON P., THOMSETT MA., SIMPSON D. and EDWARDS SG. (2008). Within-field variability of *Fusarium* head blight pathogens and their associated mycotoxins. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 21-34.

-Y-

YAAKOUBI A., CHAHLAOUI A., RAHMANI M., ELYACHIOUI M. and OULHOTE Y. (2009). Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agrosolutions*, 20(1), 35-43.

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(10), 1208–1213.

YANGUI T., SAYADI S., CHAKROUN H. and DHOUB A. (2011). Effect of hydroxytyrosol-rich preparations on phenolic-linked antioxidant activity of seeds. *Engineering in Life Science*, 11, 511-516.

YIANNIKOURIS A. and JOUANY J.P. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA, Productions Animales*, 15 (1), 3-16.

YU J. (2012).Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins (Basel)*, 4(11), 1024-1057.

YU J., CHANG PK., EHRLICH KC., CARY JW., BHATNAGAR D., CLEVELAND TE., PAYNE GA., LINZ JE., WOLOSHUK CP. and BENNETT JW. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1253-1262.

-Z-

ZBAKH H and EL ABBASSI A.(2012). Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 53–65.

ZEGGWAGH NA., MICHEL J B. and EDDOUKS M. (2014). Acute hypotensive and diuretic activities of *Artemisia herba alba* aqueous extract in normal rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (2), S644-S648.

ZENJARIB., EL HAJJOUJIH., AIT BADDIG., BAILLYJR., REVELJC., NEJMEDDINEA. and HAFID M. (2006).Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater–straw mixtures. *Journal of Hazardous Materials*, 138 (3) 1, 433-437.

ZHANG X, JIANG L, GENG C, YOSHIMURA H. and ZHONG L. (2008). Inhibition of acrylamide genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by the antioxidant hydroxytyrosol. *Chemico-Biological Interaction*, 176, 173-178.

ZHENG ZM, RICHARD JL .and BINDER J. (2006). A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161, 261–273.

ZIATI M., KHEMMARI F., CHERIFI O. and DIDOUCHE FY. (2017). Removal of polyphenols from olive mill wastewater by adsorption on activated carbon prepared from peach stones. *Revue Roumaine de Chimie*, 62(11), 865-874.

ZRELLI H., MATSUOKA M., KITAZAKI S., ZARROUK M. and MIYAZAKI H.(2011).Hydroxytyrosol reduces intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK–FOXO3a pathway. *European Journal of Pharmacology*, 660, 275–282.

Annexes

Annexe 1

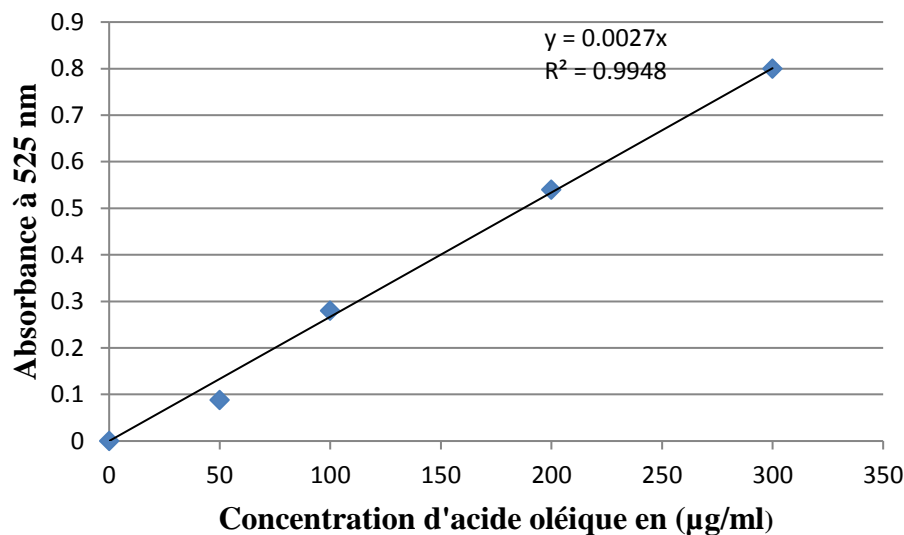
1. Préparation de la solution de phospho-vanilline :

Dissoudre 0,6 g de vanilline dans 10 ml d'éthanol absolu dilué préalablement dans 100 ml d'eau distillée, ajouter 400 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4), après agitation ; stocker la solution dans une bouteille à l'obscurité à température ambiante (KNIGHT et *al.*, 1972).

2. Détermination de la teneur en lipides totaux :*** Courbe d'étalonnage :**

La solution mère de concentration égale à 0,3 mg/ml est préparée en diluant l'acide oléique dans du chloroforme. À partir de cette solution mère, nous préparons une gamme d'étalonnage allant de [0-300] $\mu\text{g/ml}$ d'acide oléique. Les dilutions de cette gamme étalon ont été préparées dans un mélange de (méthanol/chloroforme).

La courbe d'étalonnage de l'acide oléique est donnée dans la figure suivante :



Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration de l'acide oléique et des densités optiques à 525 nm.

Annexe 2

1. Préparation de la solution de carbonate de sodium à 20 % :

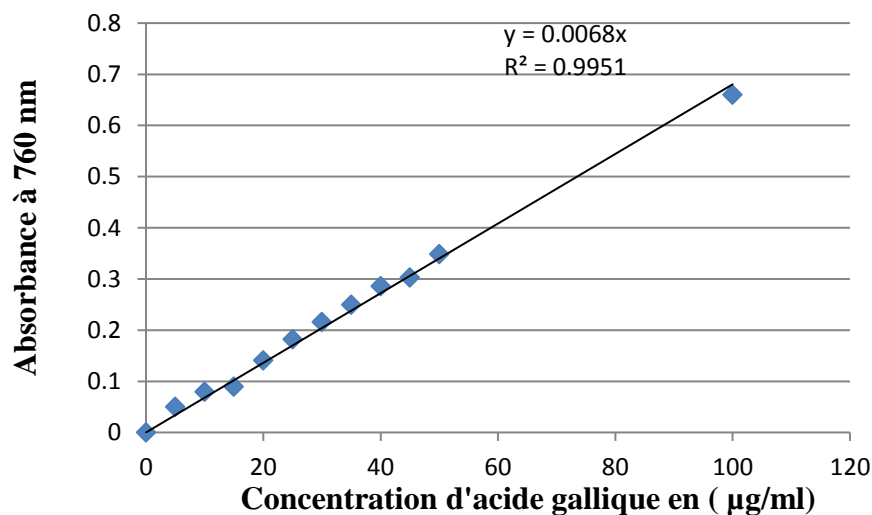
La solution de carbonate de sodium est préparée selon la méthode de CICCIO et *al.* (2009) en dissolvant à 70 ou 80 °C au bain marie 20 g de carbonate de sodium Na_2CO_3 anhydre dans 100 ml d'eau distillée. Après avoir laissé refroidir pendant une nuit à (+4 °C), une cristallisation de la solution sursaturée est provoquée en ajoutant un cristal de carbonate de sodium 10 fois hydraté ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), après cristallisation, la solution est filtrée sur laine de verre.

2. Dosage des composés phénoliques :*** Courbe d'étalonnage :**

A partir de la solution mère, nous préparons une gamme d'étalonnage allant de [0 -100] $\mu\text{g/ml}$ d'acide gallique.

La concentration de la solution mère est de 100 $\mu\text{g/ml}$.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est donnée dans la figure suivante :



Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration d'acide gallique et des densités optiques à 760 nm.

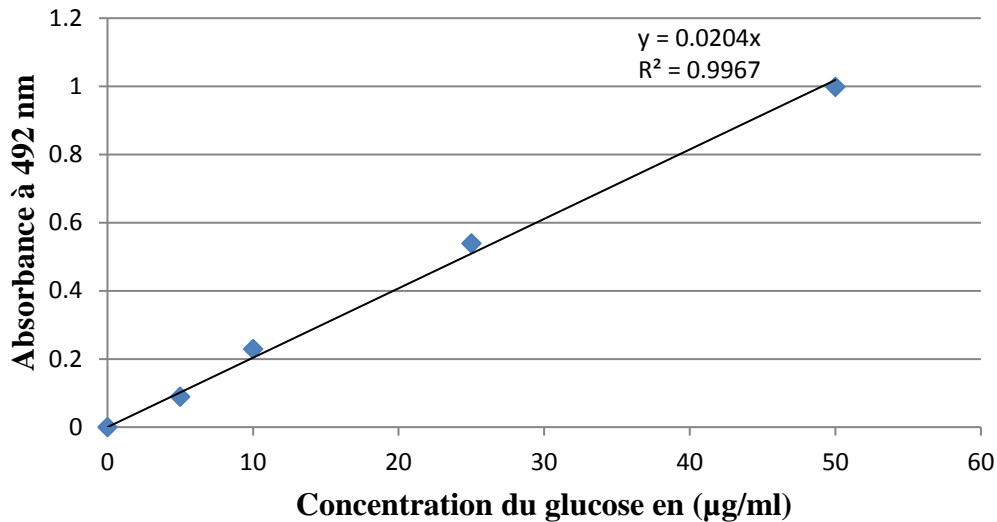
Annexe 3

1. Détermination de la teneur des margines en sucres totaux :

* Courbe d'étalonnage :

La concentration de la solution mère de glucose est de 50 $\mu\text{g/ml}$.

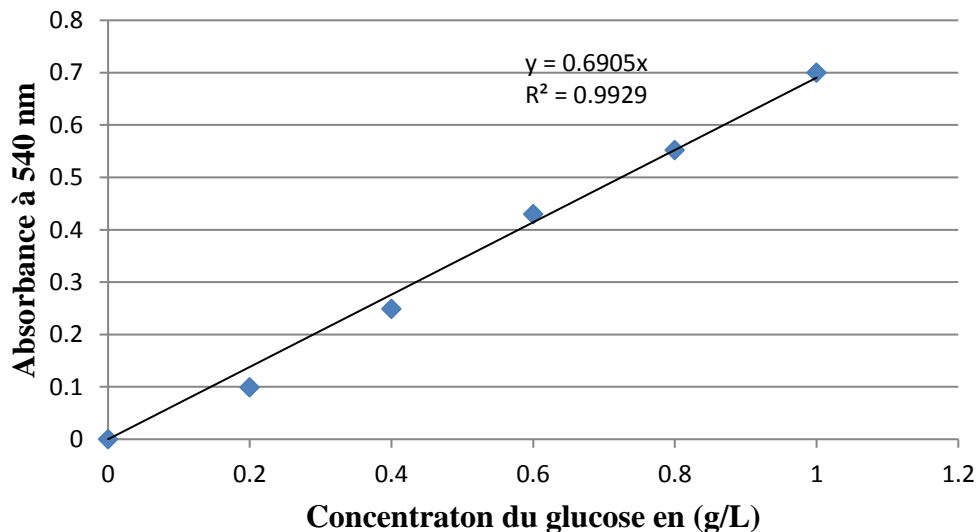
A partir de cette solution mère, nous préparons une gamme d'étalonnage allant de [0 –50] $\mu\text{g/ml}$ de glucose. La courbe d'étalonnage du glucose est donnée dans la figure suivante :



Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration du glucose et des densités optiques à 492 nm.

2. Détermination de la teneur des margines en sucres réducteurs :

* Courbe d'étalonnage : La courbe d'étalonnage a été réalisée avec une solution mère de glucose de 0 à 1g/L



Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration du glucose et des densités optiques à 540 nm.

Annexe 4

1. Préparation de réactif de Bradford selon BRADFORD (1976) :

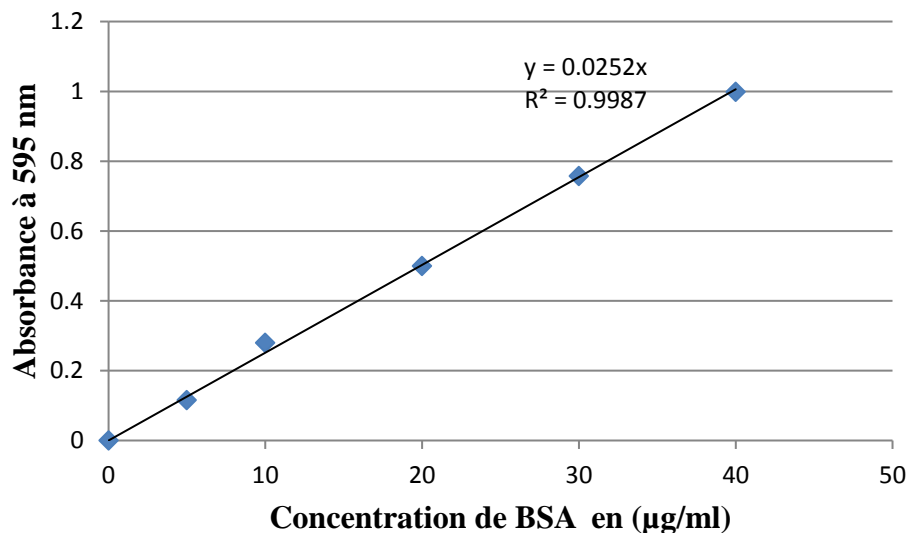
- ✓ dissoudre 100 mg de bleu de Comassie brillant G 250 dans 50 ml d'éthanol (95 %) ;
- ✓ ajouter 100 ml d'acide phosphorique (85 %) ;
- ✓ ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée.

NB. Ce réactif peut être disponible dans le marché.

2. Détermination de la teneur des margines en protéines :*** Courbe d'étalonnage :**

La concentration de la solution mère de BSA est de 40 µg/ml.
A partir de cette solution mère, nous préparons une gamme d'étalonnage allant de [0-40] µg/ml de BSA.

La courbe d'étalonnage de la BSA est donnée dans la figure suivante :



Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration de BSA et des densités optiques à 595 nm.

Annexe 5

La Composition des milieux de cultures utilisés :**1. Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) :**

Pomme de terre.....	200 g
Agar.....	15 g
Glucose.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH final= 5,6 ± 0,2

Ramollir la pulpe de pomme de terre dans 300 ml d'eau en chauffant. Ajouter ensuite le glucose et l'agar. Porter à ébullition pour solubiliser l'agar puis filtrer sur gaze et compléter à un litre avec de l'eau distillée.

2. Milieu CAM : Coconut Agar Medium : milieu à base de coco gélosé

Noix de coco déchiquetée.....	100 g
Eau distillée.....	300 ml.

Tissu en mousseline

Agar	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Préparation : 100 g de noix de coco déchiquetée sont homogénéisés pendant 05 min avec 300 ml puis porté à ébullition, le mélange est filtré à l'aide du tissu en mousseline.

Le pH final ajusté à 7 avec une solution de NaOH 2N (cette étape on peut ne pas l'effectuer)

Le filtrat est additionné de 20 g d'agar puis complété à 1000ml par l'eau distillée.

3. Potato Dextrose Broth (PDB) :

Pomme de terre.....	200 g
Glucose.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Laver la pomme de terre ; couper en cubes dans 300 ml d'eau distillée; Porter à ébullition pendant 30 – 45 min. Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le glucose. Compléter le volume à 1000 ml.

4. Semi synthetic liquid medium (SMKY)

Saccharose.....	200 g
Sulfate de magnésium.....	0,5 g
Nitrate de potassium.....	3 g
Extrait de levure.....	7 g

Les ingrédients sont mélangés à 1000 ml d'eau distillée.

NB : tous les milieux sont stérilisés par autoclave durant 20 min à 120 °C.

Annexe 6



Celer

AFLA B₁

Enzyme immunoassay for the detection of aflatoxin B₁

(code MA220/MA221)

Celer AFLA B₁ is an ELISA kit prepared for an immunoenzymatic assay for the quantitative analysis of aflatoxin B₁.

The kit contains the procedure and the materials sufficient for 96 determinations (code MA220) or 48 determinations (code MA221) including standards.

A microtiter plate photometer or a strip photometer is required.

Analysable samples

Cereals, feed, nuts, dried fruits.

Sample preparation

Grinding, extraction in methanol-water, filtration

Assay time: 15 minutes (sample preparation not included).

Detection limit

1 ppb

Specificity	
Compound	Cross-reactivity %
Aflatoxin B ₁	100
Aflatoxin B ₂	5 ± 1
Aflatoxin G ₁	19 ± 1
Aflatoxin G ₂	<1

1 TEST PRINCIPLE

The assay is performed in plastic microwells that have been coated with anti-aflatoxin antibody. In the premixing wells the enzyme labelled aflatoxin and the standard solutions or samples are mixed and then transferred into the anti-aflatoxin microtiter plate. During the first incubation, free aflatoxin in the standard solution /sample and enzyme-labelled aflatoxin compete for the anti-aflatoxin antibody binding sites on the solid phase. Any unbound enzyme conjugate and aflatoxin molecule are then removed in a washing step. The bound enzyme activity is determined adding a fixed amount of a chromogenic substrate. The enzyme converts the colourless

chromogen into a blue product. The addition of the stop reagent leads to a colour change from blue to yellow. The absorbance is measured with a microplate reader at 450 nm. The colour development is inversely proportional to the aflatoxin B₁ concentration in the standard solution /sample.

2 PROVIDED REAGENTS

Premixing microtiter plate: non-coated wells, blank.

Code MA220: 96 wells (12 strips of 8 wells)

Code MA221: 48 wells (6 strips of 8 wells).

Microtiter plate: coated with anti-aflatoxin antibody, in an aluminium bag with a desiccant bag.

Code MA220: 96 wells (12 strips of 8 wells)

Code: MA221: 48 wells (6 strips of 8 wells).

As the strips are breakable, the wells can be used individually. For this purpose, it is sufficient to get out the wells from the sheath and to break the joint.

Aflatoxin B₁ std: 5 vials containing 1,5 ml of: 0 ppb; 1 ppb; 5 ppb; 20 ppb; 40 ppb of aflatoxin B₁. White cap.

Enzyme conjugate: 1 amber glass vial, red cap.

Code MA220: 18 ml, code MA221: 12 ml.

Washing-buffer 10x: 1 plastic bottle containing 50 ml.

Developing solution: 1 amber plastic bottle containing 15 ml.

Stop solution: 1 glass vial containing 9 ml. White cap.

3 REQUIRED BUT NOT PROVIDED MATERIALS

- Distilled water

- Methanol

- NaCl

Equipment

- Balance

- Mill (grinding)

- Shake,r or vortex, or blender (like "Osterizer")

- Filter paper (Whatman 1)

- 20-200 µl micropipettes with tips

- 50-300 µl multichannel micropipette with tips

- Microtiter plate or strip reader equipped with a 450 nm filter.

4 WARNING AND PRECAUTIONS FOR THE USERS

- The product is for *in vitro* diagnostic use only.

- Some reagents contain preservative. The stop solution contains sulphuric acid and is corrosive. The standard solutions are toxic and inflammable because of methanol.



- The presence of aflatoxin (carcinogenic compound) in the solutions does not make it more dangerous because the concentration is very low.
- Handle the reagents with caution, avoiding contact with skin, eyes and mucous membranes.
 - Safety data sheet are available on Tecna's web site.

5 HANDLING AND STORAGE INSTRUCTIONS

- Store the kit at +2/+8 °C and do not freeze components.
- Reseal the unused strips of the anti-aflatoxin microtiter plate in the bag together with the desiccant bag provided.
- Do not use components after the expiration date.
- Do not intermix components from different kit lots.
- Do not use photocopies of the instruction booklet. Keep always the instruction booklet that is included inside the kit.

6 SAMPLES PREPARATION

6.1 Cereals and feed

- Mix carefully the sample to be analyzed in order to make it homogeneous.
- Finely grind the sample.
- Weigh 50 g of ground sample and add 10 g of NaCl. Add 250 ml of a solution of 70% methanol in distilled water.
- **Alternatively:** weigh 5 g of ground sample and add 1 g of NaCl. Add 25 ml of a solution of 70% methanol in distilled water.
- Blend or shake thoroughly for 3 minutes.
- Filter the sample (Whatman 1) and collect the filtrate.

It is suggested to weigh 50 gr in order to have a better representative analysis of the sample.

6.2 Nuts

- Mix carefully the sample to be analyzed in order to make it homogeneous.
- Finely grind the sample.
- Weigh 50 g of ground sample and add 10 g of NaCl. Add 250 ml of a solution of 60% methanol in distilled water.
- **Alternatively:** weigh 5 g of ground sample and add 1 g of NaCl. Add 25 ml of a solution of 60% methanol in distilled water.
- Blend or shake thoroughly for 3 minutes.
- Filter the sample (Whatman 1) and collect the filtrate.

It is suggested to weigh 50 gr in order to have a better representative analysis of the sample.

6.3 Dried fruits

- Finely mince the sample.
- Weigh 5 g of minced sample.
- Add 0,5 g of NaCl.
- Add 25 ml of a solution of MeOH 80% in distilled water and mix thoroughly for 3' using a high-speed blender or for 15 minutes using a low speed shaker.
- Filtrate the sample (Whatman 1) or centrifuge at 3500xg for 5'; recover the supernatant /filtrate.

7 WORKING SOLUTIONS PREPARATION

Aflatoxin B₁ std: ready to use; mix before use.

Enzyme conjugate: ready to use.

Washing buffer: dilute the concentrate 1:10 (1+9) with distilled water; ATTENTION: in presence of crystals, bring

the solution at room temperature and stir in order to solve them completely.

Developing solution: ready to use; this solution is light sensitive: keep away from direct light;

Stop solution: ready to use. Attention: it contains 2 M sulphuric acid. Handle with care and in case of contact wash thoroughly with tap water.

8 ASSAY PROCEDURE

8.1 Preliminary comments

- Bring all reagents to room temperature before use, and keep them at room temperature for at least for an hour.
- Return all reagents to +2/+8 °C immediately after use.
- Do not change the assay procedure, in particular:
 - do not prolong the first incubation time;
 - do not incubate the plate at a temperature higher than 25°C or lower than 18°C;
 - do not shake the plate during the incubations;
 - use for dispensing accurate and precise micropipettes with suitable tips.
- Once started, complete all the steps without interruption.
- The reproducibility of ELISA results depends largely upon the efficiency and uniformity of microwells washing; always keep to the described procedure.
- Use a single disposable tip for each standard and sample to avoid cross-contamination.
- Do not allow tips to contact the liquid already in the microwells.
- Avoid direct sunlight during all incubations. It is recommended to cover the microtiter plate without using sealing tapes.

8.2 Assay procedure

1. Predispose the assay layout, taking into account that one well is required for each standard and sample; remove the wells not to be used from the anti-aflatoxin microtiter plate and replace them in the pouch with the desiccant gel and reseal the pouch very well using the clump provided. Prepare an equal number of premixing wells. ATTENTION: it is suggested to carry out no more than 48 determinations in each assay (standards included); if a multichannel pipette is not used, it is suggested to carry on no more than 16 determinations in each assay (standards included).
2. Add 100 µl of enzyme conjugate in each premixing well.
3. Add 50 µl of each standard/ sample into the corresponding premixing wells. The standard/sample contain high percentage of methanol: take care to rinse the tip pipetting up and down the solutions before adding to the wells.
4. Using the micropipette, mix the content of each premixing well (pipette up and down three



times) and immediately transfer 100 µl into the corresponding anti-aflatoxin B₁ antibody coated microwell.

ATTENTION: use new tips for each well to avoid cross-contamination.

5. Incubate 10 minutes at room temperature;
Do not prolong the first incubation time and do not shake during incubation .

6. Washing sequence

- At the end of incubation, pour the liquid out from the wells.
- Fill completely all the wells with washing buffer 1x using a squeeze bottle. Pour the liquid out from the wells. **Repeat the washing sequence for a total of three times.**
- Remove the remaining droplets by tapping the microplate upside down vigorously against absorbent paper.

Do not allow the wells to dry out.

7. Developing

- Add 100 µl of development solution to each well and mix thoroughly with rotatory motion for few seconds;

8. Incubate for 5 minutes at room temperature.

9. Add 50 µl of stop solution to each well micropipette and mix thoroughly with rotatory motion for few seconds.

10. Measure the absorbance at 450 nm. Read within 60 minutes.

In case a strip reader is used, it is necessary to take out the strip from the frame and to remove the case round the wells.

9 RESULTS CALCULATION

- Divide the absorbance value of each standard and sample by the absorbance of the Standard 0 (B₀) and multiply by 100; the Maximum Binding (B₀) is thus made equal to 100% and the absorbance values are quoted as percentage:

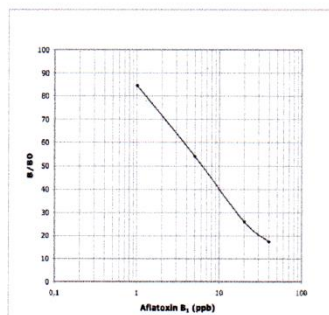
$$\frac{\text{standard (or sample) absorbance}}{\text{Standard 0 (B}_0\text{) absorbance}} \times 100 = \frac{B}{B_0}$$

- Enter the B/B₀ values calculated for each standard in a semi-logarithmic system of coordinates against the aflatoxin B₁ standard concentration and draw the standard curve.
- Take the B/B₀ value for each sample and interpolate it to the corresponding concentration in the calibration curve. Standards concentration (ppb) already considers the sample dilution factor.

For the calibration the "spline" curve fit can be used, but it is possible to use also the linear regression or the "point to point" curve. For calculation of the ELISA results using the

"point to point" curve, Excel spreadsheets can be downloaded from the section "download" on Tecna's web site, www.tecnalab.com.

10 EXAMPLE OF STANDARD CURVE



11 RESULTS EVALUATION

After results elaboration, it is necessary to verify the assay performance. The verification is performed by comparison of obtained data with those given in kit specifications (paragraph 12). If the values are out from the specifications given, it is advised to control the expiry date of the kit, the wavelength of absorbance recording, as well as the procedure employed. If operation errors do not emerge, contact our technical assistance. WARNING: substitution will be possible just in case of rendered kit. The kit must be conserved in its integral version and at the temperature indicated in this booklet.

12 KIT SPECIFICATIONS

12.1 Assay specification

Bo absorbance	≥ 0,7 OD _{450nm}
B/Bo 50%	2 - 8 ppb

12.2 Assay performance

Recovery %	- Maize (Certified Reference Material): 124±22
	- Maize (spiked material): 91±21
	- Corn germ (naturally contaminated): 97±21
	- Feed (Certified Reference Material): 108±20
	- Nuts: 98±18
	- Dried fruits 113±18

Matrix	Cut off ppb	LOQ ppb
Maize	≤ 1	1
Hazelnut	≤ 1	1
Pistachio nut	≤ 1	1
Raisins	≤ 1	2
Figs	≤ 1	2

Annexe 7

AGROBIO

Laboratoires AGROBIO

GROUPE **Qualtech**
GROUPEZ.A.C. des Trois Marches
3, impasse de la Jonchée
F-35132 VEZIN LE COQUET
Tél : +33 (0)2.99.14.70.50
Fax : +33 (0)2.99.14.70.51Email : secretariat.rennes@qualtech-groupe.com
Site Web : www.agrobio-rennes.com**RAPPORT D'ANALYSES N° VZ-20010224-1**Code Client : 109513
Bon de commande : Devis D2529-10 signé
Devis : D2529-10

Vezin, le : 01/02/2017

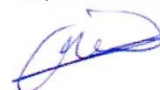
Intercepts

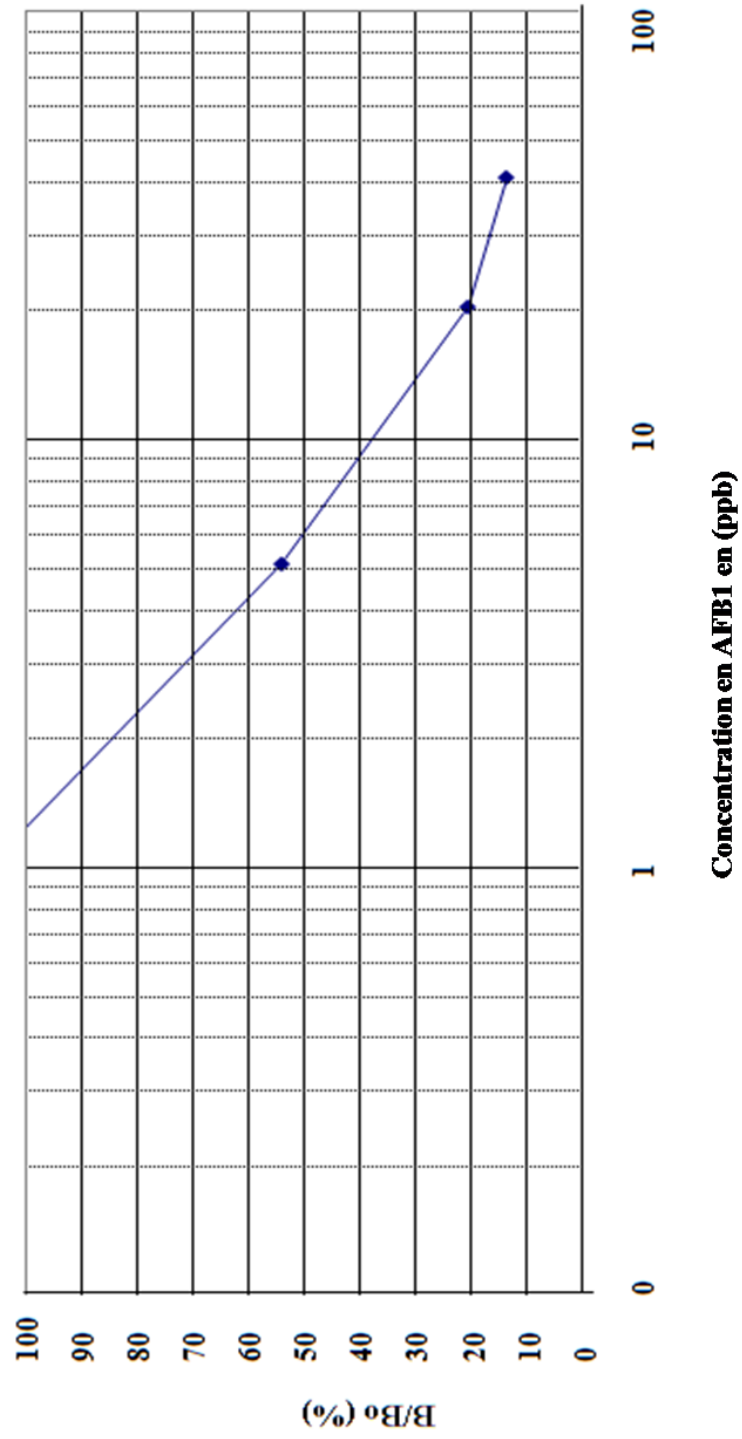
B/Bo(%)	O.D.	ppb
50	1,389	5,813

Standards

Std.(ppb)	O.D.	B/Bo(%)
0	2,601	
1	2,956	113,690
5	1,491	57,341
20	0,548	20,074
40	0,353	13,572

Commentaires :

C.NIO
Responsable Technique


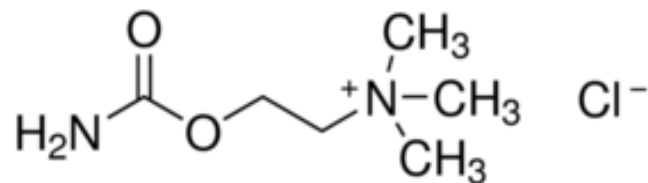


Annexe 8

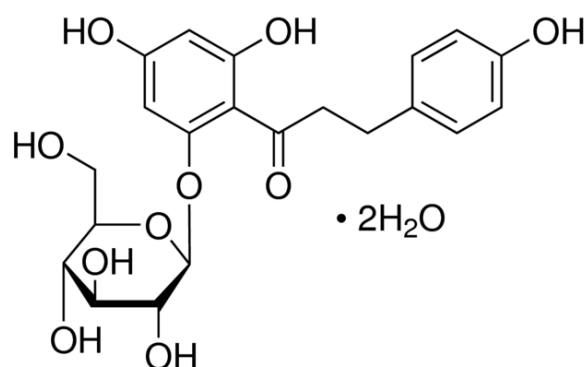
1-Composition de la solution du Ringer :

Na +	140mM	Cl-	120 mM
K+	5,2mM	HCO ₃ ⁻	25 mM
Ca ⁺⁺	1,2mM	HPO ₄	2,4 mM
Mg ⁺⁺	1,2mM	H ₂ PO ₄	0,4 mM

2- Caractéristiques physicochimiques du Carbachol, de la Phloridzine et du PMA

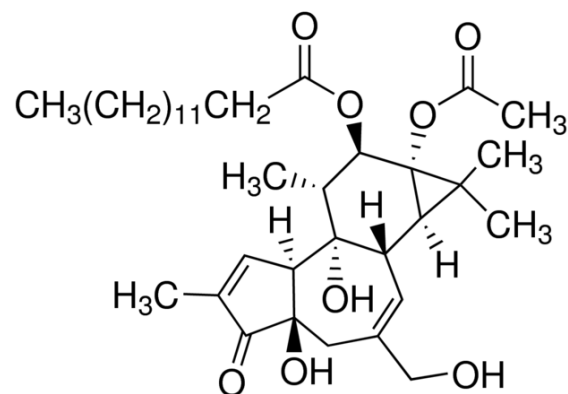


- **Carbachol :Synonym:**2-Hydroxyethyl)trimethylammoniumchloride carbamate, Carbachol,Carbamoylcholinechloride,Carbamylcholinechloride.
- **Linear Formula :** NH₂COOCH₂CH₂N(Cl)(CH₃)₃.
- **Molecular Wieg**t 182.65
- **Ref :** Y0000113 ; **Pakaging :** 50 mg.



- **Phloridzin :** **Synonym:** 1-[2-(β-D-Glucopyranosyloxy)-4,6-dihydroxyphenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanone, Phloretin 2'-β-D-glucopyranoside, Phloretin 2'-β-D-glucoside, Phlorizindihydrate.
- **Empirical Formula (Hill Notation):** C₂₁H₂₄O₁₀ · 2H₂O

- **Molecular Weight:** 472.44
- **Ref :**P3449-1G ; **Packaging:** 5 g.



- **PMA :** Phorbol 12-myristate 13-acetate : **Synonym:** 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, 4 β ,9 α ,12 β ,13 α ,20-Pentahydroxytiglicia-1,6-dien-3-one 12-tetradecanoate 13-acetate, PMA, TPA
- **Empirical Formula (Hill Notation):** C₃₆H₅₆O₈
- **MolecularWeight:** 616.83
- **Ref :** 79346-5MG 3 ; **Packaging:** 5 mg.

Annexe 9

1-RIPA Buffer + Phospatase Inhibitor (RB+ PI):

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM b-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl Fluoride), 20 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g Pepstatin A, 10 μ g Apotonine, 25 Mm calyculine).

2-Laemmli Buffer (5X) :

SDS 5 %

Glycerol 50 %

beta-mercaptoethanol 2 %

Bromophenol blue 0,05 %

Tris-HCl pH 6,8 1,5 M

Annexe 10

1-milieu RPMI (1640)

61870 - RPMI 1640, GlutaMAX(TM)

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75.0	10.0	0.13333334
L-Alanyl-Glutamine	217.0	446.0	2.0552995
L-Arginine	174.0	200.0	1.1494253
L-Asparagine	132.0	50.0	0.37878788
L-Aspartic acid	133.0	20.0	0.15037593
L-Cystine	240.0	50.0	0.20833333
L-Glutamic Acid	147.0	20.0	0.13605443
L-Histidine	155.0	15.0	0.09677419
L-Hydroxyproline	131.0	20.0	0.15267175
L-Isoleucine	131.0	50.0	0.3816794
L-Leucine	131.0	50.0	0.3816794
L-Lysine hydrochloride	183.0	40.0	0.21857923
L-Methionine	149.0	15.0	0.10067114
L-Phenylalanine	165.0	15.0	0.09090909
L-Proline	115.0	20.0	0.17391305
L-Serine	105.0	30.0	0.2857143
L-Threonine	119.0	20.0	0.16806723
L-Tryptophan	204.0	5.0	0.024509804
L-Tyrosine	181.0	20.0	0.110497236
L-Valine	117.0	20.0	0.17094018
Vitamins			
Biotin	244.0	0.2	8.1967213E-4
Choline chloride	140.0	3.0	0.021428572
D-Calcium pantothenate	477.0	0.25	5.24109E-4
Folic Acid	441.0	1.0	0.0022675737
Niacinamide	122.0	1.0	0.008196721
Para-Aminobenzoic Acid	137.0	1.0	0.00729927

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Pyridoxine hydrochloride	206.0	1.0	0.004854369
Riboflavin	376.0	0.2	5.319149E-4
Thiamine hydrochloride	337.0	1.0	0.002967359
Vitamin B12	1355.0	0.005	3.690037E-6
i-Inositol	180.0	35.0	0.19444445
Inorganic Salts			
Calcium nitrate (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236.0	100.0	0.42372882
Magnesium Sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	246.0	100.0	0.40650406
Potassium Chloride (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84.0	2000.0	23.809525
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	6000.0	103.44827
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄) anhydrous	142.0	800.0	5.633803
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	2000.0	11.111111
Glutathione (reduced)	307.0	1.0	0.0032573289
Phenol Red	376.4	5.0	0.013283741

2-Tampon PBS ([-]CaCl₂ ; [-]Mg Cl₂)

14190 - DPBS, no calcium, no magnesium

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Inorganic Salts			
Potassium Chloride (KCl)	75.0	200.0	2.6666667
Potassium Phosphate monobasic (KH ₂ PO ₄)	136.0	200.0	1.4705882
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	8000.0	137.93103
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	268.0	2160.0	8.059702

3-Tryp LE Express ref :12604

TrypLE™ Express (1X), no phenol red

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Inorganic Salts			
Potassium Chloride (KCl)	75.0	200.0	2.6666667
Potassium Phosphate monobasic (KH ₂ PO ₄)	136.0	200.0	1.4705882
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	8000.0	137.93103
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	268.0	2160.0	8.059702
Other Components			
EDTA	416.0	457.6	1.1
rProtease		confidential	n/a

Annexe 11

1- Préparation des gels pour SDS-PAGE :**Préparation du gel de séparation (Running gel) (10 %)**

H ₂ O.....	8,12 ml
Tris 1,5 M.....	5 ml
SDS 20 %.....	100 µl
Acrylamide/bis-acrylamide 30 %.....	6,66 ml
APS 10 % (persulfate d'ammonium).....	100 µl
TEMED (tetramethylethyldiamine).....	10 µl

Préparation du gel de concentration (Stacking gel) (4 %)

H ₂ O.....	6 ml
Tris 0,5 M.....	2,5 ml
SDS 20 %.....	50 µl
Acrylamide/bis-acrylamide 30 %.....	1,33 ml
APS 10 % (persulfate d'ammonium).....	100 µl

TEMED (tetramethylethyldiamine).....10 µl

NB : Qsp pour deux gels

2- Préparation des tampons SDS-PAGE :

Tampon de migration 10 X	Qsp 1L
Tris Base	30,3 g
Glycine	144,1 g
SDS	10 g

Tampon de transfert 10 X	Qsp pour 1L
Tris Base	60,55 g
Glycine	71,25 g
SDS	10 g

Tampon TBS (Tris Buffered saline)

Tampon TBS 10 X	Qsp pour 1 L
Tris Base	24,2 g
Na Cl	80 g

TBST 1 X	Qsp pour 1 L
TBS 10 X	100 ml
Tween 20	1 ml
Eau distillée	899 ml

Recommendations for Loading

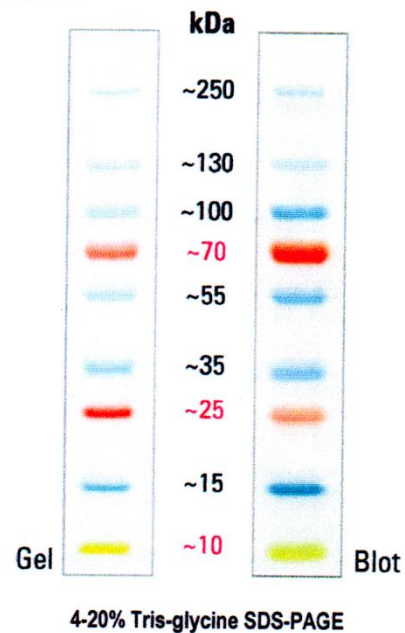
1. Thaw the ladder either at room temperature or at 37-40°C for a few minutes to dissolve precipitated solids.

Do not boil!

2. Mix gently, but thoroughly, to ensure that the solution is homogeneous.
3. Load the following volumes of the ladder on SDS-polyacrylamide gel:
 - 5 µL per well for mini gel,
 - 10 µL per well for large gel.
 Use the same volumes for Western blotting.
 The loading volumes listed above are recommended for gels with a thickness of 0.75-1.0 mm. The loading volume should be doubled for 1.5 mm thick gels.

Important Notes

- Prestained proteins can have different mobilities in various SDS-PAGE-buffer systems. However, they are suitable for approximate molecular weight determination when calibrated against unstained standards in the same system. See the table provided for migration patterns in different electrophoresis conditions.
- In low-percentage gels (< 10%), the low-molecular weight proteins in the ladder may migrate with the dye front.
- PageRuler Plus Prestained Protein Ladder can be used in Western blotting with all common membranes: PVDF, nylon and nitrocellulose.
- Longer transfer times or higher transfer voltages may be required for Western blotting of large (>100 kDa) proteins.

Representative picture of PageRuler Plus Prestained Protein Ladder**General References**

- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2):195-203.
- Kurien, B.T. and Scofield, R.H. (2003). Protein blotting: a review. *J Imm Meth* 274:1-15.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Towbin, H., et al. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4.

This product is manufactured under the license for Strep-tag® technology covered by US patents Nos. 5,506,121, 6,103,493 and foreign counterparts.

PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals. Please refer to www.thermoscientific.com/onebio for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2013 Thermo Fisher Scientific, Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific, Inc. and its subsidiaries.

Annexe 12

1-Révélation des bandes avec le Western blot

(1) Détection d'un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline : L'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline est fixé à la protéine d'intérêt. L'ajout du substrat colorimétrique à la phosphatase alcaline va permettre une coloration de la membrane (Biorad, kit 170-6432). Cette révélation est irréversible. Le tampon de coloration (25X AP reagent buffer) est dilué à 1X (1 ml dans 25 ml final pour une membrane). Avant d'effectuer la réaction, ajouter 250 µl de réactif A et 250µl de réactif B (AP color reagent A/B) pour 25 ml de tampon TBS - T 1X. La membrane est incubée avec le substrat jusqu'à l'apparition d'une coloration violette des protéines. Cette réaction est extrêmement sensible. Il est important de rester proche au moment de l'incubation. En cas d'incubation trop longue la membrane se colorera aussi, la rendant inexploitable. La réaction est arrêtée en enlevant le tampon et en rinçant plusieurs fois la membrane dans de l'eau.

(2) Détection d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase : L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est fixé à la protéine d'intérêt. La réaction se fait par chimioluminescence c'est-à-dire par formation d'une molécule excitée émettant à une longueur d'onde donnée. La détection se fait grâce à une caméra CCD (pour « charge coupled device ») permettant la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique. Le kit utilisé dans ce protocole permet la détection de l'anticorps secondaire par un mélange de 1 ml de solution A et 1 ml de solution B (GE Health care, ECL plus RPN2132).

2-Liste des anticorps primaires et secondaires

Anticorps	Espèces	Dilution	Fournisseur
Anticorps Iaire Anti-SGLT-1 (polyclonal IgG antiserum)	Lapin	1/500	Certificate of Analysis Ref :#2441948
Anticorps Iaire Anti-PKC ($\alpha, \delta, \zeta, D/\mu$)	Lapin	1/1000	Sampler Kit, cell signaling technology Ref : # 9960
Anticorps Iaire Goat anti-Rabbit, HRP (Horseradish peroxidase) conjugate IgG	Lapin	1/30000	Thermo scientific
Anticorps Iaire Goat anti-mouse IgG- AP Alcaline phosphatase conjugate	souris	1/5	Santa Cruz biotechnology
β actine	Lapin	1/10000	Sigma

Anti-SGLT-1

Polyclonal Antibody

Cat. # 07-1417

Lot # 2441948

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES
NOT FOR HUMAN OR ANIMAL CONSUMPTION

pack size: 100 µL

Store at -20°C

Certificate of Analysis

page 1 of 2

fe
18 August
2016

Applications	Species Cross-Reactivity	Antibody Isotype	Epitope/Region	Host Species	Molecular Weight	Accession #
WB, ELISA, IH(P)	H, M, R Av, Fe, Po, Rb, Rp	IgG	extracellular loop	Rb	70-77 kDa	NM_000343.1

Background

SGLT-1 (Sodium Glucose Co-transporter-1) is a family of sodium-dependent glucose transporters that, along with the GLUTs, help mediate the transportation of glucose across the cell membrane. The kidneys play a major role in the regulation of blood glucose. Although kidney nephrons indiscriminately filter about 180g of glucose per day from the blood, most is reabsorbed actively in the proximal convoluted tubule by a Na/Gl co-transport (ratio 2:1) mechanism (SGLT). Typically, glucose is first reabsorbed by these transporters, which reside within the brush-border epithelia of the PCT cells. The glucose is then transported out of the cell across the basolateral membranes by a facilitated diffusion sugar transporter (GLUTs). At least three members of SGLTs (SGLT1-3) have been cloned and characterized from various species. SGLT1-3 genes code for protein with both N and C terminus predicted to be extracellular. There is approximately 60-70% homology between the 3 forms. SGLT1 does not discriminate α-MIG, glucose and galactose, while SGLT2 and 3 do not transport D-galactose efficiently. SGLT1 is an integral membrane protein expressed in proximal convoluted tubule S1 segments of the kidney (outer renal medulla) and in the intestine.

Presentation

Rabbit polyclonal IgG antiserum in buffer containing 0.05% sodium azide.

Specificity

Recognizes SGLT-1.

Species Cross-reactivity

Human, Mouse, Rat, Canine, Pig, Rabbit, Feline, Avian, Reptile

Immunogen

Synthetic peptide corresponding to amino acids 402-420 of the putative extracellular loop of SGLT-1 of mouse/rabbit small intestine.

Molecular Weight

Recognizes a band of approximately 70-77 kDa in Western blot.

Storage and Handling

Stable for 1 year at -20°C from date of receipt.
Handling Recommendations: Upon receipt, and prior to removing the cap, centrifuge the vial and gently mix the solution. Aliquot into microcentrifuge tubes and store at -20°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles, which may damage IgG and affect product performance.

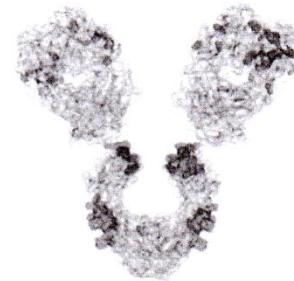
Control

PC3 cell lysate

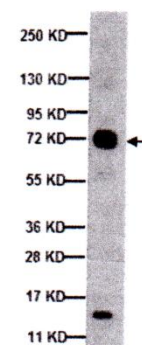
Quality Control Testing

Evaluated by Western Blot on PC3 lysates.

Western Blot Analysis: 1:500-1:2,000 dilution of this antibody detected SGLT-1 on 10 µg of PC3 lysates.

**References**

- Silverman, M., et al. (1993). *BBA*. 1153:43-52.
- Hirayama, E.A., et al. (1992). *BBA*. 1103:37-44.
- Pajor, A.M., et al. (1992). *Am. J. Physiol.* 32:R489-R495.
- Hirayama, et al. (1991). *Am. J. Physiol.* 261:C296-C304.
- Hediger, M.A., et al. (1987). *Nature*. 330:1379.



Western Blot Analysis:
Representative lot data. PC3 lysate was resolved by electrophoresis, transferred to PVDF membrane and probed with anti-SGLT-1 (1:500 dilution). Proteins were visualized using a donkey anti-rabbit secondary antibody conjugated to HRP and a chemiluminescence detection system. Arrow indicates protein SGLT-1 (~70 kDa).

APPLICATION LEGEND: WB Western Blotting ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay IP Immunoprecipitation
IC Immunocytochemistry IF Immunofluorescence IH Immunohistochemistry (Tissue)

SPECIES LEGEND: A Avian B Bovine Fe Feline (Cat) H Human M Mouse Po Porcine (Pig) R Rat Rb Rabbit Rp Reptilian

Please visit www.millipore.com for additional product information, test data and references.

Submit your published journal article, and earn credit toward future Millipore purchases. Visit www.millipore.com/publicationrewards to learn more!

diluted 1/1000

#9960
Store at -20°C

PKC Isoform Antibody Sampler Kit

 1 Kit
(4 x 40 µl)

rev. 03/26/14

Cell Signaling
TECHNOLOGY®

Orders ■ 877-616-CELL (2355)
orders@cellsignal.com
Support ■ 877-678-TECH (8324)
info@cellsignal.com
Web ■ www.cellsignal.com

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

Products Included	Product #	Quantity	Mol. Wt.	Isotype
PKC α Antibody	2056	40 µl	80 kDa	Rabbit IgG
PKC δ (D10E2) Rabbit mAb	9616	40 µl	78 kDa	Rabbit IgG
PKC ζ (C24E6) Rabbit mAb	9368	40 µl	78 kDa	Rabbit IgG
PKD/PKC μ Antibody	2052	40 µl	115 kDa	Rabbit IgG
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	7074	100 µl		Goat

See www.cellsignal.com for individual component applications, species cross-reactivity, dilutions and additional application protocols.

Description: PKC Antibody Sampler Kit contains reagents to examine the total protein levels of various PKC isoforms. The kit contains enough primary and secondary antibodies to perform four Western mini-blot per primary antibody.

Background: Activation of PKC is one of the earliest events in a cascade leading to a variety of cellular responses such as secretion, gene expression, proliferation and muscle contraction (1,2). PKC isoforms have been classified into three groups: classical PKCs, which are calcium-dependent via their C2 domains and are activated by phosphatidylinositol (PS), diacylglycerol (DAG) and phorbol esters (TPA or PMA) through their cysteine-rich C1 domains; novel PKCs, which are calcium-independent but are still regulated by PS, DAG and TPA and atypical PKCs, which are calcium-independent and do not require PS, DAG or TPA for their activation (3-7). Members of these three PKC groups contain a pseudo-substrate or autoinhibitory domain that binds to the substrate binding site in the catalytic domain, preventing its activation in the absence of cofactors or activators.

Other members have been recently added to the PKC superfamily based on homology within the catalytic domain. PKC or PKD is regulated by DAG and TPA through its C1 domain. However, PKD is distinguished by a PH domain, as well as by its unique substrate recognition and Golgi localization. The PKC-related kinases, or PRKs, lack a C1 domain and do not respond to DAG or phorbol esters. Instead, they can be activated by phosphatidylinositol lipids and their kinase activity is directly regulated by small GTPases of the Rho family through Rho binding to the homology region 1 (HR1).

The activity of PKC is under the control of three distinct phosphorylation events. Specifically, Thr500 in the activation loop, the Thr641 autophosphorylation site and the Ser660 hydrophobic site at the carboxy terminus of PKC β II are phosphorylated *in vivo* (2). For the atypical PKC isoforms, there is no phosphorylation in the hydrophobic region, which has a glutamic acid residue in place of the serine or threonine residue found in other PKC isoforms. The enzyme PDK1, or a close relative, is responsible for PKC activation.

Specificity/Sensitivity: All antibodies in this kit detect endogenous levels of total protein from their respective targets. All antibodies only recognize their specified isoform and do not cross-react with other PKC isoforms.

Source/Purification: Monoclonal antibody is produced by immunizing animals with a synthetic peptide corresponding to human PKC ζ and to residues surrounding Arg216 of human PKC δ protein. Polyclonal antibodies are produced by immunizing animals with synthetic peptides corresponding to the sequence of the human protein PKC α and mouse protein PKD (PKC μ). Antibodies are purified by protein A and peptide affinity chromatography.

Storage: Supplied in 10 mM sodium HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA and 50% glycerol. Store at -20°C. Do not aliquot the antibodies.

Recommended Antibody Dilutions:

Western blotting 1:1000

See www.cellsignal.com for individual component dilutions and additional application protocols.**Background References:**

- (1) Nishizuka, Y. (1984) *Nature* 308, 693-698.
- (2) Keranen, L.M. et al. (1995) *Curr Biol* 5, 1394-1403.
- (3) Newton, A.C. (1995) *J Biol Chem* 270, 28495-28498.
- (4) Mellor, H. and Parker, P.J. (1998) *Biochem J* 332 (Pt 2), 281-292.
- (5) Ron, D. and Kazanietz, M.G. (1999) *FASEB J* 13, 1658-1676.
- (6) Way, K.J. et al. (2000) *Trends Pharmacol Sci* 21, 181-187.
- (7) Moscat, J. and Diaz-Meco, M.T. (2000) *EMBO Rep* 1, 399-403.

© 2014 Cell Signaling Technology, Inc.
Cell Signaling Technology® is a trademark of Cell Signaling Technology, Inc.

Applications Key: W—Western IP—Immunoprecipitation IHC—Immunohistochemistry ChIP—Chromatin Immunoprecipitation IF—Immunofluorescence
Species Cross-Reactivity Key: H—human M—mouse R—rat Hm—hamster Mk—monkey Mi—mink C—chicken Om—D. melanogaster X—Xenopus Z—zebrafish B—bovine
Dg—dog Pg—pig Sc—S. cerevisiae Ce—C. elegans Hr—horse All—all species expected
Species enclosed in parentheses are predicted to react based on 100% homology.

U.S. Patent No. 5,675,063

Tweent[®]20 is a registered trademark of ICI Americas, Inc.

E-P—EUSA Peptide

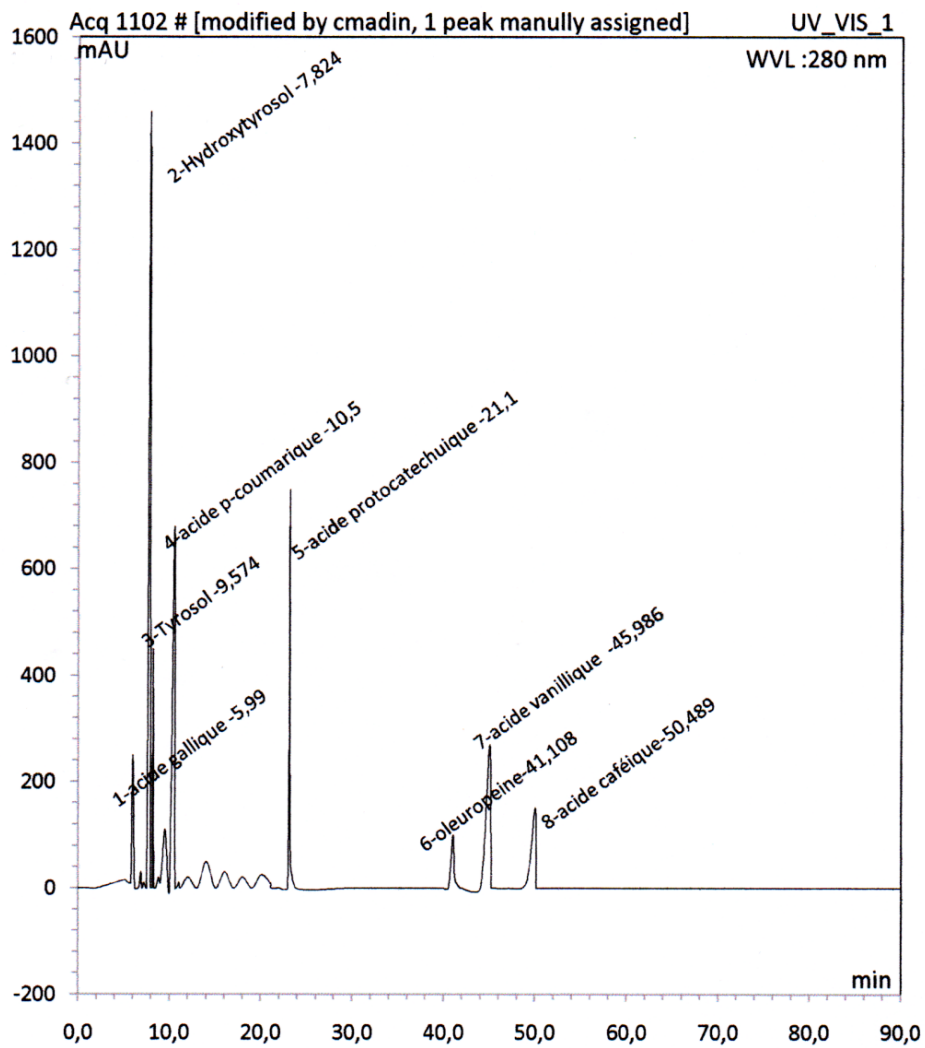
Annexe 13 :

Operator : cmadmin Timebase : UV6000 Sequence : acq1102

Page 1-1

12/02/2015 4:29 PM

Overlay of Samples from Integration View



Annexe : 14

I. Résultats de Résultats de l'analyse statistique de l'activité anti-oxydante avec le test de Tukey's comparaison multiples.

Tableau I : Résultats de l'analyse statistique du test du piégeage du radical DPPH avec le test de Tukey's comparaison multiples de la PM et de l'EPM et des différents standards utilisés.

Tukey's Multiple Comparison Test	MeanDiff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Acide gallique vs Acide caféique	-0,00667	0,133	No	ns	-0.244 to 0.231
Acide gallique vs PM	-0,0200	0,400	No	ns	-0.258 to 0.218
Acide gallique vs Acide ascorbique	-0,0733	1,47	No	ns	-0.311 to 0.164
Acide gallique vs Trolox	-0,180	3,60	No	ns	-0.418 to 0.0576
Acide gallique vs EPM	-1,31	26,3	Yes	***	-1.55 to -1.08
Acide caféique vs PM	-0,0133	0,267	No	ns	-0.251 to 0.224
Acide caféique vs Acide ascorbique	-0,0667	1,33	No	ns	-0.304 to 0.171
Acide caféique vs Trolox	-0,173	3,47	No	ns	-0.411 to 0.0642
Acide caféique vs EPM	-1,31	26,1	Yes	***	-1.54 to -1.07
PM vs Acide ascorbique	-0,0533	1,07	No	ns	-0.291 to 0.184
PM vs Trolox	-0,160	3,20	No	ns	-0.398 to 0.0776
PM vs EPM	-1,29	25,9	Yes	***	-1.53 to -1.06
Acide ascorbique vs Trolox	-0,107	2,13	No	ns	-0.344 to 0.131
Acide ascorbique vs EPM	-1,24	24,8	Yes	***	-1.48 to -1.00
Trolox vs EPM	-1,13	22,7	Yes	***	-1.37 to -0.896

Tableau II : Résultats de l'analyse statistique du test du pouvoir de réduction du Fer (PR) avec le test de Tukey's comparaison multiples de la PM et de l'EPM et des différents standards utilisés.

Tukey's Multiple Comparison Test	MeanDiff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Trolox vs PM	-2,667	1,364	No	ns	-11.52 to 6.191
Trolox vs Acide ascorbique	-25,41	12,99	Yes	***	-34.27 to -16.55
Trolox vs EPM	-34,67	17,73	Yes	***	-43.52 to -25.81
PM vs Acide ascorbique	-22,74	11,63	Yes	***	-31.60 to -13.89
PM vs EPM	-32,00	16,36	Yes	***	-40.86 to -23.14
Acide ascorbique vs EPM	-9,257	4,733	Yes	*	-18.11 to -0.3994

Tableau III: Résultats de l'analyse statistique du test de piégeage du radical ABTS⁺ avec le test de Tukey's comparaison multiples de la PM et de l'EPM et des différents standards utilisés.

Tukey's Multiple Comparison Test	MeanDiff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Acide ascorbique vs EPM	6,000	5,765	Yes	*	1.286 to 10.71
Acide ascorbique vs Trolox	24,00	23,06	Yes	***	19.29 to 28.71
Acide ascorbique vs PM	31,00	29,78	Yes	***	26.29 to 35.71
EPM vs Trolox	18,00	17,29	Yes	***	13.29 to 22.71
EPM vs PM	25,00	24,02	Yes	***	20.29 to 29.71
Trolox vs PM	7,000	6,725	Yes	**	a. 11.71

II. Résultats de Résultats de l'analyse statistique de l'activité anti-aflatoxinogène avec le test de Tukey's comparaison multiples.

Tableau I : Résultats de l'analyse statistique avec le test de Tukey's comparaison multiples de l'activité anti-aflatoxinogène de l'AFB1 en présence de la poudre de margines sur milieu SMKY.

Tukey's Multiple Comparison Test	MeanDiff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
0g/L vs 4g/L	23,53	7,713	Yes	**	9.331 to 37.72
0g/L vs 6g/L	71,89	23,57	Yes	***	57.70 to 86.09
0g/L vs 8g/L	133,6	43,79	Yes	***	119.4 to 147.8
0g/L vs 10g/L	133,6	43,79	Yes	***	119.4 to 147.8
4g/L vs 6g/L	48,37	15,86	Yes	***	34.17 to 62.56
4g/L vs 8g/L	110,0	36,07	Yes	***	95.84 to 124.2
4g/L vs 10g/L	110,0	36,07	Yes	***	95.84 to 124.2
6g/L vs 8g/L	61,67	20,22	Yes	***	47.47 to 75.86
6g/L vs 10g/L	61,67	20,22	Yes	***	47.47 to 75.86
8g/L vs 10g/L	0,0000	0,0000	No	ns	-14.20 to 14.20

Tableau II : Résultats de l'analyse statistique avec le test de Tukey's comparaison multiples de l'activité anti-aflatoxinogène de l'AFB1 en présence de l'extrait phénolique des margines sur milieu SMKY.

Tukey's Multiple Comparison Test	MeanDiff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
0mg/L vs 125mg/L	40,04	19,52	Yes	***	30.49 to 49.59
0mg/L vs 250mg/L	125,2	61,04	Yes	***	115.7 to 134.8
0mg/L vs 400mg/L	133,6	65,11	Yes	***	124.0 to 143.1
0mg/L vs 500mg/L	133,6	65,11	Yes	***	124.0 to 143.1
125mg/L vs 250mg/L	85,19	41,53	Yes	***	75.64 to 94.73
125mg/L vs 400mg/L	93,52	45,59	Yes	***	83.97 to 103.1
125mg/L vs 500mg/L	93,52	45,59	Yes	***	83.97 to 103.1

250mg/L vs 400mg/L	8,333	4,062	No	ns	-1.214 to 17.88
250mg/L vs 500mg/L	8,333	4,062	No	ns	-1.214 to 17.88
400mg/L vs 500mg/L	0,0000	0,0000	No	ns	-9.547 to 9.547

Tableau III : Résultats de l'analyse statistique avec le test de Tukey's comparaison multiples de l'activité anti-aflatoxinogène de l'AFB1 en présence de la poudre des margines sur le maïs broyé.

Tukey's Multiple Comparison Test	MeanDiff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
0g/kg vs 8g/kg	-159,6	61,53	Yes	ns	-171.7 to -147.6
0g/kg vs 12g/kg	230,6	88,89	Yes	***	218.5 to 242.7
0g/kg vs 16g/kg	354,1	136,5	Yes	***	342.0 to 366.2
0g/kg vs 20g/kg	360,4	138,9	Yes	***	348.3 to 372.4
8g/kg vs 12g/kg	390,2	150,4	Yes	***	378.2 to 402.3
8g/kg vs 16g/kg	513,8	198,0	Yes	***	501.7 to 525.8
8g/kg vs 20g/kg	520,0	200,4	Yes	***	507.9 to 532.1
12g/kg vs 16g/kg	123,5	47,61	Yes	***	111.4 to 135.6
12g/kg vs 20g/kg	129,8	50,02	Yes	***	117.7 to 141.8
16g/kg vs 20g/kg	6,250	2,409	No	ns	-5.824 to 18.32

Tableau IV : Résultats de l'analyse statistique avec le test de Tukey's comparaison multiples de l'activité anti-aflatoxinogène de l'AFB1 en présence de l'extrait phénolique des margines sur le maïs broyé.

Tukey's Multiple Comparison Test	MeanDiff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
0 mg/kg vs 250mg/kg	217,4	136,0	Yes	***	209.5 to 225.2
0 mg/kg vs 500mg/kg	353,4	221,1	Yes	***	345.5 to 361.2
0 mg/kg vs 800mg/kg	360,4	225,5	Yes	***	352.5 to 368.2
0 mg/kg vs 1000mg/kg	360,4	225,5	Yes	***	352.5 to 368.2
250mg/kg vs 500mg/kg	136,0	85,11	Yes	***	128.2 to 143.8
250mg/kg vs 800mg/kg	143,0	89,49	Yes	***	135.2 to 150.8
250mg/kg vs 1000mg/kg	143,0	89,49	Yes	***	135.2 to 150.8
500mg/kg vs 800mg/kg	7,000	4,381	No	ns	-0.8493 to 14.85
500mg/kg vs 1000mg/kg	7,000	4,381	No	ns	-0.8493 to 14.85
800mg/kg vs 1000mg/kg	0,0000	0,0000	No	ns	-7.849 to 7.849

**Liste des publications et
communications
scientifiques**

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Ce travail de thèse a été valorisé par les publications et les communications ci- après :

Publications :

- **SENANI-OULARBI N.**, RIBA A. and MOULTI-MATI F. (2018). Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production by olive mill wastewater. *Bioscience Research*, Vol 15 Issue 1.
- **SENANI-OULARBI N.**, MOULTI-MATI F., LETTERON PHILLIPPE., DUCROC R., EL BANNA J. and MARIE JC. (2017). Hypoglycemic effect of olive mill wastewater in mice involves the SGLT-1 transporter. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 9 Issue 1, 73-78.
- **SENANI-OULARBI N.**, EL BANNA D., MARIE JC. and MOULTI-MATI F. (2016). Preliminary effect of olive mill wastewater on the glucose absorption in mice. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, 2 (2), 2016.

Communications :

- **SENANI-OULARBI N.**, RIBA A. and MOULTI -MATI. (2017). Potentiel of polyphenols extract from olive mill wastewaters for protection of maize grains contaminated by aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. 4^{ème} congrès international de la biodiversité végétale. 5 et 8 octobre 2017. Marrakech.
- **SENANI NASSIMA** and MOULTI-MATI. (2015). Preliminary effect of olive mill wastewaters on glucose absorption in mice 1^{er} séminaire nationale sur la biodiversité, l'environnement et la sécurité alimentaire, Biosec 2015. 20 et 21 octobre, Boumerdes, Algérie.
- **SENANI NASSIMA** and MOULTI-MATI. (2013). Evaluation du pouvoir antifongique (inhibition de croissance et de la production d'aflatoxines) des extraits polyphénoliques issus des olives et sous produits de l'olivier (feuilles et margines) de la variété *Chamlal* (*Oléa europaea*) et de quelques composés phénolique (vanilline, acide caféique, acide gallique, oleuropéine et tannins) sur deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*» 19^{ème} journées nationales de microbiologie, Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie.
- **SENANI NASSIMA.**, RIBA AMAR. and MOULTI -MATI. (2012). Etude comparative des effets des extraits polyphénoliques issus de pulpes d'olives et sous produits de l'olivier (feuilles et margines) variété *chamlal* (*oléa europaea*) sur l'inhibition de croissance et de production d'aflatoxines de deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*.», XVIII^{èmes} Journées Nationales de Microbiologie, le 26 et 27 Novembre à Tizi-Ouzou, Université Mouloud Mammeri. Algérie.
- **SENANI NASSIMA** and MOULTI -MATI. (2011). Etude du pouvoir antifongique des extraits phénoliques issus des margines de la variété *chamlal* (*Oléa Europaea*) sur deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. VI^{ème} Congrès International QPE-TV: «Qualité des produits et de l'environnement : traitement, valorisation des rejets et effets sur la santé humaine », 08 -10 avril, Mahdia, Tunisie.

Articles



Available online freely at www.isisn.org

Bioscience Research

Print ISSN: 1811-9506 Online ISSN: 2218-3973

Journal by Innovative Scientific Information & Services Network



RESEARCH ARTICLE

BIOSCIENCE RESEARCH, 2018 15(1): 369-380.

OPEN ACCESS

Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production by olive mill wastewater

Nassima Senani-Oularbi^{1*}, Amar Riba² and Farida Moulti-Mati¹

¹ Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), Université M. Mammeri, BP N°17 RP, 15000 Tizi Ouzou, Algeria.

² Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, B.P. 92, 16050 Algiers, Algeria.

*Correspondence: senanibiochem@yahoo.fr Accepted: 28 Jan. 2018 Published online: 24 Mar. 2018

The study aimed to investigate the effect of crude olive mill wastewater (OMW) and phenolic extract from olive mill wastewater (PE) on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 (AFB1) production in SMKY broth medium and in maize powder. The SMKY medium and maize powder were supplemented with various concentrations of OMW and PE, inoculated with *A. flavus* and incubated at 28 °C for 7 days. The mycelia biomass (dry mycelium weight) and fungal colony diameter were determined in SMKY and maize powder, respectively. Aflatoxin B1 synthesis was quantified by direct competitive ELISA method and chemical compositions of PE were analyzed by HPLC. In SMKY medium, results showed that mycelia biomass was reduced to 50 % and 46.2 % with concentrations of 250 mg/L and 4 g/kg of the PE and OMW, respectively. Complete inhibition was obtained with 500 mg/L and 10 g/L of the PE and OMW, respectively. In maize powder, PE and OMW reduced the mycelial growth by more than 50 % with 800 mg/L and 16 g/kg, and complete inhibition was obtained at 1000 mg/kg and 20 g/kg, respectively. Aflatoxin B1 was totally inhibited in SMKY medium to with 400 mg/L and 8 g/L of PE and OMW, respectively, had been added. Results obtained in the present study indicate the possibility of exploiting PE and crude OMW in the control of aflatoxigenic *A. flavus* in stored foods products.

Keywords: *Aspergillus flavus*, aflatoxin B1, maize, olive mill wastewater, phenolic extract, direct competitive ELISA method.

INTRODUCTION

Fungi are significant destroyers of foodstuffs and grains during storage (Bryden, 2012). More than 25 % of the world's cereals are contaminated with mycotoxins (Richard, 2007). Of all the mycotoxins, aflatoxins (AFs), produced by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*, are of greatest concern in terms of incidence in food and feed and toxicity to humans and animals especially in countries with warm climate. Aflatoxin B1 (AFB1) is the most frequent and toxic, and is a powerful hepatotoxic, teratogenic and mutagenic compound. It was classified within class 1 of human carcinogens (IARC, 2012).

Because of their deleterious effect on human and animal health, and their importance in the international food trade, food contaminated with these toxigenic fungi has received worldwide attention. Numerous studies have been conducted to determine the effects of various food additives, preservatives, and chemical, and environmental condition to inhibit growth and mycotoxin production. Effective and efficient control of toxigenic fungi can be achieved by the use of synthetic chemical fungicides but the application of high concentrations of these synthetic chemicals in an attempt to control postharvest deterioration of food commodities increases the

risk of toxic residues remaining in the products (Kumar and Kalita, 2017). Effective strategies and tools are required to address the prevention, control, and suppression of aflatoxigenic fungi and AFs in food and feed.

Recently, there has been increasing interest in strategies for controlling phytopathogens with natural substances released by plants, namely allelochemicals (allelopathic compounds), rather than with chemical compounds (Khan et al., 2016). Thus, there are reasons to develop alternatives to conventional pesticides, alternatives that are of low environmental risk and present a lower risk of the development of pesticide resistance in the pathogen; a characteristic that will enhance the durability of agriculture and the environment. On the other hand, massive quantities of agro-industrial by-products are produced worldwide every day. A great proportion of these by-products could be used in beneficial ways as fertilizers or bio pesticides (Welzenbach et al., 2009). An example of agro-industrial by-product with high potential is olive mill wastewaters which are generated during olive oil extraction by the traditional milling and press processes (Zbakh and El-Abbassi, 2012). The antimicrobial and antifungal activity of the phenolic compounds they contain has also been reported (Lagrouh et al., 2017).

Maize is second only to wheat among world cereal crops for the quantity produced and is often invaded by *A. flavus* before harvest (Tola and Kebede, 2016). In order to evaluate *A. flavus* growth and AFB1 production, maize was experimentally contaminated with *A. flavus* and treated with phenolic extract from olive mill wastewater (PE) and with crude olive mill wastewater (OMW) from an olive tree of the *chemlal* variety, which is largely cultivated in Kabylia (Algeria).

MATERIALS AND

METHODS Sampling

Olive mill wastewater (OMW) came from discontinuous three phase olive processing in the village in Tizi-Ouzou, Kabylia region, the most important producer of olive oil from *chemlal* variety olive trees in Algeria. This sample was taken at the middle of the olive harvest season, fractioned, and kept at -40 °C. To study the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of crude OMW, samples were frozen and lyophilised for 24 h, and dehydrated for 6 h to obtain a powder.

Ten kg of maize grains (*Zea mays* L.) imported from Argentina and intended for human consumption were investigated in this study. A sample was collected in June 2015 from the market in Tizi-Ouzou, Algeria. The sample was fractioned (200 g) and stored at 4 °C until the analysis. The maize grains were checked for sterility and absence of AFB1.

Reagents and diagnostic kit

Ethyl acetate, hexane, methanol, and HPLC-grade solvents were purchased from Merck (Germany). All solvents were of analytical grade and used without further purification. Folin-Ciocalteu reagent was purchased from Sigma-Aldrich (France). Gallic acid, hydroxytyrosol, tyrosol, *p*-coumaric acid, protocatechuic acid, oleuropein, vanillic acid and caffeic acid standards were purchased from Sigma-Aldrich (France). Hydrochlorid acid and sodium carbonate were from the ICS Science group (France). The ELISA kit was a *Celer AFLA B1* (MA220/MA221; Tecna R & D-Diagnostics-Biotechnology, Italy). All other solvents and reagents were of analytical grade and were purchased from Merck, Germany.

Culture of fungus and medium

A toxigenic strain of *A. flavus* (NRRL 3251^T) was used for aflatoxin estimation. The strain, procured from the Biology of Microbial Systems Laboratory (LBSM, ENS Kouba), was stored in 20 % glycerol at -40 °C.

Physicochemical characteristics of OMW

The electrical conductivity (EC) and the pH of OMW were directly measured in the sample using a pH-meter. The OMW dry matter determined before and after drying the sample at 105 °C. Protein concentration was measured by Bradford method (1976) and the total lipid content was determined by the method of Knight et al.(1972). Total sugar content was measured according to the method of Dubois et al.(1956) and reducing sugars were measured by the DNS method (Miller, 1959). Analyses were carried out in triplicate, and the results are given as mean values ± SD.

Extraction of Phenolic compounds from OMW

Liquid-liquid extraction with ethyl acetate was carried out according to the method of De Marco et al.(2007). After acidification at pH 2 with HCl (4 N) and the lipid fraction was removed with hexane. The mixture (solvent-OMW) (10 mL, v/v) was shaken vigorously and centrifuged for 15 min

at 4000 g. The phases were separated, and the extraction was repeated three times in succession. All the runs were performed at ambient temperature (25 °C). The ethyl acetate was evaporated in a rotary evaporator at 40 °C. The dry residue was dissolved in 3 mL of methanol for the quantification and characterization of phenolic compounds. For the assessment of the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of PE, the sample was lyophilised after extraction and dehydrated for 5 h to obtain a powder.

HPLC separation and identification of phenolic compounds

The analysis was performed on a HPLC-UV system (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®) and UV detection was operating at 280 nm. The column used for polyphenol analysis was a reversed phase Hypurity, C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm. The solvent system used a gradient of solvent A (water: trifluoro acetic acid) (90:10, v/v) and solvent B (acetonitrile: methanol) (80:20, v/v).

The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 20 µL. The phenolic compounds were identified on the basis of their retention time in comparison with phenolic standards. The total phenolic compounds content of OMW extracts was determined using Folin–Ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965). The absorption at a wavelength of 750 nm was determined with a spectrophotometer. The data are expressed as gallic acid equivalents (g gallic acid/100g of OMW).

Effect of PE from OMW and crude OMW on mycelial growth

In SMKY broth medium

An aliquot of 25 mL of SMKY broth medium (200 g of sucrose; 0.5 g MgSO₄, 7H₂O; 0.3 g KNO₃ and 7 g yeast extract distilled water, 1000 mL; pH 5.6) was taken in a 100 mL conical flask. Amounts of PE (50, 125, 250, 400 and 500 mg/L) and OMW (2, 4, 6, 8, and 10 g/L) were added to medium. The flasks were aseptically inoculated with a 5.0 mm disc of 7 days old culture of aflatoxigenic *A. flavus* in PDA medium. The control sets comprise the medium without PE or OMW. The flasks were incubated for 7 days at 28 °C. Each control and treated condition was tested in triplicate. After incubation, the content of each flask was filtered through Whatman filter paper n°1. The mycelial dry weight (biomass) was measured after filtration and drying at 105 °C.

In maize powder

The initial humidity of the maize grains was 11.5 %. The grains were ground to powder in order to obtain a radial mycelial growth. The powder was autoclaved at 115 °C for 30 min. For all experiments, maize powder was hydrated to 30 % of humidity by the addition of sterile distilled water (Hesseltine, 1976). This moisture content was chosen because it allowed *A. flavus* to synthesise significant quantities of AFB1. Concentrations of PE (250, 500, 800 and 1000 mg/kg) and OMW (8, 12, 16 and 20 g/kg) were added to the sterile distilled water. The hydrated maize powder (15 g for each Petri dish) was inoculated with 100 µL of 10⁶ spores/mL of *A. flavus* (NRRL 3251^T). The Petri dishes were incubated at 28 °C for 7 days. The effect of PE and OMW was determined by measuring the fungal colony diameter using a centimeter scale, after 7 days of incubation.

Effect of PE from OMW and crude OMW on production of AFB1

In SMKY broth medium

The SMKY filtrate was extracted with 20 mL methanol in conical tubes. After incubation for 3 h at room temperature, methanolic extracts of each tube were centrifuged at 4000 g for 20 min (Nabney and Nesbitt, 1965). The extract was evaporated to dryness in a water bath at 50°C under vacuum. The residues were dissolved in 2 mL of methanol and were filtered through a 0,45 µm micro filter (Millex-HP Syringe Filter Unit, Millipore Corporation, USA) then analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC). Quantification of AFB1 was performed by direct competitive ELISA assay using a polyclonal antibody specific to AFB1 with a sensitivity of detection of 1 ppb.

In maize powder

AFB1 was extracted according to the *Celer AFLA B1* test kit directions. Briefly, the content of each contaminated plate (15 g) was mixed with 20 ml of methanol/water (70/30) and centrifuged at 4000 g for 20 min. The analysis methods were as described above (*In SMKY broth medium*).

Detection of aflatoxin B1 by TLC

The detection of AFB1 production by *A. flavus* was carried out on silica gel (60 plates 20 x 20 cm, Merck). The spotted plates were developed in chloroform: acetone (90:10, v/v) solvent system. Twenty-five microliters of each treatment and control was spotted on TLC plates and run for 45 min in a TLC tank. Plates were air dried and

observed under UV light (365 nm) for the presence and intensity of fluorescent spots (AOAC, 2005).

Direct competitive ELISA determination of aflatoxin B1

After the extraction and filtration, the sample was ready for determination of AFB1 following the *Celer AFLA B1* test kit directions. Briefly standard solutions used for making the calibration curve contained AFB1: 0, 1, 5, 20 and 40 ppb. The assay was performed in plastic microwells that had been coated with anti-aflatoxin antibody. In the premixing wells, the enzyme-labelled aflatoxin and the standard solutions, or the samples were mixed and then transferred into the anti-aflatoxin microtiter plate. Fifty microlitres of the standard/sample was dropped into wells and 100 μ L of (AFB1-HRP) was added to each premixing well and 100 μ L of the content of each premixing well was transferred immediately into the corresponding anti-aflatoxin B1 antibody coated microwell and incubated for 10 min at room temperature (25 $^{\circ}$ C). After incubation, the wells were emptied by inverting the micro plate and tapping it vigorously against the absorbent paper. It was washed 3 times with PBS- Tween (0.01 M). One hundred microliters of substrate (tetramethylbenzidine, TMB) was added to the wells and left in the dark for 5 min. The enzyme converted the colourless chromogen into a blue product. Addition of the stop reagent (50 μ L of 2 M sulfuric acid) led to a colour change from blue to yellow. The intensity of the colour was inversely proportional to the concentration of AFB1 in the sample or standard, which was measured at 450 nm by micro ELISA Reader (Biotek EL 311). The curve of optical density of the standards was plotted, and the optical densities of the samples were compared with the curve to calculate the concentration of AFB1.

STATISTICAL ANALYSIS

All the measurements were replicated three times for each treatment. Data were expressed as means \pm SD and were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Olive mill wastewater characterization

The physicochemical characteristics of the OMW sample used in these experiments are

given in (Table. 1).

Table 1: Physicochemical characteristics of olive mill wastewater used in these experiments

Parameters	Value
pH	4.8 \pm 0.00*
Dry matter (%)	11.85 \pm 1.50
Lipids (g/ 100g)	1.11 \pm 0.08
Total phenols (g/100g)	5.29 \pm 1.67
Total sugars (g/100g)	11.39 \pm 2.12
Reducing sugars (g/100g)	3.69 \pm 0.90
Total proteins (g/100g)	1.04 \pm 0.06

* Each value is the mean of three represented measurements \pm SD

The OMW was slightly acidic, having a pH of value at 4.8 \pm 0.00, and contain high levels of total sugar (11.39 \pm 2.12 g/100g of OMW) and phenolic compounds (5.29 \pm 1.67 g/100g of OMW). In contrast, the total protein concentration was extremely low (1.04 \pm 0.06 g/100g of OMW). The composition of OMW has been widely discussed in the literature. OMW is an acidic effluent, having pH values from 3 to 5 and generally composed of water (83 to 94%), organic matter (4 to 16%) and mineral salts (0.4 to 2.5%) (Eroğlu et al. 2004). Oils (1 to 14%), polysaccharides (13 to 53%) (Hamdi, 1992; Aggoun et al., 2016), proteins (8 to 16 %), organic acids (3 to 10 %), polyalcohols (3 to 10 %) and polyphenols (2 to 15 %) are listed as its main organic contents. Mineral salts of OMW are mainly carbonates (21 %), phosphates (14 %), potassium (47 %) and sodium (7 %) (Dermeche et al., 2013). Both the quality and quantity of OMW are highly variable and are affect by several factors such as: type of production process, type of olives, use of pesticides and fertilisers, area under cultivation, climatic conditions, and harvesting time (i.e. stage of olive maturity) (Eroğlu et al., 2009 ; El-Abbassi et al., 2017).

HPLC identification of phenolic compounds

The total phenolic content of PE from OMW measured by Folin Ciocalteu assay and calculated from the calibration curve ($R^2 = 0.998$), was 5.290 \pm 1.670 (g Gallic acid equivalent /100 g of OMW). Of the eight quantified phenolic compounds quantified, hydroxytyrosol was the most abundant with a proportion of (54.23% \pm 0.22) (Fig. 1 and Table. 2).

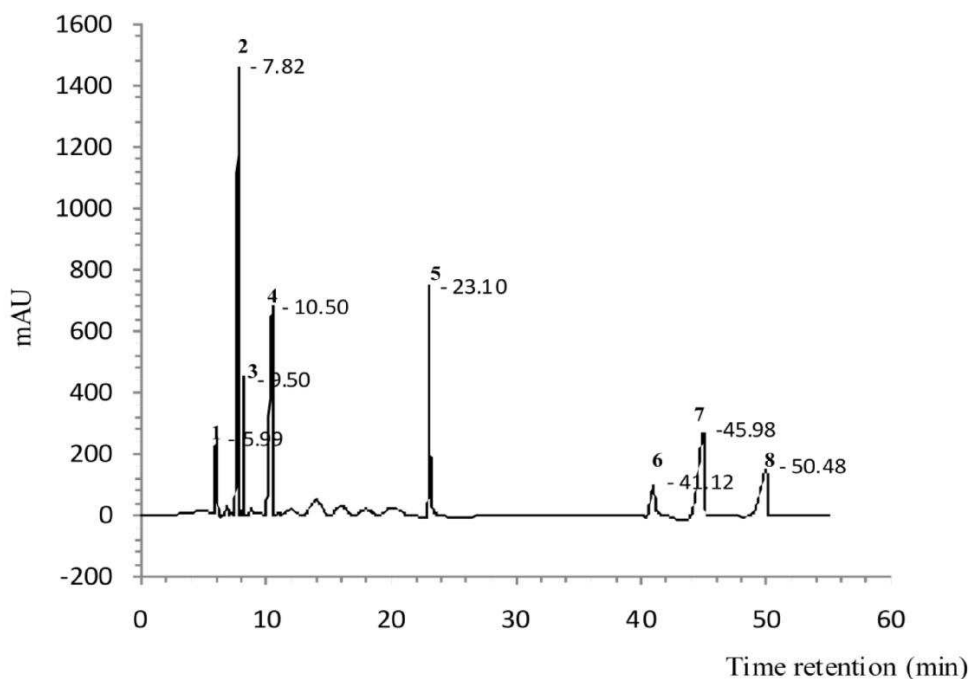


Figure. 1. HPLC chromatogram of the phenolic profile of OMW: (1) gallic acid, (2) hydroxytyrosol, (3) tyrosol, (4) *p*-coumaric acid, (5) protocatechuic acid, (6) oleuropein, (7) vanillic acid, (8) caffeic acid. Peak quantification was carried out at 280 nm. The main phenolic compounds were established by comparison with relative retention times of pure compounds.

Table 2: Retention time, concentration and relative abundance (%) of identified phenolic compounds of olive mill wastewater.

Phenolic compounds	Retention time (min)	Concentration (g of GAE*/100 g of OMW)	Proportion (%)
Gallic acid	5.99	0.337 ± 0.040	6.37 ± 0.22
Hydroxytyrosol	7.82	2.869 ± 0.012	54.23 ± 0.22
Tyrosol	9.50	0.253 ± 0.050	4.78 ± 0.39
<i>p</i> -coumaric acid	10.50	0.506 ± 0.010	9.56 ± 0.12
Protocatechuic acid	23.10	0.759 ± 0.044	14.35 ± 0.57
Oleuropein	41.12	0.046 ± 0.017	0.87 ± 0.36
Vanillic acid	45.98	0.084 ± 0.021	1.58 ± 0.10
Caffeic acid	50.48	0.064 ± 0.007	1.21 ± 0.12
Total phenols	/	5.290 ± 1.670	100

* GAE: gallic acid equivalent. Each value is the mean of three represented measurements ± SD.

Polyphenols are found in OMW at concentrations ranging from 0.63 to 5.45 g/100 g of OMW (Dermeche et al. 2013), depending on the processing system used for olive oil production. Phenolic compounds generally comprise a great number of organic substances that have the common characteristic of possessing an aromatic ring with one or more substitute hydroxyl group and a functional chain. The widespread classes of hydrophilic phenolic compounds identified and quantified in OMW include phenolic acids, phenolic alcohols, flavonoids, secoiridoids, and lignans. Up to now, more than 50 phenolic compounds have been identified in OMW (Caporaso et al. 2017). A group of polyphenols found in OMW is derived from cinnamic acid such as *p*-coumaric acid, caffeic acid, and ferulic acid. Another group of phenolic compounds present in OMW derives from benzoic acid: benzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, veratric acid, gallic acid, syringic acid and β -3,4-dihydroxyphenyl ethanol derivatives, such as tyrosol, hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol. In addition, OMW contains flavonoids, which are mainly represented by apigenin, luteolin, quercetin, and rutin together with secoiridoids (oleuropein). Of all olive polyphenols, hydroxytyrosol is considered as the major phenolic compound in OMW (El-Abbassi et al. 2017) and could make up as much as 70 % of the monocyclic phenolic compounds present in OMW. Hydroxytyrosol is probably generated from the hydrolysis of oleuropein by an esterase during the milling process. It has been an important focus of research since its discovery (Ragazzi and Veronese, 1973) and has been associated with a spectrum of interesting bioactivities (El-Abbassi et al. 2017).

Effect of PE from OMW and crude OMW on mycelia growth of *A. flavus*

A corresponding decrease in fungal mycelial growth in SMKY medium and maize powder with increasing concentration of PE and crude OMW was observed in the present study, after 7 days of incubation at 28 °C. The mycelia growth (biomass) was significantly reduced with increasing concentration of PE and OMW both in SMKY medium (Table. 3) and in maize powder (Table. 4). In SMKY medium, results showed that mycelia biomass inhibition by OMW was 30.8% with 2 g/L of OMW; 61.5% with 6 g/L ($P < 0.001$) and complete inhibition with 10 g/L. The PE

reduced 50% the fungal growth by 50 % and complete inhibition was obtained with 500 mg/L. In maize powder, PE and OMW reduced the mycelial growth by more than 50% when present at 800 mg/L and 16 g/kg, and complete inhibition was obtained at 1000 mg/kg and 20 g/kg, respectively.

Aflatoxin B1 inhibition detected by Thin Layer Chromatography

Aflatoxin B1 was inhibited by increasing concentrations of PE and crude OMW both in SMKY medium and maize powder. The AFB1 inhibition was demonstrated by the reduction of fluorescence intensity at 365 nm (Fig. 2). In SMKY medium, blue fluorescence intensity of AFB1 was clearly reduced with 4 and 6 g/L of OMW. The AFB1 was not detected at 8 and 10 mg/L. In presence of PE, the blue fluorescence intensity of AFB1 was reduced by half with 125 mg/L and at 400 mg/L and 500 mg/L AFB1 was not detected (Fig. 2a and Fig. 2b). The same results were observed in maize powder AFB1 blue fluorescence decreased with increasing concentration of OMW and PE (Fig. 2c and Fig. 2d).

Aflatoxin B1 analysis by Direct competitive ELISA

The effect of PE and OMW on AFB1 production, in SMKY medium and maize powder, was analyzed with direct competitive ELISA. The synthesis of AFB1 was inhibited by up to 90 % in SMKY medium and maize powder in the presence of PE at 250 mg/L and 500 mg/kg, respectively as shown in (Table. 5). PE at 500 mg/L and 1000 mg/kg was completely inhibited AFB1 synthesis in SMKY and maize powder, respectively ($P < 0.001$). The synthesis of AFB1 was inhibited up to 50 % in SMKY medium and maize powder in the presence of 6 g/L and 12 g/kg of OMW, respectively (Table. 6). OMW at 8 g/L, 10 g/L and 20 g/kg completely inhibited AFB1 synthesis in SMKY medium and maize powder, respectively ($P < 0.001$).

Crop protection technologies, which include herbicides, insecticides, fungicides and biotechnology products, help to control thousands of weed species, harmful insects and numerous plant diseases that affect crops. Many researchers have tried to take advantage from the phytotoxic and antimicrobial properties of OMW by using it in agriculture as bio pesticide for crop protection (Yangui et al., 2010; Larif et al., 2013; Esmail et al., 2015).

Table 3: Concentration effect of phenolic extract and crude olive mill wastewater on mycelia biomass (g) ± SD of *A. flavus* in SMKY medium, after 7 days of incubation at 28°C .

Treatment	Concentration	Mycelial Biomass (g) ± SD	Reduction percentage (%)
Phenolic Extract (PE) (mg/L)	0	0.26 ± 0.05*	0
	50	0.22 ± 0.01	15.4
	125	0.20 ± 0.01	23
	250	0.13 ± 0.00	50
	400	0.08 ± 0.00	69.2
	500	0.00 ± 0.00	100
Olive Mill Wastewater (OMW) (g/L)	0	0.26 ± 0.05*	0
	2	0.18 ± 0.03	30.8
	4	0.14 ± 0.02	46.2
	6	0.10 ± 0.01	61.5
	8	0.06 ± 0.01	76.9
	10	0.00 ± 0.00	100

*Each value is the mean of three represented measurements ± SD, Significantly different from control, $P < 0.05$.

Table 4 : Effect of phenolic extract and crude olive mill wastewater on mycelial growth of *A. flavus* in maize powder after 7 days of incubation.

Treatment	Concentration	Diameter (mm)	Inhibition (%)
Concentration of PE (mg/kg)	0	79 ± 0.88*	/
	250	79 ± 0.44	0
	500	65 ± 0.04	17.7
	800	38 ± 0.71	51
	1000	00 ± 00	100
Concentration of OMW (g/kg)	0	79 ± 0.88*	/
	8	80 ± 0.04	0
	12	67 ± 0.44	15.2
	16	39 ± 0.04	50.6
	20	00 ± 00	100

*Each value is the mean of three represented measurements ± SD, Significantly different from control, $P < 0.05$.

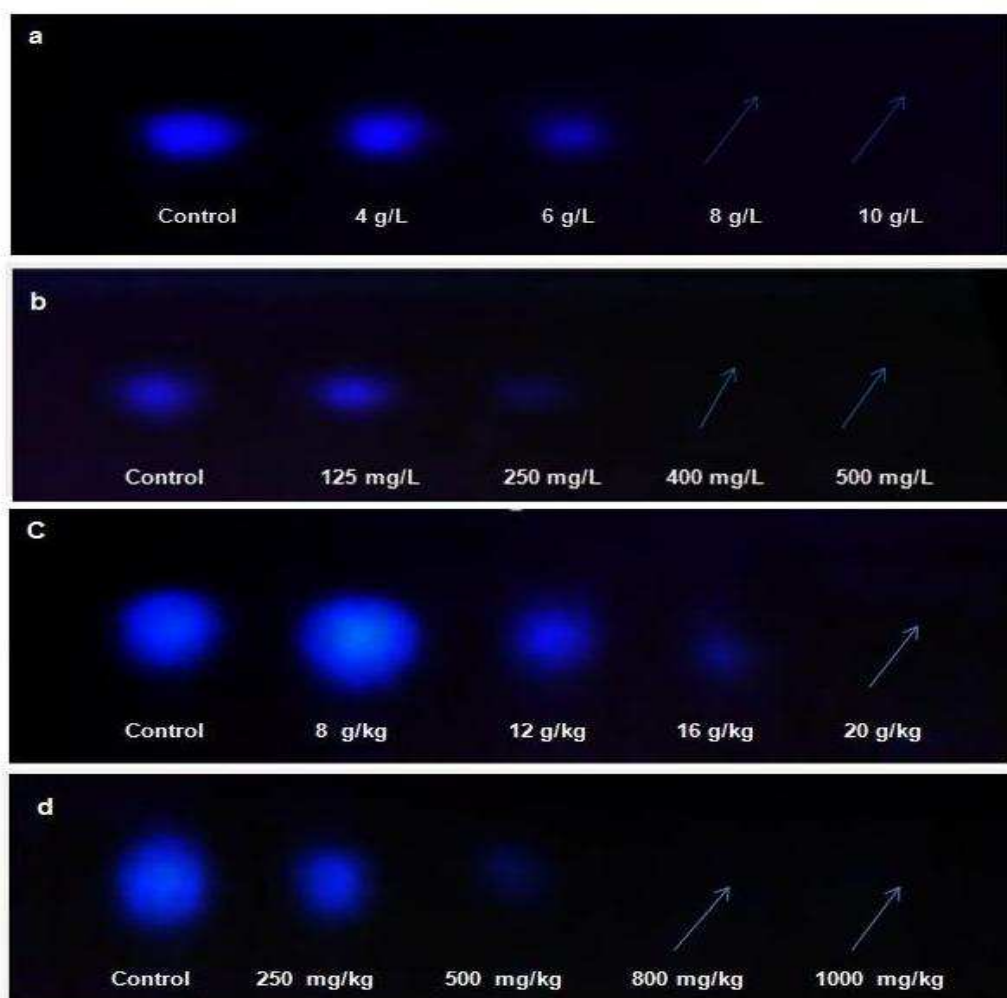


Figure. 2. TLC Chromatograms showing AFB1 inhibition by crude olive mill wastewater (OMW) and phenolic extract by OMW (PE) in SMKY medium (a, b) respectively and in maize powder (c, d) respectively after 7 days of incubation.

Table 5 : Percentage of AFB1 inhibition of *A. flavus* produced by different concentrations of phenolic extract in SMKY medium and maize powder by direct competitive ELISA after 7 days of incubation.

Treatment	Concentration	Amount of AFB1 (ppb)	Inhibition of AFB1 (%)
PE in SMKY medium (mg/L)	0	130.68 ± 0.46*	/
	125	90.56 ± 0.83	30.68
	250	8.00 ± 0.24	93.87
	400	0.00 ± 0.00	100
	500	0.00 ± 0.00	100
PE in maize powder (mg/kg)	0	360.01 ± 0.12*	/
	250	140.00 ± 0.45	61.11
	500	6.00 ± 0.40	98.33
	800	0.00 ± 0.00	100
	1000	0.00 ± 0.00	100

*Each value is the mean of three represented measurements ± SD. LOQ estimated for the method is 1 ppb for maize.

Table 6: Percentage of AF B1 inhibition of *A. flavus* produced by different concentrations of crude olive mill wastewater in SMKY medium and sterile maize powder by direct competitive ELISA after 7 days of incubation.

Treatment	Concentration	Amount of AFB1 (ppb)	Inhibition of AFB1 (%)
OMW in SMKY medium (g/L)	0	130.68 ± 0.46*	/
	4	110.10 ± 0.13	15.73
	6	60 ± 0.23	54.07
	8	0.00 ± 0.00	100
	10	0.00 ± 0.00	100
OMW in maize powder (g/kg)	0	360.01 ± 0.12*	/
	8	520 ± 1.13 ^{ns}	0
	12	130.26 ± 0.70	63.82
	16	6.75 ± 0.81	98.13
	20	0.00 ± 0.00	100

ns: not significant ($P > 0.05$)

*Each value is the mean of three represented measurements ± SD. LOQ estimated for the method is 1 ppb for maize.

The present work is the first investigation showing the protective effects of PE from OMW and of crude OMW against aflatoxigenic strain *A. flavus*. Significant reduction in mycelial growth and AFB1 synthesis was observed. Various essential oils have frequently been reported as inhibitors of aflatoxin production and mycelia growth of *Aspergillus* species in food commodities (Passone et al., 2013; Pandey et al., 2016). However, there is no significant literature available on the bio efficacy of PE and OMW on *A. flavus* growth and AFB1 production.

The biosynthesis of aflatoxins is strongly dependent on chemical and physical growth conditions, that is, substrate composition, temperature, pH, water activity and the particular combination of different parameters that can be completely inhibited or activated by the biosynthesis of these aflatoxins (Hahlbrock and Scheel, 1989). Moreover, the biosynthesis of aflatoxin is established by the conversion of acetate to norsolorinic acid (NOR) by synthases (FAS) and a polyketide synthase (NR-PKS, PksA) which are involved in the synthesis of the polyketide from a hexanoyl (the initial substrate for aflatoxin formation) (Crawford et al., 2008). Phenolics are secondary metabolites synthesized via the phenylpropanoid biosynthetic pathway. These compounds are building blocks for cell wall

structures, serving as a defence against pathogens (Hahlbrock and Scheel, 1989). These compounds not only inhibited AFB1 biosynthesis but also reduced production of norsolorinic acid (NOR) the first stable aflatoxin precursor (Ferreira et al., 2013). It is clear that phenolic compounds inhibited one or more early rather than late steps in the AFB biosynthesis pathway (Ferreira et al., 2013). Hitokoto et al., (1980), reported cases in which the formation of aflatoxins was prevented while the fungal colony growth was apparently normal, justifying the need to study both the potential to inhibit fungal growth and the potential to inhibit toxin production. The mechanism by which the latter inhibition occurs is not very clear. Aflatoxins are synthesized extra-mitochondrially from acetylcoenzyme A during a period of rapid glucose utilization (Hsieh and Mateles, 1970). According to Tatsadjieu et al., (2009), the essential oils of *L. rugosa* from Cameroon may restrict carbohydrate catabolism in *A. flavus* by acting on some key enzymes and this may result in the decrease of its ability to synthesise AFB1.

Also, the number and position of substitutions of the phenolic acids and the saturated side-chain length influenced the antimicrobial potential of the phenolic acids against the various microorganisms, but in different ways (Nazzaro et al., 2013). According to Farag et al., (1989) and Nychas (1995), the presence of phenolic OH

groups able to form hydrogen bonds with the active sites of target enzymes increased antimicrobial activity.

Mekki et al., (2009), reported that the phytotoxic and antimicrobial properties of OMW are associated with its phenolic compound composition. Some studies have demonstrated interesting bactericidal and fungicidal activities of OMW and especially of its phenolic monomers, such as hydroxytyrosol and tyrosol (Yangui et al., 2009). Hydroxytyrosol-rich OMW extracts have been shown to exhibit a powerful fungicidal activity against phytopathogens with a minimal inhibition concentration ranging between 7.18 and 57.4 mg/L (Yangui et al., 2010). *Verticillium wilt*, caused by *Verticillium dahliae* Kleb, is one of the most destructive plant diseases worldwide and it is a challenge for producers to find effective means of controlling it. Some researchers have suggested the incorporation of OMW into the soil as an eco-friendly alternative to fumigants for crop protection against *V. dahlia*. OMW curative control activity was demonstrated through a pot experiment on a tomato crop under field conditions (Yangui et al. 2011). This might be attributed to the direct effect of fungicidal compounds such hydroxytyrosol or an induction of defence response mechanisms in the plant. The experimental treatment of The soil inoculated with *Rhizoctonia solani* (6 g/kg d.w. of soil) by OMW obtained from a centrifugal olive mill in the area of Messinia, in South Greece, can also inhibit the growth of *Rhizoctonia solani* if applied at high doses (400 ml/kg d.w. of soil) (Kotsou et al. 2004), but no antifungal activity of OMW extracts by Mission and Frantoio olive fruit (Australia) was found against *Candida albicans* and *Aspergillus niger* at 5 mg/disc by disc diffusion method (Obied et al., 2007). However, filtered OMW application on fruits and vegetables infested with can inhibit the sporulation of *Botrytis* and *Penicillium spp* and also as the mycelium growth of the soil-borne pathogens *Fusarium oxysporum f. sp.* and *lycopersici* on tomato plants; in this experiment twenty one tomato seedlings were incubated in *Fusarium oxysporum f. sp.* and *lycopersici conidia* suspension (10^6 conidia/ ml) for 10 min and 21 were incubated in the conidial suspension treated with olive OMW (5 ml/100 ml in total solution) (Vagelas et al. 2009).

CONCLUSION

The results show that OMW and phenolic extract from OMW inhibits growth and the production of AFB1 *in vitro* (SMKY medium) and in maize

powder. The use of natural compounds like phenolic compounds with lower toxicity than that of synthetic products can be a good alternative for aflatoxin control and may be a possibility for protection against the production of AFB1 in corn. In addition, the therapeutic use of phenolic compounds may also provide a solution to the rapid development of fungal resistance to various prevalent antifungal therapeutics that is currently observed. These results, obtained justify future researches emphasizing the antifungal properties of the by-products of olive oil and their possible use as viable alternatives to control microbial growth in stored food commodities.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no financial or other conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Designed research: N. Oularbi-Senani, F. Moulti-Mati and A. Riba.

Performed research: N. Oularbi-Senani and F. Moulti-Mati.

Analyzed data: N. Oularbi-Senani and F. Moulti-Mati.

Writing, manuscript: N. Oularbi-Senani, F. Moulti-Mati and A. Riba.

Copyrights: © 2017 @ author (s).

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

REFERENCES

- Aggoun, M, Arhab, R, Cornu A , Portelli, J, Barkat, M, Graulet, B, 2016. Olive mill wastewater micro constituents composition according to olive variety and extraction process. Food Chem. 209: 72-80.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. Food Composition; Additives; Natural Contaminants. subchapter 1: Mycotoxins/subchapter 2 Aflatoxins.

- Official methods of analysis (17th ed), Vol. II. Chapter 49: 1-42. Washington.
- Bryden, WL, 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol* 173: 134-158.
- Bradford, MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Caporaso, N, Diego, F, Genovese, A, 2017. Use of phenolic compounds from olive mill wastewater as valuable ingredients for functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1-13. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1343797>
- Crawford, JM, Thomas PM, Scheerer, JR, Vagstad, AL, Kelleher, NL, Townsend, CA, 2008. Deconstruction of iterative multi domain polyketide synthase function. *Science* 320: 243-246.
- De Marco, E, Savarese, M, Antonello, P, Sacchi, R, 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem* 104: 858-867.
- Dermeche, S, Nadour, M, Larroche, C, Moulati, F, Michaud, P, 2013. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem* 48: 1532-1552.
- Dubois, M, Gilles, KA, Hamilton, JK, Rebers, PA, Smith, F, 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- El-Abbassi, A, Saadaoui, N, Kiai H, Raiti, J, Hafidi, A, 2017. Potential applications of olive mill wastewater as biopesticide for crops protection. *Sci Total Environ* 576: 10-21.
- Eroğlu, E, Gündüz, U, Yücel, M, Türker, L, Eroğlu, I, 2004. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *Int J Hydrog Energy* 29: 163-171.
- Eroğlu, E, Eroğlu, I, Gündüz, U, Yücel, M, 2009. Comparison of the physicochemical characteristics and photo fermentative hydrogen production potential of wastewaters produced from different olive-oil mills in Western-Anatolia, Turkey. *Biomass Bioenergy* 33: 706-711.
- Esmail, A, Chahboun, N, Mennane, Z, Amiyare, R, Abed, H, Barrahi, M, Qebibo, A, Ouhsine, M, Berny, EH, 2015. Étude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis- à-vis de souches pathogènes. *J Mater Environ Sci* 6 (3): 869-876.
- Farag, RS, Daw, ZY, Abo-Raya, SH, 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J Food Sci* 54: 74-76.
- Ferreira, FD, Kemmelmeier, C, Arrotéia, CC, Costa, CL, Mallmann, CA, Janeiro, V, Dias Ferreira, FM, Mossini, SAG, Silva, EL, Machinski, M, 2013. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa L.* and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chem* 136: 789-793.
- Hahlbrock, K, Scheel, D, 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 347-369.
- Hamdi, M, 1992. Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Appl Biochem Biotechnol* 37: 155-163.
- Hesseltine, CW, 1976. Conditions Leading to Mycotoxin Contamination of Foods and Feeds. In: *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*. J. V. Rodricks (ed). Pp. 1-22. *Advances in Chemistry*, American Chemical Society, Washington.
- Hitokoto, H, Morozumi, S, Wauke, T, Sakai, S, Kurata, H, 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 39: 818-822.
- Hsieh, DPH, Mateles, RI, 1970. The relative contribution of acetate and glucose to aflatoxin biosynthesis. *Biochem Biophys Acta* 208: 482-486.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2012. Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 100F: 225-244. IARC, Lyon, France.
- Khan, MA, Afridi, RA, Hashim, S, Khattak, AM, Ahmad, Z, Wahid, F, Chauhan, BS, 2016. Integrated effect of allelochemicals and herbicides on weed suppression and soil microbial activity in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Crop Prot* 90: 34-39.
- Knight, JA, Shauna, A, James, MR, 1972. Chemical Basis of the Sulfo-phospho-vanillin Reaction for estimating total serum lipids. *Clin Chem* 18: 199-202.
- Kotsou, M, Mari, I, Lasaridi, K, Chatzipavlidis, I,

- Balis, C, Kyriacou, A, 2004. The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Appl Soil Ecol* 26: 113-121.
- Kumar, D, Kalita, P, 2017. Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. *Foods* 6(1): 8.
- Lagrouh, F, Dakka, N, Bakri, Y, 2017. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *J Mycol Med*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.04.008>.
- Larif, M, Zarrouk, A, Soulaymani, A, Elmidaoui, A, 2013. New innovation in order to recover the polyphenols of olive mill wastewater extracts for use as a biopesticide against the *Euphyllura olivina* and *Aphis citricola*. *Res Chem Intermed* 39: 4303-4313.
- Lykas, C, Vagelas, I, Gougoulas, N, 2014. Effect of olive mill wastewater on growth and bulb production of tulip plants infected by bulb diseases. *Span J Agric Res* 12: 233.
- Mekki, A, Dhouib, A, Sayadi, S, 2009. Evolution of several soil properties following amendment with olive mill wastewater. *Prog Nat Sci* 19: 1515-1521.
- Miller, GL, 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 31: 426-428.
- Nazzaro, F, Fratianni, F, De Martino, L, Coppola, R, De Feo, V, 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)* 6(12): 1451-1474.
- Nychas, GJE, 1995. Natural antimicrobial from plants. In *New Methods of Food Preservations* ed. Gould GW. pp. 58-89. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional.
- Obied, HK, Bedgood, DR, Prenzler, PD, Robards, K, 2007. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chem Toxicol* 45: 1238-1248.
- Passone, MA, Girardi, NS, Etcheverry, M, 2012. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *Int J Food Microbiol* 159: 198-206.
- Passone, MA, Girardi, NS, Etcheverry, M, 2013. Antifungal and anti aflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. *LWT- Food Sci Technol* 53: 434-444.
- Pandey, AK, Sonker, N, Singh, P, 2016. Efficacy of some essential oils against *Aspergillus flavus* with special reference to *Lippia alba* oil an inhibitor of fungal proliferation and aflatoxin B₁ production in green Gram seeds during storage. *J Food Sci* 81(4): 928-934. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13254>.
- Ragazzi, E, Veronese, G, 1973. Quantitative analysis of phenolic compounds after thin layer chromatographic separation. *J Chromatogr A* 77: 369-375.
- Richard, JL, 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses. An overview. *Int J Food Microbiol* 119: 3-10.
- Tatsadjieu, NL, Jazet, Dongmo, PM, Ngassoum, MB, Etoa, F-X, Mbofung, CMF, 2009. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control* 20: 161-166.
- Tola M and Kebede B, 2016. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food Agric* 2: 1191103.
- Singleton, VL, Rossi, JA, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
- Welzenbach, K, Gagnon, SR, Makuch, J, 2009. Use of Industrial Byproducts in Agriculture (Report). Water Quality Information Center, National Agricultural Library, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Beltsville, Maryland USA.
- Yangui, T, Sayadi, S, Gargoubi, A, Dhouib, A, 2010. Fungicidal effect of hydroxytyrosol rich preparations from olive mill wastewater against *Verticillium dahliae*. *Crop Prot* 29: 1208-1213.
- Yangui, T, Sayadi, S, Chakroun, H, Dhouib, A, 2011. Effect of hydroxytyrosol-rich preparations on phenolic-linked antioxidant activity of seeds. *Eng Life Sci* 11: 511-516.
- Zbakh, H, El Abbassi, A, 2012. Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review. *J Funct Foods* 4: 53-65.