

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

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Magister

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée aux Bio-Industries



THEME :

Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété *Chamlal* : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation.

Proposé par : Pr MOULTI-MATI Farida.

Présenté par : M^{elle} KEBBAB Ryma.

Soutenu le 13/10/2014.

Devant le jury composé de :

| | | | |
|-----------------------|-------------------------|-------|------------|
| Dr Houali Karim | Maître de Conférences A | UMMTO | Président |
| Dr Moulti-Mati Farida | Professeur | UMMTO | Rapporteur |
| Dr Moussaoui Ramdane | Maître de Conférences A | UMMTO | Examineur |
| Dr Amrouche Tahar | Maître de Conférences A | UMMTO | Examineur |
| Dr Bourbia Sofia | Maître de Conférences B | UMMTO | Examineur |

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université de Tizi-Ouzou.

En premier lieu, je remercie Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Abderrahmane MATI, directeur du laboratoire (LABAB), pour m'y avoir accueillie durant la réalisation de ce travail et m'avoir permis de le mener dans de bonnes conditions.

Je réserve une attention toute particulière à Madame Farida MATI, Professeur de biochimie à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, ma directrice de mémoire. Qu'elle trouve ici l'expression de ma très vive reconnaissance pour sa disponibilité, son aide, ses conseils, ainsi qu'à ses qualités relationnelles et humaines.

Je tiens à remercier également Monsieur Karim HOUALI, Maître de Conférences A à la Faculté des Sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou qui a accepté de présider le jury, c'est un honneur pour moi de le voir siéger parmi les membres de jury de ce mémoire.

Un remerciement spécial et sincère à Madame Fatma HACID qui, sans sa collaboration et son aide, je n'aurais pu surmonter bon nombre de difficultés dans mon travail, elle a su me prodiguer à tout instant, conseil et encouragement tant au niveau scientifique qu'amical.

Je voudrais exprimer ma gratitude aux examinateurs de ce mémoire qu'ils m'ont fait l'honneur en acceptant d'examiner ce travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance à toutes les personnes du laboratoire LABAB en particulier: Souad, Amel, Samia CHABI, Samia Bedouhene, Djamilia et Djouza pour leur aide et leur soutien.

Dédicaces

A mes très chers parents

*Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte.
Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements.
Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation.
Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !*

A mon mari M^r MASSIM A.

Pour ses encouragements, son dévouement, et son appui à toutes mes entreprises.

A mes très chères sœurs et mes chers frères.

Pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

Farida,

Merci d'être toujours là pour moi, merci de m'avoir supportée, tu me redonne toujours confiance en moi. Que dieu te bénisse, te donne la force et le courage.

A mes chers neveux et nièces.

A la mémoire de ma grand-mère qui aurait été si fière de moi aujourd'hui.

A ma belle famille.

A mes amies et collègues.

Ryma.

Sommaire

SOMMAIRE

| | |
|-----------------------------------|--|
| Liste des abréviations | |
| Index des figures et des tableaux | |
| Résumé | |
| Abstract | |

PARTIE I : SYNTHÈSE DES DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

| | |
|---|-----------|
| Introduction générale..... | 01 |
| I. COMPOSES PHENOLIQUES | 03 |
| 1.1.Généralités..... | 03 |
| 1.2.Diversité structurale et sources alimentaires | 04 |
| 1.2.1. Classification des structures phénoliques | 04 |
| 1.2.1.1.Les formes les plus simples | 05 |
| 1.2.1.2. Les formes condensées | 11 |
| 1.2.2. Principales sources alimentaires..... | 14 |
| 1.3.Biosynthèse des composés phénoliques..... | 16 |
| 1.4. Rôles et fonctions biologiques..... | 18 |
| II. CARACTERISATION DES MARGINES | 20 |
| 2.1. Présentation des margines | 19 |
| 2.2. Caractéristiques physicochimiques des margines | 19 |
| 2.3. Composition des margines..... | 20 |
| 2.3.1. Fraction minérale | 20 |
| 2.3.2. Fraction organique..... | 21 |
| 2.4. Métabolisme des composés phénoliques des margines | 26 |
| 2.5. Valorisation des margines | 27 |
| III. LES COMPOSES PHENOLIQUES GLYCOSYLES..... | 28 |
| 3.1. Introduction | 28 |
| 3.2. Rôles de la glycosylation des polyphénols..... | 28 |
| 3.3. Méthodes d'étude des polyphénols glycosylés..... | 28 |
| 3.3.1. Hydrolyse acide..... | 28 |
| 3.3.2. Hydrolyse alcaline..... | 29 |
| 3.3.3. Séparation des aglycones..... | 29 |
| IV. METHODES DE SEPARATION ET TECHNIQUES D'ANALYSE DES POLYPHENOLS | 30 |
| • Chromatographie liquide à haute performance | 30 |
| • Spectrométrie de masse..... | 30 |
| • Résonance magnétique nucléaire | 30 |
| V. ACTIVITE ANTI-OXYDANTE DES POLYPHENOLS | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1. Stress oxydant | 30 |
| 5.2. Mécanismes d'action des radicaux libres | 30 |
| 5.3. Mécanismes d'action de l'anti-oxydant | 31 |
| 5.4. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-oxydante..... | 33 |
| 5.5. Relation structure-fonction des polyphénols..... | 33 |
| PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE..... | 38 |
| I. Matériels et méthodes..... | 38 |
| 1.1. Matériels..... | 38 |
| 1.1.1. Matériel végétal | 38 |
| 1.1.2. Appareillage | 39 |
| 1.1.3. Réactifs et produits chimiques | 39 |
| 1.2. Méthodes | 40 |
| 1.2.1. Préparation des extraits phénoliques | 40 |
| 1.2.1.1. Méthodes d'extraction des polyphénols à partir des margines brutes..... | 40 |
| 1.2.1.1.1. Extraction des polyphénols totaux à l'acétate d'éthyle..... | 40 |
| 1.2.1.1.2. Extraction des polyphénols avec trois solvants à polarité croissante | 42 |
| 1.2.2. Méthodes de traitements hydrolytiques | 44 |
| 1.2.2.1. Hydrolyse à l'acide chlorhydrique..... | 44 |
| -Hydrolyse des liaisons hétérosidiques des composés phénolques avec HCl 2N | 44 |
| -Hydrolyse acide de volumes égaux de margines et de HCl 6N | 47 |
| 1.2.2.2. Hydrolyse alcaline suivie d'hydrolyse acide | 49 |
| 1.2.3. Caractérisation quantitative et qualitative des extraits phénoliques | 50 |
| 1.2.3.1. Analyse quantitative..... | 50 |
| 1.2.3.1.1. Détermination de la matière sèche totale | 50 |
| 1.2.3.1.2. Dosage des composés phénoliques par colorimétrie..... | 50 |
| 1.2.3.1.3. Dosage des flavonoïdes totaux..... | 52 |
| 1.2.3.1.4. Dosage des tanins totaux..... | 53 |
| 1.2.3.1.5. Dosage des sucres totaux..... | 53 |
| 1.2.3.2. Analyse qualitative des extraits méthanoliques..... | 53 |
| 1.2.3.2.1. Mise en évidence de la présence des tanins par le test de FeCl ₃ | |
| 1.2.3.2.2. Recherche des anthocyanes..... | 54 |
| 1.2.3.2.3. Caractérisation par chromatographie sur couche mince des extraits obtenus avant et après déglycosylation | 55 |
| 1.2.3.3. Etude de l'activité anti-oxydante | 57 |
| 1.2.3.3.1. Test du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium : Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power) | 57 |
| 1.2.3.3.2. Capacité de piégeage d'espèces radicalaires | 58 |
| 1.2.3.4. Analyse statistique | 60 |

| | |
|--|-----|
| II. Résultats et discussion | 61 |
| 2.1. Résultats de l'analyse quantitative..... | 61 |
| 2.1.1. Matières sèches totales | 61 |
| 2.1.2. Choix de la méthode d'hydrolyse | 61 |
| 2.1.3. Quantification des polyphénols totaux..... | 63 |
| 2.1.4. Quantification des flavonoïdes totaux..... | 67 |
| 2.1.5. Quantification des sucres totaux | 68 |
| 2.1.6. Quantification des tanins totaux..... | 69 |
| -Extraits issus de l'hydrolyse avec HCl 2N | 72 |
| -Extraits issus de l'hydrolyse avec HCl 6N | 75 |
| -Extraits issus des margines après hydrolyse alcaline suivie d'une hydrolyse acide .. | 77 |
| 2.2. Résultats des analyses qualitatives..... | 81 |
| 2.2.1. Analyse des extraits obtenus avant et après déglycosylation par CCM. | 81 |
| 2.2.1.1.Choix des margines brutes..... | 81 |
| 2.2.1.2. Analyse qualitative des extraits obtenus avant et après hydrolyse acide (en milieu HCl 2N)..... | 83 |
| 2.2.1.3. Analyse qualitative des extraits obtenus après hydrolyse acide et hydrolyse alcaline..... | 88 |
| 2.2.1.4. Séparation par CCM des acides phénoliques extraits à partir des margines avant et après déglycosylation | 91 |
| 2.2.2. Mise en évidence de la présence des tanins dans les extraits méthanoliques... | 93 |
| 2.2.3. Recherche des anthocyanes | 93 |
| 2.3. Evaluation de l'activité antioxydante avant et après déglycosylation..... | 94 |
| 2.3.1. Etude du potentiel réducteur sur ferrocyanure de potassium des polyphénols extraits par différents solvants avant et après traitements par hydrolyse chimique (acide et alcaline) | 94 |
| 2.3.2. Evaluation du pouvoir anti-oxydant (test au DPPH)..... | 99 |
| 🚩 Discussion générale | 110 |
| Conclusion..... | 116 |

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

AAO : Activité anti-oxydante.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

ARP : Puissance anti-oxydante.

AVC : Accident vasculaire cérébral.

CCM : chromatographie sur couche mince.

CoA : coenzyme A.

CP : composés phénoliques.

CPG: Chromatographie en phase gazeuse.

CPM : Composés phénoliques des margines.

DPPH : 1,1-diphényl -2-picryl-hydrazyl.

EAG : Equivalent en acide gallique.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

FT : flavonoides totaux.

HPLC: <<High performance liquid chromatography>>: Chromatographie liquide à haute pression.

IC50 : concentration inhibitrice à 50%.

MB : margines brutes.

MD : margines délipidées.

PPT: polyphénols totaux.

R_f : Rapport frontal.

UV : Ultra-violet.

INDEX DES FIGURES

| N° | Intitulés | pages |
|-----------|--|-----------|
| 01 | Les principaux acides phénoliques et quelques-uns de leurs dérivés simples. | 6 |
| 02 | Structure générale des flavonoïdes. | 7 |
| 03 | Les principales classes de flavonoïdes. | 8 |
| 04 | Quelques structures d'anthocyanosides. | 11 |
| 05 | Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B). | 12 |
| 06 | Représentation de la liaison catéchique existant entre les unités de tanins catéchiques. | 13 |
| 07 | Structure des lignines. | 14 |
| 08 | Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des polyphénols végétaux. | 17 |
| 09 | Piégeage des EOR par les flavonoïdes. | 32 |
| 10 | Valeurs de TEAC indiquant l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison C2-C3. | 35 |
| 11 | Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et flavanones. | 36 |
| 12 | Éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes. | 37 |
| 13 | Olives noires (matures) de la variété <i>Chamlal</i> . | 38 |
| 14 | Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des margines. | 41 |
| 15 | Protocole de fractionnement des polyphénols contenus dans les margines par trois solvants organiques. | 43 |
| 16 | Protocole d'extraction des polyphénols totaux suite à une hydrolyse acide (HCl 2N). | 46 |
| 17 | Protocole expérimental d'extraction de polyphénols totaux issus d'un traitement d'hydrolyse chimique ménagée utilisant l'acide chlorhydrique 6N. | 48 |
| 18 | Protocole d'extraction des acides phénoliques. | 49 |
| 19 | Etapas de dosage des polyphénols. | 51 |
| 20 | Dosage des flavonoïdes totaux. | 52 |
| 21 | Mise en évidence de la présence de tanins dans un extrait phénoliques. | 54 |
| 22 | Recherche des anthocyanes dans un extrait végétal. | 54 |
| 23 | Structure de DPPH· (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH. | 58 |
| 24 | Optimisation d'une méthode d'hydrolyse acide par des concentrations différentes de HCl. L'hydrolyse se fait dans une solution contenant des volumes égaux d'échantillon de margines et de HCl (Volume/Volume). | 62 |
| 25 | Optimisation de la méthode d'hydrolyse acide (volumes égaux d'échantillon et de HCl) à 100°C. | 63 |
| 26 | Courbe d'étalonnage à l'acide gallique | 64 |
| 27 | Quantité de ppt extraits par différents solvants organiques à partir des margines brutes et délipidées, avant hydrolyse. | 66 |
| 28 | Courbe étalon à la quercétine ayant servi à quantifier les flavonoïdes totaux. | 67 |
| 29 | Courbe d'étalonnage au D-glucose pour le dosage des sucres totaux. | 68 |
| 30 | Histogrammes représentant les taux de composés dosés dans les extraits phénoliques issus des margines avant les hydrolyses. | 70 |
| 31 | Représentation graphique des flavonoïdes en pourcentages (%) par rapport à la fraction phénolique totale pour chaque extrait obtenu avant traitement d'hydrolyse. | 71 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 32 | Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en sucres totaux après hydrolyse acide (HCl 2N). | 73 |
| 33 | Histogramme des fractions flavoniques issus de l'hydrolyse acide à l'HCl 2N. | 74 |
| 34 | Résultats de la quantification des polyphénols, des flavonoïdes et des sucres totaux des extraits issus de l'hydrolyse à l'HCl 6N. | 76 |
| 35 | Pourcentages que représentent les flavonoïdes dans les extraits issus de l'hydrolyse acide à l'HCl 6N. | 76 |
| 36 | Résultats des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des sucres totaux après hydrolyse alcaline suivie d'hydrolyse acide. | 78 |
| 37 | Fractions flavoniques en pourcentages obtenus par différents solvants après hydrolyse alcaline suivie d'hydrolyse acide. | 79 |
| 38 | Quantité des polyphénols totaux après différentes hydrolyses chimiques effectuées acide et/ou alcaline. | 80 |
| 39 | Profils chromatographiques des extraits méthanoliques des polyphénols issus des margines brutes, centrifugées et filtrées. | 82 |
| 40 | Profil chromatographique des extraits phénoliques obtenus avant et après traitement à l'HCl 2N. | 84 |
| 41 | Profil chromatographique des extraits obtenus avant et après hydrolyse acide (HCl 6N) et alcaline. | 88 |
| 42 | Profil chromatographique des extraits obtenus avant et après hydrolyse acide (séparation des acides phénoliques). | 91 |
| 43 | Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium des étalons. | 94 |
| 44 | Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques issus des margines brutes obtenus par différents solvants. | 95 |
| 45 | Pouvoir réducteur des extraits phénoliques issus d'une hydrolyse à HCl 2N. | 96 |
| 46 | Pouvoir réducteur sur ferrocyanure de potassium des quatre extraits issus de l'hydrolyse à HCl 6N. | 96 |
| 47 | Pouvoir réducteur sur ferrocyanure de potassium des extraits obtenus après hydrolyse alcaline suivie de l'hydrolyse acide. | 97 |
| 48 | L'activité antioxydante de la rutine et de la quercétine. | 100 |
| 49 | Courbe de régression de l'activité antioxydante de la quercétine. | 101 |
| 50 | Courbe de régression de l'activité antioxydante de la rutine. | 101 |
| 51 | Activité antioxydante des polyphénols extraits des margines brutes par différents solvants organiques. | 102 |
| 52 | Activité anti-DPPH des polyphénols des extraits méthanoliques obtenus suite à l'hydrolyse acide (HCl 2N). | 102 |
| 53 | Activité anti-DPPH des extraits phénoliques obtenus après hydrolyse avec HCl 6N. | 103 |
| 54 | Activité antioxydante des extraits phénoliques obtenus suite à l'hydrolyse alcaline suivie de l'hydrolyse acide. | 103 |
| 55 | Courbe de régression de l'activité antioxydante de l'acide gallique. | 104 |
| 56 | Les valeurs d'IC50 des polyphénols extraits par différents solvants à partir des margines ainsi que celles des étalons. | 104 |
| 57 | Valeurs des IC50 des polyphénols extraits après hydrolyse avec HCl 2N. | 105 |
| 58 | Valeurs des IC50 des polyphénols extraits par différents solvants après traitement avec HCl 6N. | 105 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 59 | Valeurs des IC50 des polyphénols extraits par différents solvants après traitement alcalin suivi d'une hydrolyse acide. | 106 |
|-----------|---|------------|

INDEX DES TABLEAUX

| N° | Intitulés | Pages |
|--------------|---|-----------|
| I | Les principales classes des composés phénoliques. | 4 |
| II | Tableau récapitulatif des principales sources alimentaires des polyphénols. | 15 |
| III | Activités biologiques de quelques composés phénoliques. | 19 |
| IV | Principaux éléments minéraux rencontrés dans les margines. | 21 |
| V | Les principaux composés phénoliques retrouvés dans les margines selon (VISIOLI <i>et al</i> , 1999). | 23 |
| VI | Les principaux composés phénoliques des margines. | 24 |
| VII | Teneur de quelques composés phénoliques identifiés dans les margines. | 25 |
| VIII | Phénols totaux, ortho-diphénol et monomères aromatiques contenus dans les margines. | 25 |
| IX | Les principaux composés phénoliques polymériques retrouvés dans les margines. | 26 |
| X | Méthodes les plus couramment utilisées pour estimer le pouvoir antioxydant. | 33 |
| XI | Tableau regroupant l'appareillage utilisé lors de l'expérimentation. | 39 |
| XII | Résultats des matières sèches totales. | 61 |
| XIII | Tableau récapitulatif des résultats de dosages spectrophotométriques effectués sur les extraits des margines brutes et délipidées. | 69 |
| XIV | Teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en sucres totaux extraits après traitement avec HCl 2N. | 72 |
| XV | Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en sucres totaux obtenus après traitement avec HCl 6N. | 75 |
| XVI | Résultats des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des sucres totaux après hydrolyse alcaline suivie de l'hydrolyse acide. | 77 |
| XVII | Rapports frontaux (Rf) des spots des extraits phénoliques issus des margines brutes et des témoins dans le système : Chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique : 50/40/10, v/v/v). | 86 |
| XVIII | Rapports frontaux (Rf) des composés phénoliques extraits avant et après traitement avec HCl 2N ainsi que ceux des étalons séparés dans le système de solvants (Chloroforme/Acétate d'éthyle/Acide formique (v/v/v) : 50/40/10). | 87 |
| XIX | Rapports frontaux (Rf) des composés phénoliques extraits à partir des margines après hydrolyses avec HCl 6N et alcaline séparés par CCM dans le système de solvants (Chloroforme/Acétate d'éthyle/Acide formique (v/v/v): 50/40/10). | 90 |
| XX | Rapports frontaux des composés phénoliques séparés par CCM des extraits obtenus avant et après traitements acide et alcalin et ceux des étalons utilisés dans le système de solvants (chloroforme/méthanol/acide formique (v/v/v): 85/15/01). | 92 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| XXI | Concentrations des extraits obtenus avant et après déglycosylation donnant après réduction du ferrocyanure de potassium une densité optique de 0,5. | 98 |
| XXII | Valeurs des IC50 des polyphénols extraits des margines avant et après déglycosylation. | 107 |

LISTE DES ANNEXES

Annexe 01: Structures chimiques des tanins.

Annexe 02 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes.

Annexe 03 : Extraction de l'huile d'olive par le système de presse traditionnel.

Annexe 04 : Procédés d'obtention d'huile d'olive.

Annexe 05 : Composition minérale des margines.

Annexe 06: Composition phénolique des margines étudiées par D'ANNIBALE *et al.* (2000).

Annexe 07 : Profil chromatographique de l'extrait phénolique des margines brutes (ACHAK *et al.*, 2009).

Annexe 08 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant.

Annexe 09 : Extraction liquide-liquide (par solvants organiques).

Annexe 10 : Préparation des solutions

Annexe 11 : Chromatographie sur couche mince.

Annexe 12 : Résultats de la mise en évidence de la présence des tanins dans les extraits méthanoliques obtenus avant et après déglycosylation.

Annexe 13 : Groupes homogènes.

Annexe 14 : Structures chimiques des polyphénols identifiés dans les fruits, les feuilles et les huiles d'olive classées par ordre alphabétique.

Résumé :

L'industrie oléicole produit principalement l'huile d'olive et engendre deux résidus : l'un solide (les grignons) et l'autre liquide (les margines). Ce dernier est caractérisé par sa richesse en matière organique représentée essentiellement par les composés phénoliques (CP). Ces derniers sont, par excellence, des inhibiteurs de l'oxydation par piégeage des radicaux libres, identifiés comme des antioxydants naturels. Dans ce contexte, cette présente étude a pour objectifs d'étudier l'activité antioxydante des polyphénols présents dans les margines de la variété *chamlal* par le biais de divers tests ainsi que le rôle que joueraient les sucres liés aux CP. Les CP sont extraits par différents solvants organiques (acétate d'éthyle, éther diéthylique et *n*-butanol). Les formes glycosylées ont subi des traitements par hydrolyse acide à différentes concentrations de HCl destinés à rompre les liaisons simples et alcalins afin d'hydrolyser les esters.

Les propriétés antioxydantes des formes hétérosidiques et aglycones, ont été évaluées, avant et après déglycosylation par le test au DPPH et la réduction du Ferrocyanure de potassium.

Le taux de CP est remarquablement plus élevé après déglycosylation prouvant ainsi leur libération de toute combinaison antérieure, puisque la quantité de l'extrait étheré, butanolique et d'acétate d'éthyle avant traitement est respectivement de $(3,64 \pm 0,58)$, $(12,60 \pm 0,26)$ et $(5,22 \pm 0,69)$ mg/g de matières sèches totales et s'élève après hydrolyse chimique acide à $(35,70 \pm 0,23)$, $(45,60 \pm 0,79)$ et $(39,50 \pm 0,50)$. Les résultats de l'évaluation de l'activité des extraits obtenus à partir des margines avant et après traitements chimique de déglycosylation sont soumis à une analyse statistique. Les fractions, extraites après traitement en milieu HCl 2N, contenant un taux plus élevé en sucres sont celles qui présentent statistiquement une meilleure activité anti-radicalaire et un meilleur pouvoir réducteur comparativement aux extraits qui contiennent des CP moins glycosylés. Par contre, l'extrait étheré, contenant les formes aglycones, obtenu après hydrolyse à HCl 6N, est statistiquement ($P < 0,001$) plus actif que les autres extraits (butanoliques et d'acétate d'éthyle).

De plus, le temps d'exposition des molécules phénoliques à l'HCl est différent, faisant ainsi apparaître des différences au niveau de l'activité des extraits qui en découlent. Ceci pourrait être du à la nature des composés libérés des réactions qui présentent statistiquement des différences très hautement significatives et aux mécanismes mêmes des réactions qui présenteraient des différences.

Nous retenons de notre étude que les méthodes mises au point pour la déglycosylation sont fiables à un certain degré et libèrent chacune des produits spécifiques selon le mécanisme d'action du réactif hydrolytique. Certaines méthodes d'hydrolyse semblent libérer des aglycones qui présentent une meilleure activité par rapport à celle des formes glycosylées ; d'autres au contraire libèrent en plus des aglycones, des formes glycosylées ayant échappé à l'hydrolyse et présentent une meilleure activité. Il semblerait que les sucres dans certains cas contribueraient à la potentialisation de la capacité antioxydante lorsque leurs fonctions réductrices sont libres. Au vue de l'activité anti-oxydante importante de certaines formes des CP (aglycones et glycosylées), il serait intéressant d'envisager de les incorporer dans des produits aussi bien à visée alimentaire, pharmaceutique qu'en cosmétologie permettant ainsi d'augmenter leur conservation.

Mots clés : Margines/Polyphénols/Déglycosylation/Activité anti-oxydante/DPPH/Pouvoir réducteur.

Abstract

Olive-growing industry produces mainly the olive oil and generates two residues: one solid (olive pomace) and the other liquids (olive mill wastewater). This last is characterized by its high content in organic matter represented primarily by the phenolic compounds (CP). The latter are mostly the inhibitors of oxidation by trapping the free radicals, identified like natural antioxidants. In this context, this present work aims to study the antioxidant activity of polyphenols present in the margins of the *Chamlal* variety by the means of various tests as well as the part which sugars related to the CP would play. The CP are extracted by various organic solvents (ethyl acetate, diethyl ether and N-butanol). The glycosyl forms underwent treatments of acid hydrolysis to various concentrations of HCl intended to break the simple and alkaline connections in order to hydrolyze esters. The antioxidant properties of the heterosidic forms and aglycones, were evaluated, before and after deglycosylation by the test with the DPPH and the reduction of the potassium Ferrocyanide. The rate of CP is remarkably higher after deglycosylation thus proving their release of any combination the former, since quantity of the ether extract , butanolic and of ethyl acetate before treatment is respectively of $(3,64 \pm 0,58)$, $(12,60 \pm 0,26)$ and $(5,22 \pm 0,69)$ mg/g of total dry matters and rises after acid chemical hydrolysis with $(35,70 \pm 0,23)$, $(45,60 \pm 0,79)$ and $(39,50 \pm 0,50)$. The results of the activity evaluation of the extracts obtained starting from the margins before and after chemical treatments of deglycosylation are subjected to a statistical analysis. The fractions, extracted after treatment in a medium HCl 2N, containing a higher sugar rate are those which statistically present a better anti-radicalizing activity and a better reduction compared to the extracts which contain glycosyl CP. On the other hand, the ether extract, containing the aglycon forms , obtained after hydrolysis with HCl 6N, is statistically ($P < 0,001$) more active than the other extracts (butanolic and of ethyl acetate).

Moreover, the duration of the phenolic molecules to HCl is different, thus revealing differences on the level of the activity of the extracts which result from this. This could be due to the nature of the released compounds of the reactions which present statistically differences very highly significant and with the same mechanisms of the reactions which would present differences. We retain from our study that the methods developed at the point for the deglycosylation are reliable with a certain degree and release each specific product according to the mechanism of action of the hydrolytic reagent. Certain methods of hydrolysis seem to release the aglycons which present a better activity compared to that of the glycosyl forms; others on the contrary release in addition to the aglycons, the glycosyl forms which escaped from the hydrolysis and present a better activity. It would seem that sugars in certain cases would contribute to the potentiation of the antioxidant capacity when their reducing functions are free. Thus, due to the important antioxidant activity of these glycosyl forms of CP and aglycon ones, it would be interesting to plan in incorporating them in products of various uses in food, pharmaceutical and in cosmetology industries thus making it possible to increase their conservation.

Key-words: Olive Mill Wastewaters/Polyphenols/Deglycosylation/Antioxidant Activity/DPPH/Reducing Power.



Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Durant ces dernières années une recrudescence d'intérêt est à remarquer concernant les effets biologiques des antioxydants naturels inclus dans la lutte contre le stress oxydatif généré par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (molécules pro-oxydantes très réactives causant des endommagements cellulaires graves). Celles-ci sont impliquées dans le vieillissement et dans le déclenchement et la progression de plusieurs maladies telles que le cancer, l'athérosclérose, les accidents cardiovasculaires (AVC), l'ostéoporose, les maladies inflammatoires et les maladies neurodégénératives...etc. Dans ce contexte, de nombreuses recherches scientifiques faites sur les composés bioactifs notamment sur les polyphénols (PP) qui agissent contre les ERO, ont aboutit à leur utilisation dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (PIETTA *et al*, 2000).

En plus de sa production principale (huile d'olive) l'industrie oléicole génère deux résidus, l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons). Les margines sont rejetées soit dans des cours d'eau, soit épandues sur le sol. Ces effluents, fortement chargés en matières organiques, affectent la qualité des eaux dans lesquelles elles sont déversées constituant ainsi un déchet polluant qui mérite d'être valorisé au vu de ses constituants, notamment en composés phénoliques. Ces derniers également ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Ils sont omniprésents dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (TSIMOGIANNINS et OREOPOULOU, 2006). Ils ont une très grande importance biologique et technologique. Considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, ils peuvent participer dans les processus photosynthétiques (MUKOHATA *et al*, 1978), dans la régulation de gènes et dans le métabolisme de croissance (HAVSTEEN, 2002).

La valorisation des sous produits oléicoles est une des thématiques développées au Laboratoire de Biochimie Analytique et biotechnologies (LABAB) au vu de l'importance de la culture de l'olivier et des industries oléicoles dans la région de Kabylie. Dans ce cadre plusieurs travaux ont aboutit à montrer l'importance des PP aussi bien de par leur quantité dans les sous produits oléicoles que de par l'importance de leurs propriétés biologiques. En effet, les PP présentent de multiples intérêts qui peuvent être exploités dans divers domaines comme le secteur agro-alimentaire et/ou celui de la santé. Ces propriétés reposent sur leur activité anti-oxydante et anti-microbienne (SENANI et MOULTI-MATI, 2012). Les PP sont par excellence des inhibiteurs de l'oxydation par piégeage des radicaux libres, ils s'illustrent par leur action protectrice vis-à-vis des érythrocytes sanguins que nous avons démontré au niveau du laboratoire due à leur activité anti-oxydante (NADOUR *et al*, 2012) d'autres chercheurs ont permis de mettre en relief d'autres propriétés comme leur activité anti-cancérogène, la réduction de la formation de molécules pro-inflammatoires ; la prévention des maladies cardiovasculaires suite à leur action hypocholestérolémiantes par réduction de dépôt de LDL dans les parois artérielles (RODRIGO *et al*, 2011).

Introduction générale

Dans ce contexte, cette thématique a pour objectifs d'étudier l'activité anti-oxydante des polyphénols présents dans les margines par le biais de divers tests comme le DPPH.

Dans un premier temps le travail sera principalement axé sur les PP totaux extraits de margines brutes. Dans un deuxième temps, ces polyphénols vont être déglycosylés selon des procédures mises au point. Les polyphénols aglycones seront évalués pour leur activité anti-oxydante.

Pour répondre aux objectifs fixés à ce travail, nous l'avons mené comme suit :

-Une synthèse bibliographique actuelle portant :

- sur quelques aspects concernant les polyphénols retrouvés dans la nature en général et dans les margines (classification, biosynthèse notamment comment sont ajoutés les sucres lors de leur formation, activités biologiques...)

- et sur la caractérisation des margines (rejet de l'industrie oléicole).

-Au niveau expérimental, il s'agit de mettre au point :

- l'extraction des polyphénols totaux à partir des margines brutes ;
- les traitements hydrolytiques chimiques acide et/ou basique destinés à rompre les liaisons glycosidiques ;
- la quantification des polyphénols, des flavonoïdes et des sucres totaux par des méthodes spectrophotométriques ;
- l'analyse qualitative des différents extraits obtenus après les traitements chimiques par chromatographie sur couche mince (CCM) ;
- et enfin, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits avant et après déglycosylation par deux méthodes (test au DPPH et test du pouvoir réducteur sur ferrocyanure de potassium) puis comparer les différences qui en découlent.

I-COMPOSES PHENOLIQUES :

1.1 Généralités :

Les composés phénoliques (CP), sont des molécules du métabolisme secondaire spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (BRUNETON, 1999). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (TAO et LAMBERT, 2014). Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être libres ou engagées (KÜHNAU 1976 ; MOMPON *et al*, 1998 ; ROBARDS *et al*, 1999 ; PIETTA *et al*, 2000 ; ROBARDS, 2003 ; HENNEBELLE *et al*, 2004), avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...). La désignation « polyphénols » est fréquemment utilisée dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, elle devrait être réservée aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale « composés phénoliques » concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques.

Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement (ROBARDS *et al*, 1999 ; GRESELE *et al*, 2011).

Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt. A l'heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont largement montrées que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme. Chez les végétaux, ils sont soumis à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, ce qui témoigne d'une dynamique biochimique incontestable. Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers. D'où l'importance croissante des études consacrées à ces composés.

1-2 Diversité structurale et source alimentaire

Le ou les cycles aromatiques des polyphénols sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate (BRUNETON, 1999). La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine synthétique et elle augmente souvent avec la participation simultanée du shikimate et de l'acétate conduisant à l'élaboration de composés mixtes (flavonoïdes, stilbènes, xanthones, etc.). Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés dans les plantes et dans les aliments d'origine végétale (HABAUZIT et HORCAJADA, 2008) (tableau I).

1-2-1. Classification des structures phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de classes (HARBORNE, 1990 ; MANCHEIX *et al*, 2006) (tableau I) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications 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) (MANCHEIX *et al*, 2006). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (HARBORNE, 1990 ; CROZIER *et al*, 2006).

Tableau I : Les principales classes des composés phénoliques (HARBORNE, 1989 ; MANCHEIX *et al*, 2006 ; CROZIER *et al*, 2006).

| Squelette carboné | Classe | Exemple | Origine (exemples) |
|--|---------------------------|---|---|
| C ₆ | Phénols simples | Catéchol | Nombreuses espèces |
| C ₆ -C ₁ | Acides hydroxybenzoïques | p-Hydroxybenzoïque | Epices, fraise |
| C ₆ -C ₃ | Acides hydroxycinnamiques | Acide caféique, Acide férulique | Pomme de terre, pomme |
| | Coumarines | Scopolétine | Citrus |
| C ₆ -C ₄ | Naphtoquinones | Juglone | Noix |
| C ₆ -C ₂ -C ₆ | Stilbènes | Resvératrol | Vigne |
| C ₆ -C ₃ -C ₆ | Flavonoïdes | Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélagonidine Catéchine, épicatechine Naringénine | Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus |
| | Isoflavonoïdes | Daidzéine | Soja, pois |
| (C ₆ -C ₂) ₂ | Lignanés | Pinorésinol | Pin |
| (C ₆ -C ₃) _n | Lignines | | Bois, noyau des fruits |
| (C ₁₅) | Tannins | | Raisin rouge, kaki |

1-2-1-1. Les formes les plus simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C₆ (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C₁₅ et à des molécules proches. Sauf exceptions, ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole (HABAUZIT et HORCAJADA, 2008).

- **Acides phénoliques**

Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (LAFAY et GIL-IZQUIERDO, 2008).

- **Les acides hydroxybenzoïques**

Ils sont les dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁ (figure 01). Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tanins (GRESELE *et al*, 2011). L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondant à ces acides, comme la vanilline, sont utilisés dans le secteur pharmaceutique (BRUNETON, 1993 ; LAFAY et GILIZQUIERDO, 2008).

- **Acides hydroxycinnamiques et dérivés**

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont l'acide *p*-coumarique (et ses isomères les acides *o*-et *m*-coumariques) et les acides caféique, férulique et sinapique (figure 01). L'ensemble est souvent rapporté sous le vocable commun de «phénylpropanoïdes». Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters (avec le glucose, l'acide quinique, l'acide tartrique...) ou de glycosides (LAFAY et GIL-IZQUIERDO, 2008 ; BONDIA-PONS *et al*, 2009).

Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide caféique a une répartition quasi-universelle chez les végétaux où il est souvent présent sous forme d'acide chlorogénique (ester 5-caféoylquinique) (figure 01), par exemple dans la pomme ou le café, et de ses isomères (ester 3 et 4-caféoylquiniques). On le retrouve également sous forme d'acide caféoyltartrique (=acide caftarique) dans le raisin, d'acide caféoylshikimique dans la datte, d'acide caféoylmalique dans le radis, de caféoylglucose, de caféoylputrescine (BENDINI *et al*, 2007).

Les coumarines (figure 01) dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale et certaines formes complexes, les aflatoxines, peuvent être des contaminants très dangereux de denrées alimentaires (BENDINI *et al*, 2007).

• **Stilbènes :**

Les membres de cette famille possèdent la structure C₆-C₂-C₆, comme les flavonoïdes avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para. Ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (CROZIER *et al*, 2006). Ils sont synthétisés à partir de dérivés d'acides cinnamiques dont la substitution déterminera celle du cycle B et ainsi la molécule elle-même (MACHEIX *et al*, 2006). Ils sont présents dans la plante sous forme de monomères, dimères, trimères ou polymères. La molécule la plus courante et la plus étudiée est le resvératrol (3,5,4'- trihydroxystilbène) qui existe sous forme *cis* ou *trans*. Cependant, la forme *trans* est majoritaire. Les sources principales de stilbènes sont citées dans le tableau II.

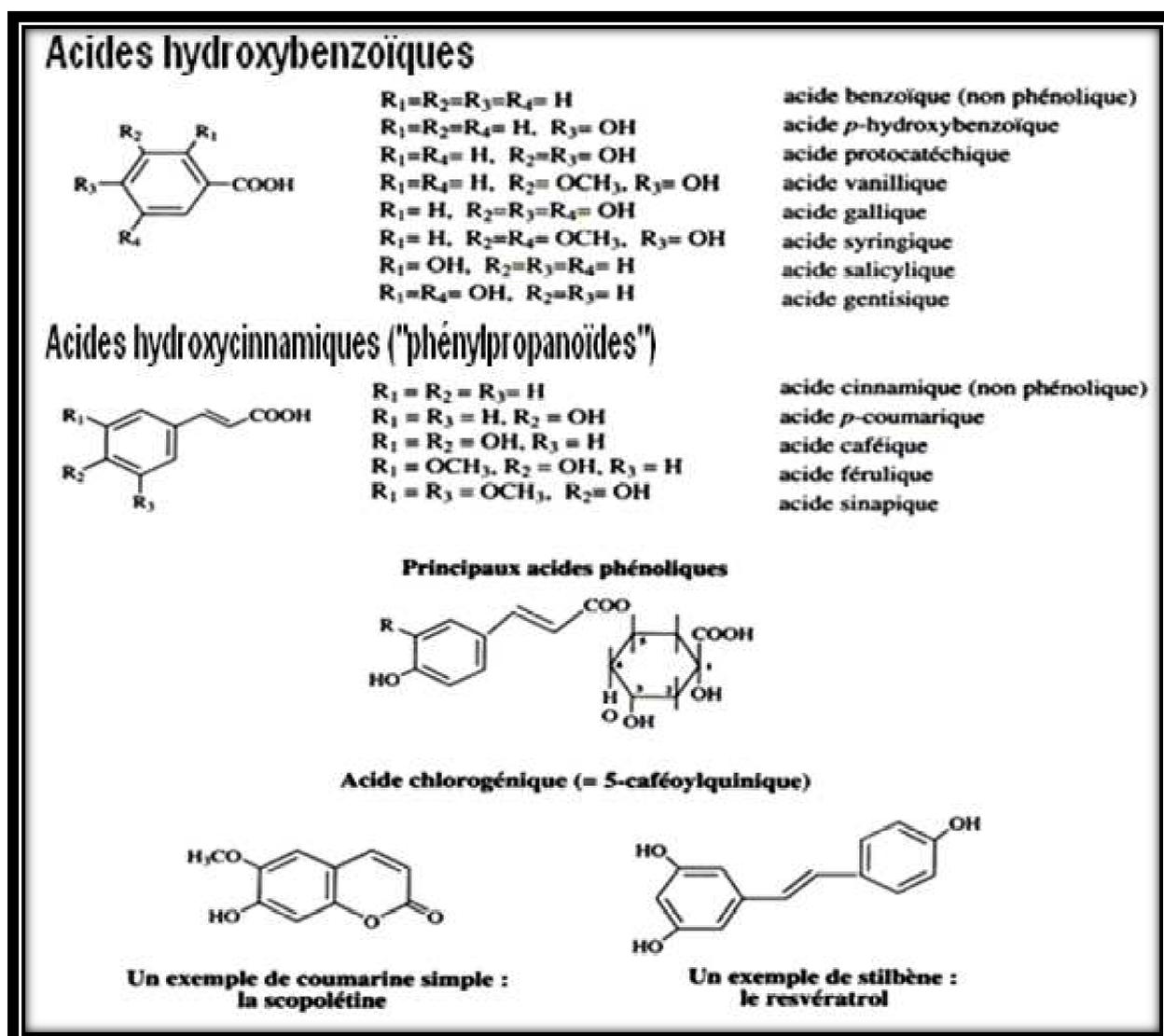


Figure 01 : Les principaux acides phénoliques et quelques-uns de leurs dérivés simples.

- **Ensemble des flavonoïdes**

De structure générale en C_{15} ($C_6-C_3-C_6$), c'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Il comprend à lui seul plus de 6000 molécules regroupées en sous-classes (RIBEREAU-GAYON, 1968 ; ANDERSEN et MARKHAM, 2006 ; MACHEIX et al, 2006). La structure de base commune à ce groupe de polyphénols, est le diphenylpropane : c'est la présence de deux cycles aromatiques (A et B) liés par une chaîne de 3 carbones, formant un hétérocycle oxygéné (C) (YAO et al, 2004 ; MACHEIX et al. 2006 ; YAO et al, 2010) (figure 02). Il reste des milliers d'autres composés à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (BEECHER, 2003 ; GRESELE et al., 2011).

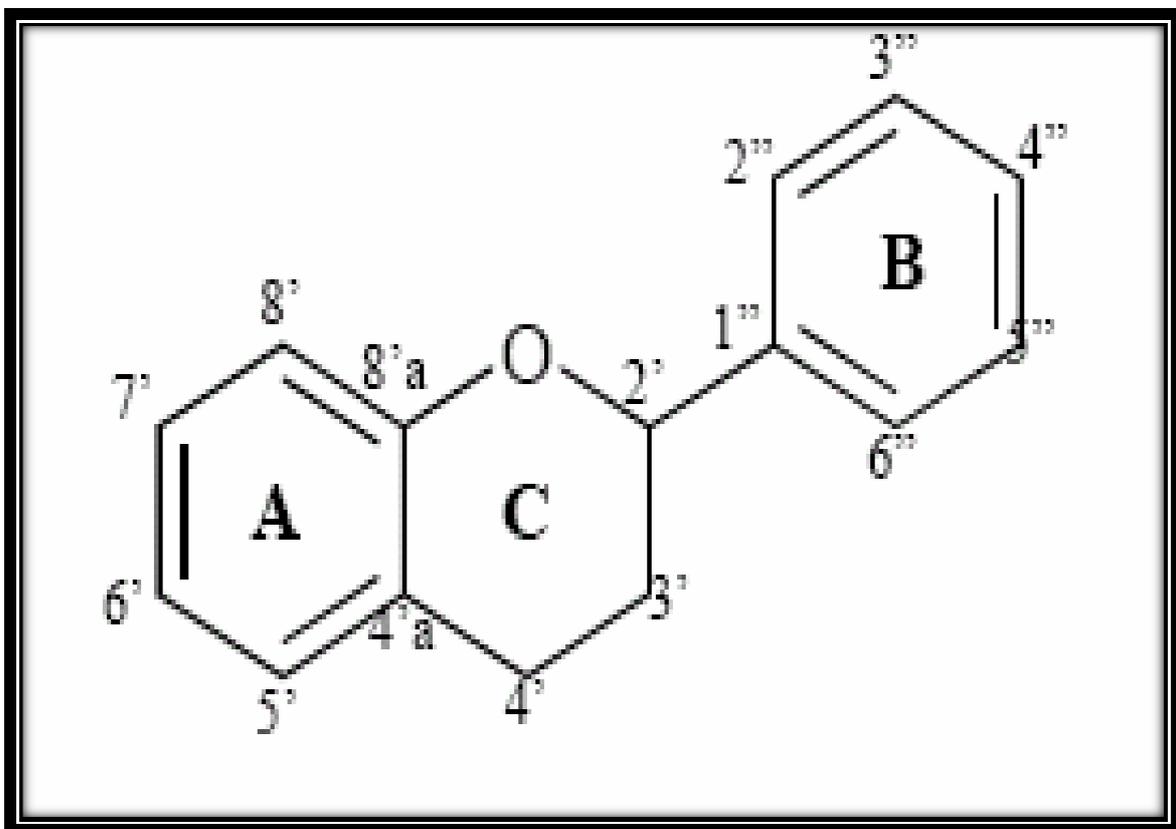


Figure 02 : Structure générale des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont subdivisés en sous-classe selon les variations autour du squelette chimique de base en C_{15} portant principalement sur trois points :

- Le degré d'hydroxylation des différents cycles ;
- le niveau de méthylation (groupements $O-CH_3$ à la place des seules fonctions phénoliques ;

Synthèse des données bibliographiques

-le niveau de glycosylation. En dehors, de quelques exceptions comme le groupe des flavanes, les flavonoïdes des végétaux sont liés à des sucres. D'une manière générale, l'ose est lié à la molécule phénolique par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique C-O-C dégradable par hydrolyse acide à chaud, ou de type C-C beaucoup plus résistante (BENDINI *et al*, 2007).

On distingue alors (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les flavanols, les proanthocyanidines, les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (HAVSTEEN, 2002 ; BEECHER, 2003 ; EDENHARDER ET GRÜNHAGE, 2003 ; CROZIER *et al*, 2009) (figure 03).

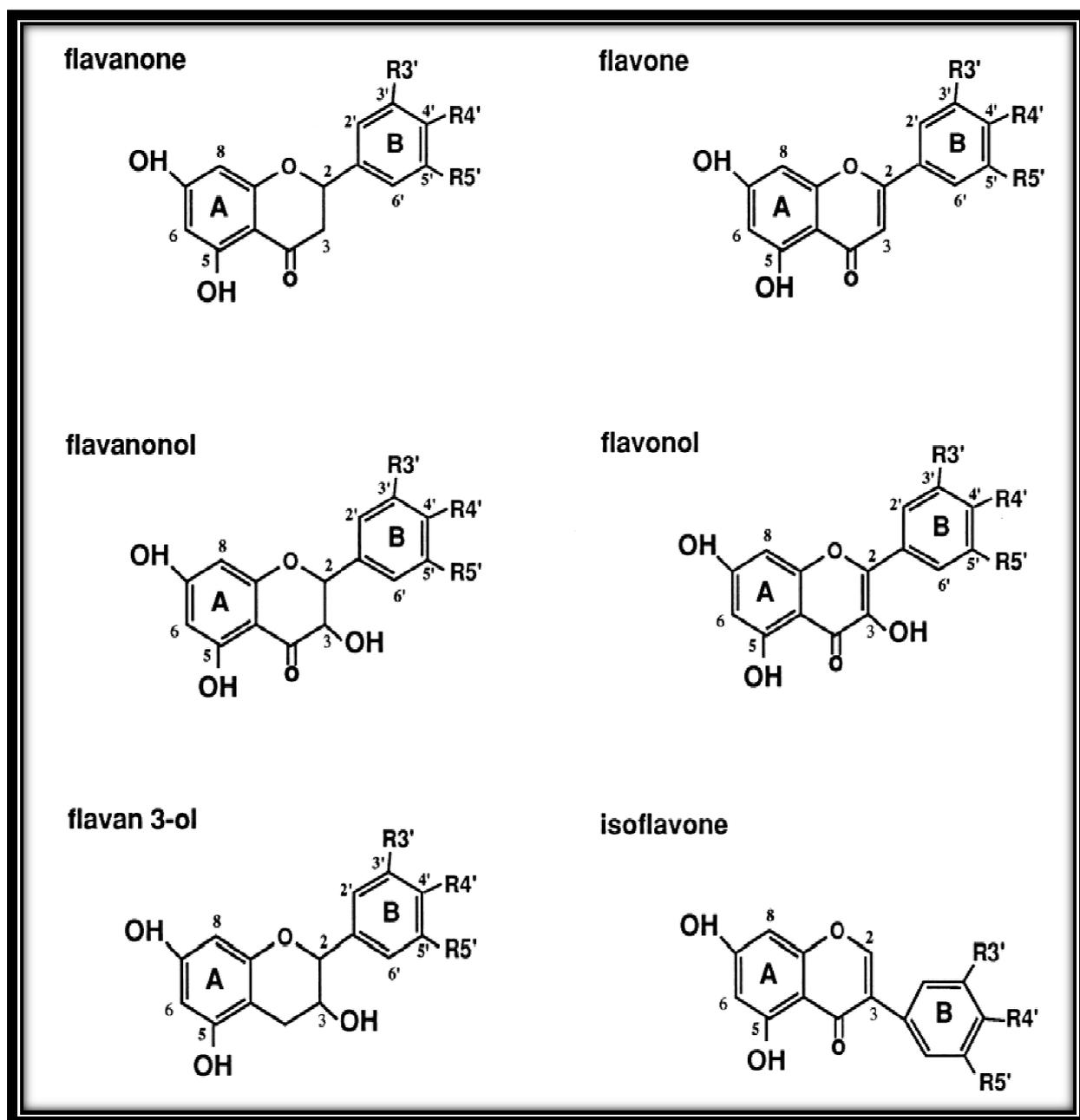


Figure 03 : Les principales classes de flavonoïdes.

➤ **les 4-oxoflavonoïdes**

- Les flavones

Les flavones présentent une double liaison en position 2-3 et le noyau aromatique B est fixé en position 2 (Figure 03). De manière générale, les flavones sont présentes sous forme de 7-O-glycosides. Moins répandues dans les fruits et légumes que les flavonols, les flavones sont principalement présentes sous forme de glycosides de lutéoline et d'apigénine (ANDERSEN et MARKHAM, 2006). Les sources principales de flavones sont données dans le tableau II.

- Les flavonols

Caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3 (Figure 03), ce sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal à l'exception des algues et des champignons. Les composés principaux sont le kaempférol, la quercétine, l'isorhamnétine et la myricétine. Ils sont le plus souvent présents sous forme de glycosides, avec une molécule de glucose ou de rhamnose. Leur conjugaison se fait le plus fréquemment en position 5, 7, 4', 3' et 5' et on a pu mettre en évidence plus de 200 conjugués O-glycosylés différents pour le seul kaempférol (CROZIER *et al.* 2009). S'ils sont largement présents dans les végétaux, leurs concentrations moyennes restent cependant limitées (tableau II).

- Les flavanones

Les flavanones se caractérisent par la saturation de l'hétérocycle C (Figure 03). Le plus souvent glycosilées par un disaccharide en C7, on distingue deux sous-familles : les rutinosides (6-O- α -L-rhamnosyl-D-glucosides) et les néohespéridosides (2-O- α -L-rhamnosyl--D-glucosides) (D'ARCHIVIO *et al.* 2007). Cette classe de flavonoïdes est caractéristique des agrumes (tableau II).

- Les isoflavones

Les isoflavones se différencient des flavones par la fixation du noyau benzénique au carbone 3 de l'hétérocycle. Elles présentent de fortes similitudes avec les oestrogènes. En effet, la présence de groupements hydroxyles en C7 et C4' leur donne une structure similaire au 17- β -oestradiol leur conférant ainsi des propriétés pseudo-hormonales dont celle de se lier aux récepteurs aux oestrogènes. Ainsi elles sont également nommées phyto-estrogènes. Les isoflavones sont présentes presque exclusivement dans les légumineuses et plus particulièrement dans les Fabacées. Le soja et ses produits dérivés en sont les sources principales dans l'alimentation humaine (CASSIDY *et al.* 2000). Trois molécules principales ont été mises en évidence dans le soja: la génistéine, la daidzéine et la glycitéine dans un ratio 1/1/0,2. Elles peuvent être présentes sous 4 formes différentes : aglycones, 7-Oglycosides, 6'-O-acétyl-7-O-glucoside et 6'-O-malonyl-7-O-glucoside, cette dernière pouvant donner aux aliments un goût désagréable d'amertume et d'astringence (COWARD *et al.* 1998).

➤ **Les chalcones et dihydrochalcones**

Les chalcones dérivent des flavanones par isomérisation réversible en milieu alcalin, ce qui se traduit par l'ouverture de l'hétérocycle C avec formation d'une double liaison en position C2-C3 (Figure 03). Les chalcones sont peu présentes dans l'alimentation en raison de leur transformation en flavanones en milieu acide, principalement au cours des étapes d'extraction (TOMAS-BARBERAN et CLIFFORD, 2000).

Les dihydrochalcones dérivent des chalcones par réduction de la double liaison entre les carbones 2 et 3. Elles sont caractéristiques de la pomme et de ses produits dérivés (cidre, jus...). On retrouve dans ces aliments 3 molécules principales : la phloridzine (phlorétine 2'-glucoside), la phlorétine 2' (2''-xylosyl-glucoside) et la 3-hydroxyphloridzine (LU et FOO, 1997).

➤ **Les flavanols et proanthocyanidines**

Les flavanols existent sous forme de monomères également appelés catéchines (Figure 03) ainsi que sous forme de polymères, les proanthocyanidines. Les flavanols présentent un hétérocycle C saturé auquel s'ajoute une fonction hydroxyle en C3. La présence de deux centres chiraux en C2 et C3 donne 4 isomères potentiels pour chaque niveau d'hydroxylation du cycle B. Dans les végétaux, les monomères principaux sont la (+)-catéchine et son isomère l'(-)-épicatéchine. Ces monomères peuvent être hydroxylés en C4' et former la (+) gallocatéchine et l'(-)-épigallocatéchine. De plus, des conjugaisons par estérification en C3 avec l'acide gallique formeront des oligomères (épigallocatéchine 3- gallate (EGCG) et épicatéchine 3-gallate) (ANDERSEN et MARKHAM, 2006).

La catéchine et l'épicatéchine sont les flavanols principaux présents dans de nombreux fruits, tandis que gallocatéchine, épigallocatéchine et épigallocatéchine gallate sont plus spécialement présents dans le thé.

Les proanthocyanidines, encore appelées « tanins condensés » se forment par polymérisation des monomères de flavanols lors de réactions d'auto-oxydation ou le plus souvent sous l'action d'une enzyme, la polyphénoloxydase (MAYER et HAREL, 1979). La polymérisation se fait entre les molécules de (+)-catéchine et (-)-épicatéchine par des liaisons C4-C8 ou C4-C6 pour les proanthocyanidines de type B. Les proanthocyanidines de type A ont en plus une liaison C2-O-C7. Ces polymères peuvent contenir jusqu'à plus de 50 unités. Cependant, le degré de polymérisation pour un aliment donné est rarement déterminé et peut, par exemple, aller de 4 à 11 dans les pommes à cidre. Les proanthocyanidines uniquement constituées d'unités (épi)catéchines sont appelés procyanidines et sont les plus répandues. Les proanthocyanidines contenant l' (épi)gallocatéchine sont appelées prodelphinidines et sont plus rares. Les proanthocyanidines participent à la saveur des aliments. Elles sont responsables de l'amertume du chocolat et de l'astringence de certains fruits (tableau II) par complexation avec les protéines salivaires.

➤ **Les anthocyanes**

Les anthocyanes constituent le groupe de pigments solubles dans l'eau le plus important. Ils sont dissous dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs et des tissus auxquels ils donnent des couleurs rose, rouge, bleu et violet (MAZZA et MINIATI, 1993).

Plusieurs centaines de molécules sont connues. Elles varient selon le nombre et la position des différents groupements hydroxyles et méthoxyles, la nature, le nombre et la position des sucres et l'acylation éventuelle de ces sucres (CLIFFORD, 2000) (Figure 04). Très rarement présents sous forme aglycone (anthocyanidine) (tableau II), les anthocyanes les plus fréquents sont des 3-glycosides ou des 3,5-diglycosides de pélagronidine, cyanidine (anthocyanidine la plus répandue dans l'alimentation), péonidine, delphinidine, pétunidine et malvidine. Leur couleur varie en fonction du pH.

Les anthocyanes sont particulièrement instables sous forme d'aglycones mais stabilisés par la glycosylation. Les anthocyanes sont présents dans le vin rouge, certaines céréales, certains légumes feuillus ou racinaires (chou rouge, oignon rouge, radis). Cependant, c'est dans les fruits qu'ils sont les plus abondants (MANACH *et al.* 2004). Leur quantité dans l'aliment est souvent proportionnelle à l'intensité de la pigmentation du fruit d'après CLIFFORD (2000).

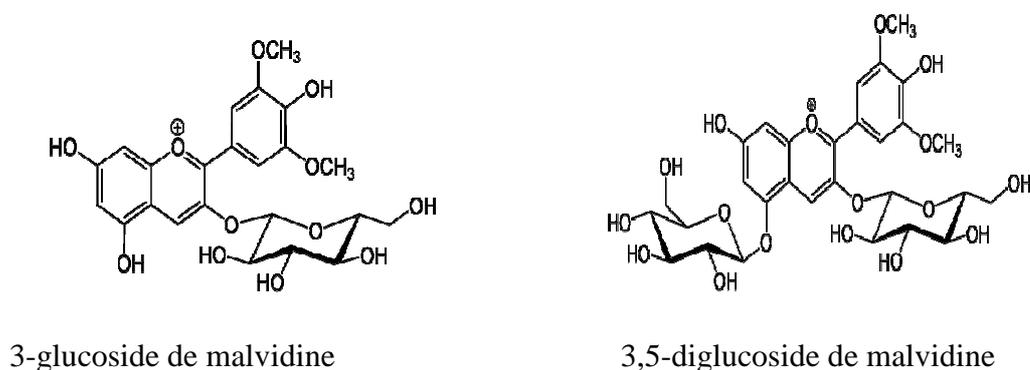


Figure 04 : Quelques structures d'anthocyanosides

1-2-1-2. Formes condensées

➤ **Tannins :**

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000. Ce sont des molécules fortement hydroxylées qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (COWAN, 1999) et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines

Synthèse des données bibliographiques

et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux.

Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont retrouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (YAO *et al*, 2004 et 2012). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

- **Tannins hydrolysables** qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Figure 05) (Annexe 01) (BRUNETON, 1993 ; COWAN, 1999). Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude.

Les tannins hydrolysables renferment trois groupes :

- * Esters d'acides phénoliques,
- * Esters d'acides phénoliques et sucres,
- * Glucosides, est le groupe le plus abondant où l'acide gallique le plus important. L'action de l'enzyme tannase chez *Aspergillus niger* hydrolyse ce type de tanins en glucose et en acide gallique. Les gallotannins sont les plus représentatifs de ce groupe. Les margines renferment un taux non négligeable de ce type de tannins. Les margines sont utilisées comme substrat puisqu'elles renferment un taux élevé en tannins hydrolysables capables d'induire la production de l'enzyme tannase (BRUNETON, 1993).

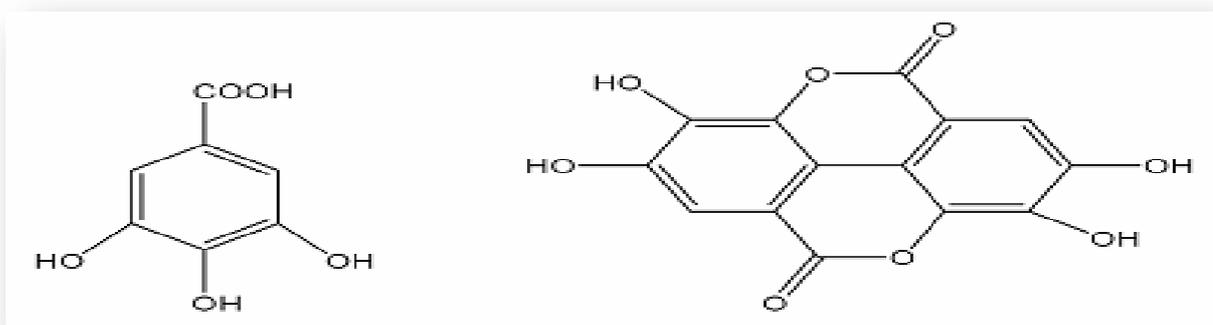


Figure 05 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).

L'acide tannique fait partie des tannins hydrolysables sous forme de galloyl-glucose qui contient plusieurs molécules d'acide gallique par molécule de glucose.

- **Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols** qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur

Synthèse des données bibliographiques

molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit de polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (figure 06). Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (BRUNETON, 1999).

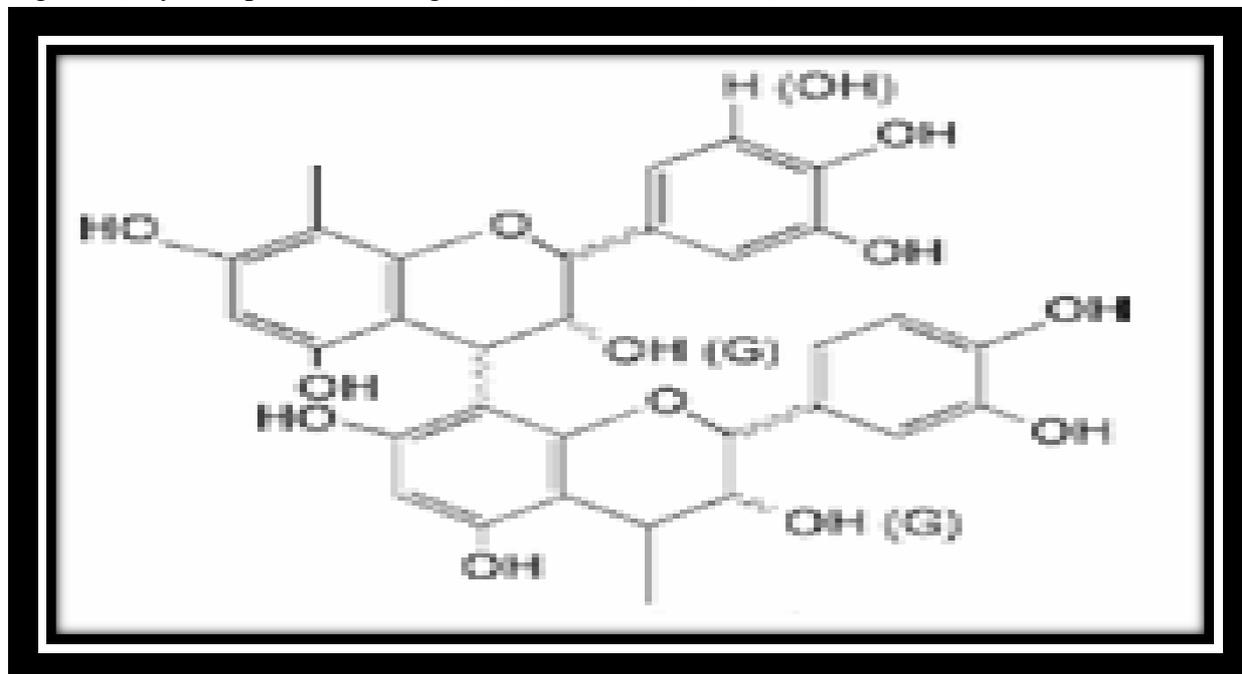


Figure 06 : Représentation de la liaison catéchuic existant entre les unités de tanins catéchuics.

➤ **Lignanes**

Les lignanes sont formés par la dimérisation oxydative de deux unités de phénylpropane. Ils sont métabolisés par la flore colique libérant de l'entérodiol et de l'entérolactone ; ils sont ainsi considérés comme des phytoestrogènes.

Même si leur quantité reste relativement faible dans une alimentation standard, leur ubiquité dans le règne végétal laisse penser qu'ils pourraient constituer une source importante de phytoestrogènes en particulier dans les régimes végétariens (HARBORNE, 1990).

➤ **Lignines**

Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal. Ils résultent de la polymérisation autooxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes (figure 07), et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A.

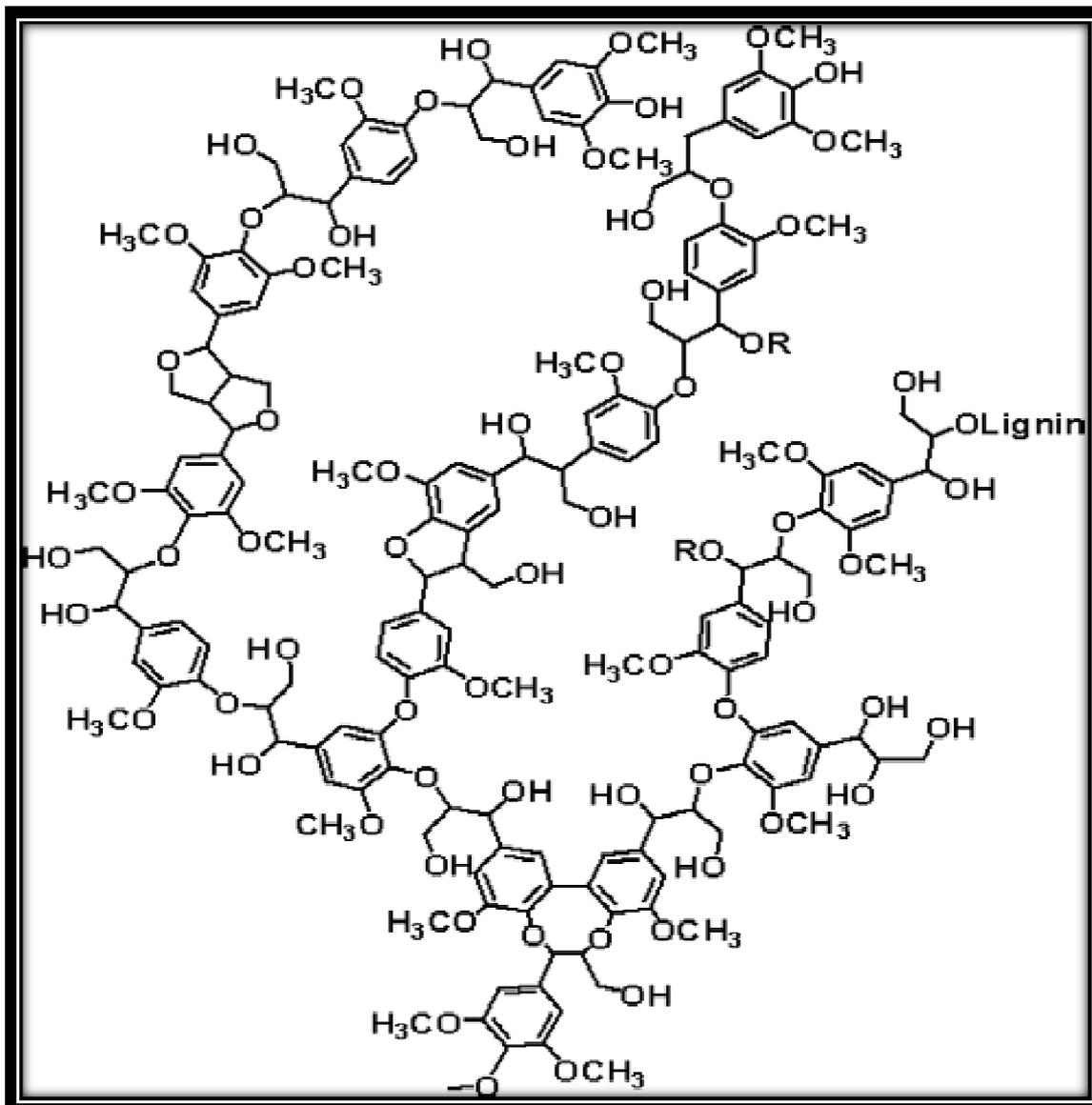


Figure 07 : Structure des lignines.

1-2-2. Principales sources alimentaires

Les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires, avec de fortes variations selon les espèces. Ainsi, la concentration en polyphénols totaux peut varier de 140 mg/kg de poids frais (PF) pour la pomme de terre à 5,5 g/kg PF pour la cerise (SCALBERT *et al*, 2005).

Synthèse des données bibliographiques

Tableau II : Tableau récapitulatif des principales sources alimentaires des polyphénols.

| Classe de polyphénols | Sources alimentaires | Auteurs |
|-----------------------------------|--|---|
| Les stilbènes | -le raisin et son jus, -les baies, le chou rouge, les épinards et certaines plantes médicinales. -les cacahuètes et le beurre de cacahuètes. -Vin rouge. | -(LAMUELA-RAVENTOS <i>et al</i> , 1995). - (CASSIDY <i>et al</i> . 2000). -(CROZIER <i>et al</i> . 2009). -(ROMERO-PEREZ <i>et al</i> , 1996). |
| Les flavones | persil, céleri et le poivron rouge -Les glycosides de flavones sont également présents dans les céréales comme le mil ou le blé - Sous forme glucuronidée, la lutéoline 7-diglucuronide est présente dans l'infusé de verveine odorante. - la peau des agrumes -des huiles essentielles (huile essentielle de mandarine) | -(MANACH <i>et al</i> , 2004). -(LENOIR, 2011) -(CARNAT <i>et al</i> , 1999). -(SHAHIDI <i>et al</i> , 1995). |
| Les flavonols | - l'oignon, le chou frisé, le poireau, le vin rouge, le thé noir et le thé vert. | -(PRICE <i>et al</i> , 1995 ; MANACH <i>et al</i> , 2004) |
| Les flavanones | -les rutinosides de flavanones dans les citrons, les mandarines, les oranges. -Les pamplemousses et les oranges amères -les glycosides de flavanones dans le jus d'orange -la tomate et certaines plantes aromatiques comme la menthe. | TOMAS-BARBERAN <i>et al</i> , 2000). |
| Isoflavones | -Soja (les graines, la farine, le lait de soja). -Le processus de fermentation hydrolysant les glycosides, ces composés seront principalement retrouvés sous formes d'aglycones stables dans ces aliments | (CASSIDY <i>et al</i> , 2000). |
| Chalcones dihydrochalcones | -La tomate (la peau, le ketchup la pomme (peau, chair et épépins) | (KRAUSE et GALENSA, 1992 ; GUYOT <i>et al</i> , 1998). |
| (épi)cathéchine | -l'abricot et la cerise les pêches, les prunes, les fraises, le chocolat le thé vert -les pommes et les poires,. | (D'ARCHIVIO <i>et al</i> . 2007). (GRAHAM, 1992). (AMIOT <i>et al</i> . 1995) |
| proanthocyanidines | le raisin, les pêches, les kakis ou les pommes. le vin, le cidre, le thé et la bière -les pommes, | SANTOS-BUELGA et SCALBERT, 2000 ; GERHAUSER, 2008). |
| Les anthocyanes | -baies comme le cassis ou les mûres. -fruits rouges comme les myrtilles, fraise ou la cerise . -les vins. | (CLIFFORD, 2000; MANACH <i>et al</i> . 2004). |
| Les lignanes | -graine de lin. -céréales (le triticales et le blé). -fruits (les poires et les prunes). -certains légumes (ail, asperges et carottes). -légumineuses comme les lentilles. | (THOMPSON <i>et al</i> , 1991; ADLERCREUTZ et MAZUR, 1997). |

1-3. Biosynthèse des composés phénoliques

Les expériences avec des précurseurs marqués au carbone (C) ont permis de préciser les principales étapes de la biosynthèse des polyphénols. Deux voies différentes de leur formation sont actuellement connues. Selon l'une, liée au métabolisme des acides gras, les noyaux aromatiques sont formés aux dépens de 3 unités acétate ou malonate activées par le coenzyme A. L'autre est liée au métabolisme des glucides et des acides aminés aromatiques. Les substances initiales sont ici les produits de la glycolyse (voie EMP) et du cycle du pentose phosphate: le phosphoénolpyruvate et l'érythrose-4-phosphate. Leur condensation et cyclisation conduisent à la formation d'un intermédiaire important : l'acide shikimique. Celui-ci peut, soit se transformer en acide hydroxybenzoïque (par exemple acide gallique), soit, après l'adjonction d'une molécule supplémentaire de phosphoénolpyruvate et une série de stades intermédiaires suivie d'une amination, donner naissance aux acides aminés aromatiques : la phénylalanine et la tyrosine. Leur désamination conduit à la formation des acides cinnamiques et leurs très nombreux dérivés : leurs aldéhydes, acides benzoïques, acétophénone, lignanes et lignines, coumarines (HARBORNE, 1990 ; BRUNETON, 1993 ; BRUNETON, 1999 ; KNAGGS, 2003 ; NACZK, et SHAHIDI, 2004; CROZIER *et al*, 2006 ; MACHEIX *et al*, 2006). Les acides hydroxycinnamiques, ou phénylpropanoïdes, sont des composés dont le noyau de base est en C6-C3. Sous l'action de la Phénylalanine Ammonia Liase (PAL), la phénylalanine libère un ion ammonium et forme de l'acide cinnamique. Celui-ci est à son tour hydroxylé par la Cinnamate 4Hydroxylase (C4H) pour former l'acide para-coumarique qui sera à l'origine de nombreuses molécules (figure 08). Ces acides sont rarement présents sous formes libres, ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques. Les liaisons se font souvent au niveau des fonctions carboxyliques, ce qui conduit à la formation d'ester. Les liaisons avec du glucose (sous forme Uracile Diphosphate, UDPG) forment des ester de glucose (l'acide feruoylglucose). Les liaisons avec différentes molécules organiques (Coenzyme A ou acide quinique par exemple) conduit par exemple à la forme active du *p*-coumaroyl CoA. L'acide chlorogénique est l'ester de l'acide caféique le plus fréquemment rencontré (liaison avec un acide quinique en C5). Si la liaison s'effectue avec des mono ou diamine, des phénolamides sont formés. Les estérifications peuvent être multiples, ainsi l'acide caféique peut être estérifié avec des acides quiniques et former les acides di et tricaféoylquinique. Des liaisons avec des sucres peuvent aussi être effectuées au niveau des fonctions hydroxyles, ce qui conduit à la formation de glucoside (glucoside de l'acide caféique) (MACHEIX *et al*, 2005). Les flavonoïdes (C6-C3-C6) sont issus du para-coumaroyl CoA et de 3 molécules de malonyl-CoA qui forment l'hydroxychalcone comprenant 2 noyaux benzéniques (Figure 08). Cette transformation s'effectue avec une autre enzyme clef la Chalcone Synthase (CHS). La fermeture de l'hétérocycle central s'effectue par la Chalcone Isomérase (CHI). Ces composés sont la plupart du temps liés à des sucres, généralement par une liaison glycosidique, qui est dégradable par une hydrolyse acide à chaud. Des étapes ultérieures, surtout de glycosylation et d'acylation, amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent *in vivo*. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées (annexe 02) (BRUNETON, 1999).

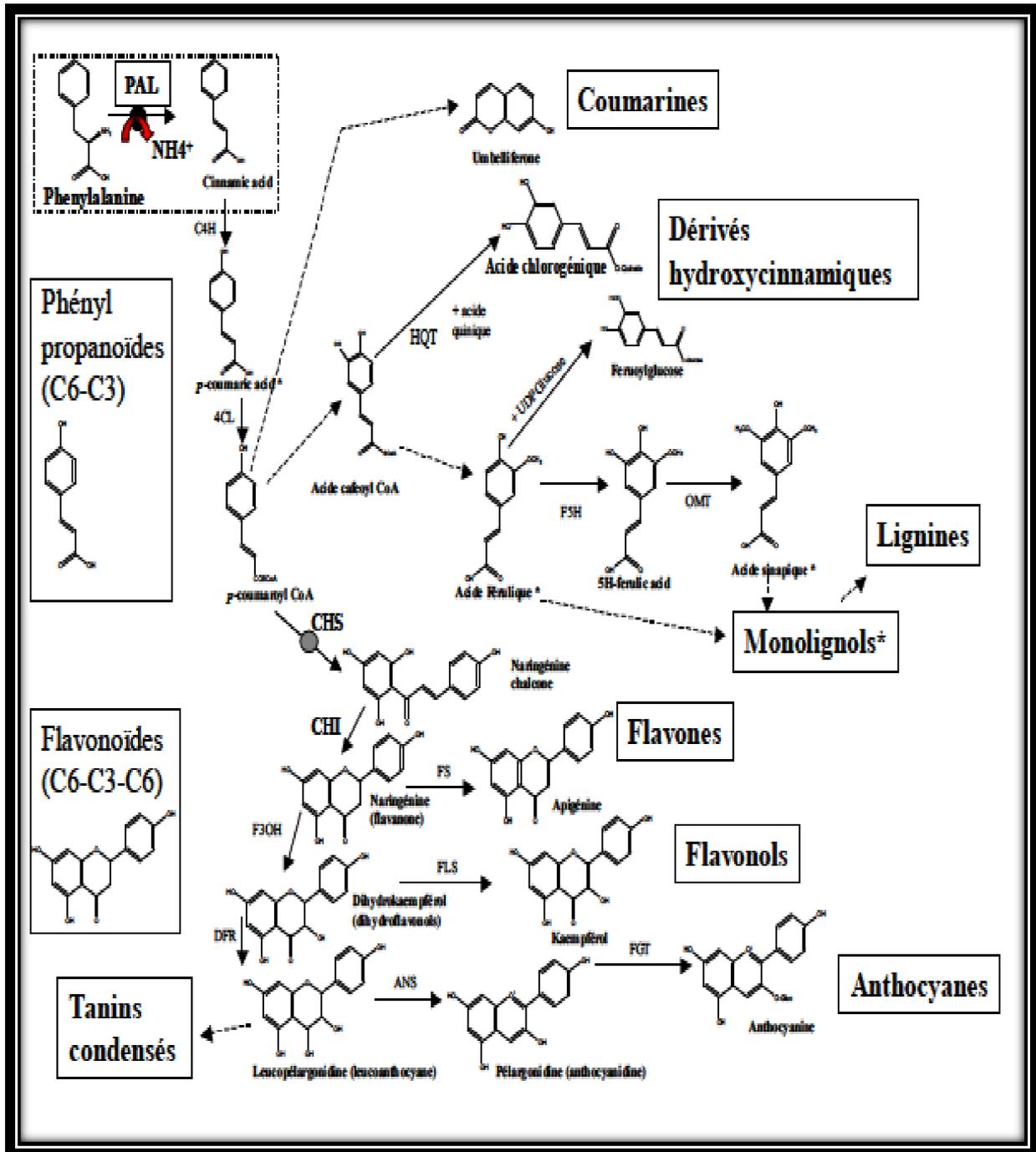


Figure 08 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des polyphénols végétaux.

Phénylalanine Ammonia Liase (PAL), Cinnamate 4hydroxylase (C4H), CoA Ligase (4CL), Hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transférase (HQT), O-méthyltransférase (OMT), Férulate 5-hydroxylase (F5H), Chalcone Synthase (CHS), Chalcone Isomérase (CHI), Flavanone-3 hydroxylase (F3OH), Dihydroflavonol réductase (DFR), Flavone synthase (FS), Flavonol synthase (FLS), Anthocyane synthase (ANS), Flavonoïde glucosyl transférase (FGT). (*) indique les composés impliqués dans la synthèse des monolignols. Les flèches en pointillés indiquent que plusieurs étapes enzymatiques, non représentées, sont nécessaires pour arriver au produit indiqué.

- La désamination de la phénylalanine et la tyrosine conduit à la formation de l'acide cinnamique qui par hydroxylation (par la C4H) donne l'acide p-coumarique.
- Les acides p-coumariques sont à l'origine de nombreuses molécules via des voies enzymatiques, formant ainsi des chalcones qui sont des précurseurs des flavonoides.
- Le p-coumaroyl coA est la forme activée des acides p-coumarique qui conduit également à la formation de l'acide caféique, arrivant aux dérivés hydroxycinnamiques et à l'acide férulique pouvant donner des structures polymérisées.

1-4. Rôles et fonctions biologiques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques (MIDDLETON *et al*, 2000 ; KSOURI *et al*, 2007). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l’oxygène, ou décomposition des peroxydes (PULIDO *et al*, 2000 ; NIJVELDT *et al*, 2001). Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l’hygiène alimentaire (LEONG et SHUI, 2002). D’après les études multiples attestant de l’impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l’industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes sur la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu’aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (HENNEBELLE *et al*, 2004). Le tableau III récapitule les effets biologiques des polyphénols rapportés par la littérature.

Tableau III : Activités biologiques de quelques composés phénoliques selon BRUNETON 1999 ; BALASUNDRAM *et al*, 2006 ; HENNEBELLE, 2007 ; LI *et al*, 2007 ; HABAUZIT et HORCAJADA, 2008 ; BONDIA-PONS *et al*, 2009 ; GRESELE *et al*, 2011).

| Composés phénoliques | Activité biologique |
|---|--|
| Acides Phénols | Antifongique, antioxydante Antibactérienne |
| Tanins | Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, antidiarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur. |
| Flavonoïdes | Antitumorale, anticarcinogène, anti -inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur, diurétique. |
| Coumarines | Anticoagulante, antioxydante, protectrice vasculaire et antioedémateuse. |
| Anthocyanes | Protectrices capillaro-veineux, anti oxydant |
| Proanthocyanidines | Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, antitumoraux, antifongiques et anti-inflammatoires. |
| Tannins galliques et catéchiques | Antioxydantes |
| Lignanes | Anti-inflammatoires, analgésiques |

II. Caractérisation des margines

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile (l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon), engendre la production de deux résidus : un liquide et l'autre solide (annexe 03) respectivement les margines et grignons. A titre informatif, la production annuelle moyenne d'olives en Algérie est estimée à 261 004 tonnes entre les années 2003 et 2009 et celle d'huile d'olive est de 156 586 hectolitres, pour la campagne oléicole 2012/2013 avec une production de 400 000m³ de margines (ANONYME, 2014).

- **Margines ou eaux de végétation** : sont des effluents liquides, parfois nommés alpechine (RAMOS-CORMENZANA *et al*, 1995). Le pressage de 1 tonne d'olives produit en moyenne 1,5 tonnes de margines avec les modes de production modernes (BENYAHIA et ZEIN, 2003). En moyenne, 100Kg d'olives produisent 100 litres de margines via la centrifugation et environ 10 litres par le système classique de pression (MARTIN *et al*, 1991 ; LAKHTAR *et al*, 2006).

- **Grignons ou tourteaux d'olive** : sont des résidus solides issus de la première pression ou centrifugation, ils sont formés des pulpes et des noyaux d'olives. Ce produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile secondaire extraite par des solvants organiques) (CHIOFALO *et al*, 2004 ; MARTIN-GARCIA *et al*, 2003).

2.1. Présentation des margines

Les margines sont obtenues lors de l'extraction de l'huile d'olive à partir de l'eau contenue dans le fruit et de l'eau ajoutée au cours du broyage et des étapes de trituration (GALANAKIS *et al*, 2010) (annexes 03 et 04). A l'origine, les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre, qui se transforme en margine de couleur noire, d'aspect trouble. Elles sont caractérisées par un pH acide de 4 à 5 (NEFZAOU, 1987 ; EROGLU *et al*, 2008 ; HACHICHA *et al*, 2009 ; YAAKOUBI *et al*, 2009 ; YALCUK *et al*, 2010) et une très grande conductivité électrique due surtout aux ions potassium, chlorure, calcium et magnésium (SALVEMINI, 1985; ZBAKH et EL ABBASSI, 2012). Sa couleur noire résulte de la présence de polyphénols (AISSAM, 2003) et est fonction de l'état de dégradation des composés phénoliques et des olives dont ils dérivent (HAMDI et ELLOUZ, 1993 ; ZAHARI *et al*, 2014). Leur odeur rappelle celle de l'huile d'olive, mais elle peut devenir gênante lors des phénomènes de rancissement ou de fermentation anaérobie (RANALLI, 1991 ; DERMECHE *et al*, 2013).

2.2. Caractérisation physico-chimique des margines

La caractérisation physico-chimique des margines a été étudiée par plusieurs chercheurs et est généralement tributaire des techniques et des systèmes d'extraction de l'huile d'olives, elle diffère d'un pays à l'autre. À titre d'exemple, FIESTAS ROS DE

Synthèse des données bibliographiques

URSINOS et BORJA (1992) ont montré que leur échantillon de margines contenait les composés fondamentaux qui sont : l'eau (83,2 %), les substances organiques (15 %) et les substances minérales (1,8 %). Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation (DI-GIOVACCHINO *et al*, 1988 ; HAMDI, 1992).

Les margines sont composées de 40 à 50% de l'eau végétale qui provient du fruit (olive) et le reste de l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration (NEFZAOU, 1987 ; DI-GIOVACCHINO, 1996 ; EL ABBASSI *et al*, 2011).

▪ **pH, conductivité et matière sèche**

- Les margines ont un pH acide avec des valeurs comprises entre 4,2 et 5,9 (EROGLU *et al*, 2008) et entre 2,24 et 5,9 selon AKAR *et al* (2009) cité par DERMECHE et al. (2013). Lors des traitements biologiques des margines, une correction du pH peut s'avérer nécessaire (EL HAJJOUJI *et al*, 2008). La chaux vive a été souvent utilisée pour ajuster le pH des margines (ACHAK *et al*, 2008). En effet, RANALLI (1991) rapporte qu'il faut 1 kg de chaux par 1 m³ d'effluent afin de faire augmenter le pH d'un point.
- La conductivité électrique est étroitement liée à la concentration des substances dissoutes et à leur nature. Dans le cas des margines, les valeurs de cette conductivité varient entre 18 et 50 ms.cm-1 (DI SERIO *et al*, 2008). Cette mesure ne donne pas forcément une idée immédiate sur la charge minérale du milieu (PAREDES *et al*, 1986).
- L'extrait sec des margines est extrêmement élevé et variable. Il est situé entre 15,5 et 266,5 kg.m-3 pour les margines de pression et entre 9,5 et 161,2 kg.m-3 pour les margines de centrifugation (DI GIOVACCHINO *et al*, 1988).

2.3. Composition des margines :

2.3.1. Fraction minérale

Les margines contiennent des quantités significatives en sels minéraux (RANALLI, 1991) dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates). D'après FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA (1992), les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%).

La fraction minérale a été analysée par SALVEMINI (1985). Le tableau en annexe 05 regroupe les concentrations de ces éléments. Il montre que les margines sont riches en phosphore, sodium, potassium et calcium. Par conséquent elles peuvent être utilisées comme fertilisants des terres agricoles (BULDINI *et al*, 2000 ; CAPASSO *et al*, 2002a, 2002b).

Synthèse des données bibliographiques

ARIENZO et CAPASSO (2000) ont analysé les cations métalliques (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) et les anions inorganiques (Cl^- , $H_2PO_4^-$, F^- , NO_3^-) présents dans deux types de margines italiennes. Les résultats ont montré que les margines issues du système de centrifugation sont moins concentrées en cations et en anions. Ceci est dû à leur dilution par l'eau durant l'extraction d'huile d'olives (ARIENZO et CAPASSO, 2000).

Des études plus récentes sur la fraction minérale des margines ont montré que la composition en éléments minéraux était variable d'une margine à une autre (tableau IV).

Tableau IV : Principaux éléments minéraux des margines.

| Elément | Unité | PARASKEVA <i>et al.</i> (2007) | MAHMOUD <i>et al.</i> (2010) | KARPOUZAS <i>et al.</i> (2010) | MORAE TIS <i>et al.</i> (2011) | DANELLAKIS <i>et al.</i> (2011) | PIOTROWSA <i>et al.</i> (2011) | DERMECHHE <i>et al.</i> (2013) | Intervalles de Valeurs |
|---------|-------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Pb | g/l | / | / | / | 6,7 | 10 | / | / | 6,7-10 |
| Cd | g/l | / | / | / | 0,03 | 1 | / | / | 0,03-1 |
| Fe | mg/l | 0,45-0,6 | / | 6,5 | / | 8,88 | 20 | + | 0,45-20 |
| Zn | mg/l | 1,7-4 | / | 3,4 | 2,94 | 4,98 | / | + | 1,7-4,98 |
| Cu | mg/l | 0,49-0,84 | / | 2,4 | / | 2,96 | / | + | 0,49-2,96 |
| Mn | mg/l | 0,46-1,17 | / | 0,9 | 1,61 | 2,7 | 20 | + | 0,46-20 |
| Mg | g/l | 0,06-0,09 | 0,17 | 0,12 | 0,11 | 0,11 | 0,03 | + | 0,03-0,17 |
| Ca | g/l | 0,05-0,08 | 0,14 | 1,1 | 0,15 | 0,29 | 0,03 | + | 0,03-0,29 |
| K | g/l | / | 1,05 | 6,1 | 4,22 | 0,73 | 3,47 | + | 0,73-6,1 |
| Cl | g/l | / | 0,76 | / | / | / | 1 | / | 0,76-1 |
| Na | g/l | 0,03 | 0,13 | 0,07 | / | 0,15 | 0,05 | + | 0,03-0,13 |

(+) : détecté. (/) : Non évoqué.

2.3.2. Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques :

- Fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives. Cette fraction représente les matières en suspension et colloïdales (HAMDI, 1992).
- Fraction soluble dans la phase aqueuse et contient les sucres, les lipides, les acides organiques et les composés phénoliques (HAMDI, 1992 ; OBIED *et al.*, 2005).

2.3.2.1. Sucres

Les études effectuées sur les margines par HAMDI et ELLOUZ (1993) ont montré que la teneur en glucides varie entre 2 et 8% du poids de la pulpe d'olive fraîche. Alors qu'ils ne représentent qu'environ 0,6 % du poids de la pulpe fraîche selon les études menées par OBIED *et al.* (2005) et GALANAKIS *et al.* (2010). Récemment, de nombreux travaux ont montré que les margines sont très riches en sucres simples NIAOUNAKIS et HALVDAKIS, 2004 ; FEZZNI et BEN CHEIKHARTICLE, 2009 ; GARCIA-CASTELLO *et al.*, 2010) et en

Synthèse des données bibliographiques

fibres pectiques (NADOUR *et al*, 2012b). La présence de sucres simples dans les margines tel que : glucose, saccharose, mannose, arabinose, raffinose, fructose et xylose a été également signalée par SALVEMINI (1985). DERMECHE *et al*. (2013) mentionnent que les sucres représentent entre 4,1 et 4,8 % du poids total des margines pouvant se répartir comme suit : Arabinose (62–71%), Galactose (17-25%), Rhamnose (2–3%), Xylose (1–2%), Glucose (1%)

2.3.2.2.Composés azotés

La fraction azotée est représentée principalement par les protéines avec une concentration variable. Tous les acides aminés contenus dans les margines ont été identifiés. Les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline et la glycine (SALVEMINI, 1985 ; RANALLI, 1991 ; CAPASSO *et al*, 2002 ; JAIL *et al*, 2010).

2.3.2.3.Vitamines

Plusieurs vitamines ont été identifiées. Les plus fréquentes sont les vitamines du groupe D et B et la vitamine PP avec une concentration moyenne de 124 mg/kg de margines (SALVEMINI, 1985 ; AISSAM, 2003). Cette teneur peut être exploitée à l'échelle industrielle.

2.3.2.4.Acides organiques

La proportion des acides organiques présente dans les margines varie entre 0,5 et 1,5% (p/v). Les principaux acides organiques rencontrés sont les acides fumarique, glycérique, lactique, malique et malonique (FIESTAS ROS DE URSINOS, 1981 ; SALVEMINI, 1985 ; TSILOULPAS *et al*, 2002).

2.3.2.5.Huiles

La concentration d'huile résiduelle contenue dans les margines est très variable selon le procédé d'extraction utilisé. Elle varie entre 0,02 et 1% (v/v) (FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA, 1992). L'acide oléique est l'acide gras le plus abondant avec un pourcentage de 65% par rapport à la totalité d'huile. La concentration en matière grasse des margines est rapportée par RANALLI (1991) et peut atteindre 10,78 g/l.

2.3.2.6.Composés phénoliques

Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Plus de 50 différents composés phénoliques ont été identifiés dans les margines (OBIED *et al*, 2005 ; DERMECHE *et al*, 2013). Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction (trituration). Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines (RANALLI, 1991 ; ACHAK *et al*, 2008). Les caractéristiques organoleptiques de l'huile d'olive vierge dépendent de la présence des composés phénoliques et des substances volatiles (VAZEQUEZ, 1978 ; BENDINI *et al*, 2007). La teneur en composés phénoliques dans les margines dépend du

Synthèse des données bibliographiques

système d'extraction de l'huile d'olive (ANNAKI *et al*, 1999 ; AISSAM, 2003 ; LAKHTAR, 2006). En général, elle varie entre 3 et 5 g.l-1 (BALICE *et al*, 1997 ; AL-MALAH *et al*, 2000 ; OUKILI *et al*, 2001 ; GARRIDO HOYOS *et al*, 2002 ; TSILOULPAS *et al*, 2002 ; CASA *et al*, 2003 ; FENICE *et al*, 2003) et elle peut même dépasser les 9 g.l-1 (KLIBANOV *et al*, 1983 ; BORJA *et al*, 1992 ; SAYADI et ELLOUZ, 1993 ; KISSI *et al*, 2001 ; AISSAM *et al*, 2002). Beaucoup d'industriels utilisent un moulin à trois phases (annexe 04), qui donne un meilleur rendement en huile avec ajout d'eau durant l'étape de séparation des phases huile/eau. Le problème avec ce système est que les phénols passent dans l'eau. Ainsi, on retrouve une grande quantité de la fraction phénolique dans les margines (AISSAM, 2003), et donc logiquement l'huile d'olive vierge extra issue de ces moulins à trois phases se trouve appauvrie en biophénols. Pour des moulins à deux phases, l'ajout d'eau est très faible car il n'existe qu'une étape de séparation : séparation de la phase solide (grignons humides) de la phase liquide (huile). Dans le tableau V, on donne, à titre indicatif, la liste des composés phénoliques principaux avec leur concentration selon les travaux de (VISIOLI *et al*, 1999).

Tableau V : les principaux composés phénoliques retrouvés dans les margines selon (VISIOLI *et al*, 1999).

| Composé | g/100g de matière sèche |
|-------------------------------|-------------------------|
| Hydroxytyrosol | 1,56 |
| Tyrosol | 0,85 |
| Acide élénolique | 4,30 |
| Dérives de l'oleuropeine | 0,50 |
| Lutéoline 7-Glucoside | 0,22 |
| Quercétine | 0,13 |
| Dérivés de l'acide cinnamique | 0,55 |
| Polyphénols totaux | 8,11 |

Plus de 50 composés phénoliques ont été identifiés (EL ABBASSI et ZBAKH, 2012). Il s'agit de monomères aromatiques et de composés phénoliques à haut poids moléculaire (BORJA *et al*, 1995 ; BENDINI *et al*, 2007 ; EL ABBASSI et ZBAKH, 2012). La composition phénolique des margines d'Italie a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (D'ANNIBALE *et al*, 2000) (annexe 06).

❖ Les monomères phénoliques

Plusieurs monomères aromatiques ont été identifiés dans les margines par des techniques de chromatographie (HPLC en annexe 07 ou CPG). Ils sont représentés essentiellement par des alcools et des acides phénoliques. Le tableau VI récapitule les composés phénoliques détectés dans les margines.

Les acides phénoliques sont les monomères les plus abondants dans les margines, ce qui explique leur acidité. Plusieurs acides phénoliques ont été identifiés dans différents types de margines. BORJA *et al*. (1995) ont identifiés par HPLC plusieurs acides phénoliques dans des margines espagnoles.

Tableau VI : Les principaux composés phénoliques des margines.

| Composés phénoliques | Références |
|---|--|
| Acide cafféique | (VAZEQUEZ, 1978 ; BORJA <i>et al</i> , 1995 ; D'ANNIBALE <i>et al</i> , 2004 ; EL HAJJOUJI <i>et al</i> , 2007). |
| Acide <i>p</i> -coumarique | (VAZEQUEZ, 1978 ; BORJA <i>et al</i> , 1995 ; D'ANNIBALE <i>et al</i> , 2004 ; EL HAJJOUJI <i>et al</i> , 2007). |
| Oleuropéine | (EL HAJJOUJI <i>et al</i> , 2007). |
| Hydroxytyrosol | (FKI <i>et al</i> , 2005 ; ERGÜL <i>et al</i> , 2009). |
| Tyrosol | (FKI <i>et al</i> , 2005 ; ERGÜL <i>et al</i> , 2009). |
| Acide vanillique | (VAZEQUEZ <i>et al</i> , 1974 ; BALICE et CERA, 1984 ; BORJA <i>et al</i> , 1995 ; AZABOU <i>et al</i> , 2007). |
| Acide ferrulique | (D'ANNIBALE <i>et al</i> , 2004 ; FKI <i>et al</i> , 2005) |
| Acide protocatéchique | (VAZEQUEZ, 1978 ; BORJA <i>et al</i> , 1995) |
| - Acide 4-hydroxyphénylacétique. | CICHELLI et SOLINAS, 1984 ; BORJA <i>et al</i> , 1995). |
| - Acide syringique | (CICHELLI et SOLINAS, 1984 ; BORJA <i>et al</i> , 1995). |
| - Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque | (CICHELLI et SOLINAS, 1984 ; BORJA <i>et al</i> , 1995). |
| Acide vératrique | BALICE et CERA, 1984 ; MARTINEZ <i>et al</i> , 1992). |
| Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique | (BORJA <i>et al</i> , 1995). |
| -Acide férulique | (DERMECHE <i>et al</i> , 2013). |
| -Acide gallique | (DERMECHE <i>et al</i> , 2013). |
| -Verbascoside | (DERMECHE <i>et al</i> , 2013). |
| -Lutéoline | (FKI <i>et al</i> , 2005 ; DERMECHE <i>et al</i> , 2013). |
| -Rutine | (FKI <i>et al</i> , 2005 ; DERMECHE <i>et al</i> , 2013). |
| -Lutéoline 7-O-glucoside | (DERMECHE <i>et al</i> , 2013). |
| -Lutéoline 7-O-rutinoside | (DERMECHE <i>et al</i> , 2013). |
| -Lutéoline 4-O-glucoside | (DERMECHE <i>et al</i> , 2013). |

3- Autres composés phénoliques : (WAGNER *et al*, 1984 ; CAPASSO, 1997)

D'autres composés phénoliques monomères ont été identifiés :

- L-caféyl- glucose
- Apégine
- Les anthocyanes (TANCHEV *et al*, 1980).

VAZQUEZ *et al*. (1974) ont identifié un certain nombre de flavonoïdes et des glucosides phénoliques. Il s'agit en particulier, de l'oleuropéine qui a la propriété d'inhiber le développement de certaines bactéries dont des lactobacilles et des champignons comme les *Geotrichum.*, *Rhizopus* et *Rhizoctonia*. L'oleuropéine est abondant dans les margines et se caractérise par un goût amer, elle peut atteindre jusqu'à 2% du poids d'olives (WAGNER *et al*, 1984 ; DAMAK *et al*, 2008 ; CZERWINSKA *et al*, 2012).

BALICE et CERA (1984) ont quantifié certains composés phénoliques des margines par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (tableau VII).

Tableau VII : Teneur de quelques composés phénoliques identifiés dans les margines par BALICE et CERA (1984).

| Composé phénolique | Teneur en mg.l-1 |
|------------------------------------|------------------|
| - Acide vanillique | 242 |
| -- Acide 4-hydroxyphénylacétique | 145 |
| - Acide syringique | 710 |
| - Acide vératrique | 500 |
| - Acide 3,4,5- triméthoxybenzoïque | 80 |

La composition phénolique des margines d'Italie a été étudiée par chromatographie en phase liquide (HPLC) (CASA *et al*, 2003). Le tableau VIII illustre les résultats de leur étude.

Tableau VIII : Phénols totaux, ortho-diphénol et monomères aromatiques contenus dans les margines (CASA *et al*, 2003).

| Composés phénoliques | Teneur |
|---------------------------------------|--------------|
| Phénols totaux (g.l-1) | 3,7 0± 0,1 |
| Ortho-diphénol (g.l-1) | 1,20 ± 0,02 |
| Acide 3 ,4-dihydroxybenzoïque (mM) | 0,35 ± 0,01 |
| Catéchol (mM) | 2,28 ± 0,1 |
| Acide 4-hydroxybenzoïque (mM) | 0,12 ± 0,004 |
| Tyrosol (mM) | 2,47 ± 0,0 |
| Acide syringique (mM) | 0,196 ± 0,04 |
| Acide caféique (mM) | 1,53 ± 0,1 |
| 4-Methylcatechol (mM) | 4,12 ± 0,3 |
| Acide 3-hydroxyphénylpropionique (mM) | 0,06 |
| Acide para-coumarique (mM) | 0,19 |
| Acide vératrique (mM) | 0,227 ± 0,21 |
| Acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque (mM) | 0,03 |
| Acide trans-cinnamique (mM) | 0,33 ± 0,08 |

❖ Les polymères phénoliques

Les composés phénoliques à haut poids moléculaire identifiés dans les margines sont essentiellement les tannins : leur structure est très complexe, leur concentration peut atteindre 12 g/L (BALICE *et al*, 1982). Le catécholmélanique est un flavotanin, il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines (AISSAM, 2003 ; ZBAKH et EL ABBASSI, 2012). Il est formé par la polymérisation de la catéchine à différents degrés. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3 000. En ce qui concerne la lignine, aucun auteur n'a cité la présence de ce polymère dans les margines, bien que les pulpes d'olives contiennent au moins 3% de composés cellulosiques (AISSAM, 2003).

La variabilité des margines influence considérablement leur contenu qualitatif et quantitatif en composés phénoliques. Toutefois, ceux-ci restent la fraction dominante de la

Synthèse des données bibliographiques

matière organique. L'analyse qualitative des composés phénoliques par les techniques de chromatographie reste très délicate. Ceci est dû à la polymérisation des monomères phénoliques en polyphénols et au chevauchement de certains pics dans le chromatogramme des molécules ayant des poids moléculaires et des structures très proches (AISSAM, 2003) (tableau IX).

Tableau IX: Les principaux composés phénoliques polymériques retrouvés dans les margines.

| Composés phénoliques à haut poids moléculaires principalement les tanins | |
|--|-------------------------------|
| Tanins hydrolysables | Tanins condensés (flavotanin) |
| - Esters d'acides phénoliques - Esters d'acides phénoliques et sucres - Glucosides | - Le catécholmélaminique |

La composition chimique des margines est assez variable. Cette variation est due essentiellement aux facteurs suivants (KARAPINAR et WORGAN, 1983 ; BAMBALOV *et al*, 1989) : stade de maturation des olives, conditions édaphiques (les caractéristiques du sol) et climatiques, variété des oliviers, système de culture, situation géographique, temps de stockage des olives avant la trituration, techniques et lieu de stockage, nature de conservation des olives, procédé d'extraction d'huile d'olive qui représente l'élément le plus important (RAMOS-CORMENZANA, 1996 ; ANNAKI *et al*, 1999 ; FIORENTINO *et al*, 2003 ; ACHAK *et al*, 2009).

2.4. Métabolisme des composés phénoliques des margines

Les composés phénoliques des margines sont toujours susceptibles d'être dégradés par les micro-organismes (BORJA *et al*, 1992 ; SAYADI et ELLOUZ, 1993 ; D'ANNIBALE *et al*, 2000 ; GARCIA GARCIA *et al*, 2000 ; GARRIDO HOYOS *et al*, 2002 ; TSILOULPAS *et al*, 2002) ou par les enzymes d'origine microbienne (MARTIRANI *et al*, 1996 ; D'ANNIBALE *et al*, 2000 ; CASA *et al*, 2003). Cependant, le temps nécessaire pour une dégradation totale peut être considérable (LAKHTAR, 2006). Un grand nombre de micro-organismes y compris les bactéries *Pseudomonas putida* (BERTIN *et al*, 2001), *Rhodopseudomonas satustrisand* (RAHLKAR *et al*, 1993), les champignons comme *Aspergillus niger* (HAMDY et ELLOUZ, 1993 ; GARCIA GARCIA *et al*, 2000), *Aspergillus terreus* (GARRIDO HOYOS *et al*, 2002), *Phanerochaete chrysosporium* (SAYADI et ELLOUZ, 1995 ; KISSI *et al*, 2001) et les levures comme *Candida tropicalis* (CHANG *et al*, 1995 ; FADIL *et al*, 2003) a été isolé et caractérisé. Ces micro-organismes possèdent la capacité de dégrader les phénols à faible concentration. Peu d'études ont été réalisées pour améliorer la dégradation des composés phénoliques par ces micro-organismes (CHANG *et al*, 1995). Bien que plusieurs travaux aient été réalisés sur la dégradation des composés

aromatiques, les informations sur leur métabolisation chez les micro-organismes restent très limitées (MIDDELHOVEN, 1993 ; CAPASSO, 1997).

2.5. Valorisation des margines

La faible dégradation chimique des composés phénoliques pourrait être due à une inhibition de l'activité des microorganismes du sol par le pH acide des margines. Les composés phénoliques à pH acide ont un effet antimicrobien. Par ailleurs, l'oxydation des margines entraîne la polymérisation des composés phénoliques en tanins plus résistants à la biodégradation (ACHAK *et al*, 2008 ; YAAKOUBI *et al*, 2009). Acides et extrêmement chargés en matières organiques, ces effluents créent d'importantes nuisances et perturbations du milieu récepteur, souvent répandues en l'état dans la nature, de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou parfois stockées provisoirement dans des cuves, exposant ainsi les systèmes eau-sol-plante, à une pollution inéluctable. Leur déversement dans les milieux naturels provoque de sérieux problèmes environnementaux. Par conséquent, leur valorisation est devenue une nécessité intense de toutes les entreprises (FIORENTINO *et al*, 2003 ; ACHAK *et al*, 2009 ; YAAKOUBI *et al*, 2010 ; ZAHARI *et al*, 2014).

Ces considérations ont conduit plusieurs chercheurs à l'échelle nationale et internationale à choisir la voie du traitement et de la valorisation des margines pour limiter leur pollution (LEGER *et al*, 2000 ; KISSI *et al*, 2001 ; GARRIDO HOYOS *et al*, 2002 ; POZO *et al*, 2002 ; FENICE *et al*, 2003). La valorisation des sous-produits de l'olivier est susceptible de contribuer à l'amélioration de la rentabilité du secteur oléicole (ACHAK *et al*, 2008). De plus, elle permet:

- d'une part, de résoudre en grande partie les problèmes posés par les effluents des huileries qui ont un pouvoir polluant très élevé,
- d'autre part, de contribuer à combler le déficit fourrager qu'on rencontre surtout dans les pays d'Afrique du Nord et du Moyen Orient.

La richesse en polyphénols des margines, plus grande que celle de la phase huileuse. Puisqu'une partie de ces polyphénols est consommée en l'état lorsque les olives noires sont elles-mêmes consommées, on peut espérer transformer l'inconvénient « polluant » en avantage, à condition de prendre en charge immédiatement les margines, entité fragile, dès leur émission à la sortie de la centrifugeuse. Des études sont actuellement en cours pour valoriser les polyphénols des margines en qualité « d'antioxydants naturels » utilisables dans différentes filières agro alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (ZAHARI *et al*, 2014).

III- LES COMPOSES PHENOLIQUES GLYCOSYLES :

3.1. Introduction

D'une manière générale, l'ose est lié à la molécule phénolique par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique C-O-C dégradable par hydrolyse acide à chaud. Cependant, dans quelques cas plus rares, comme chez la vitéxine présente dans la vigne, la liaison est de type C-C, beaucoup plus résistante. Les positions et le nombre de glycosylations dépendent de la réactivité chimique de chacun des hydroxyles phénoliques. Par exemple, chez les flavonols, la position 3 de l'hétérocycle est toujours glycosylée, fréquemment la position 7 mais jamais la position 5 du cycle A. Au contraire, chez les anthocyanes, en plus de la position 3, c'est préférentiellement la position 5 qui est glycosylée. La nature des sucres se liant aux flavonoïdes est variée, allant de la plupart des oses (glucose, galactose, arabinose, rhamnose...) à des disaccharides ou des formes plus complexes. Pour la seule quercétine, on connaît au moins 7 dérivés en position 3 et au total plus de 80 formes glycosylées. Des cas extrêmes montrent jusqu'à 5 positions de glycosylation sur le même squelette de flavonoïde, y compris sur le cycle B.

3.2. Rôles de la glycosylation des polyphénols :

Selon MANCHEIX *et al.* (2005), les conséquences de la glycosylation sont multiples :

- Modification de la couleur des pigments ;
- forte augmentation de la solubilité dans l'eau permettant alors une plus grande accumulation vacuolaire ;
- modification des propriétés biologiques des molécules phénoliques, par exemple dans les interactions de la plante avec les micro-organismes ou dans le caractère toxique qu'elles peuvent présenter vis-à-vis de la plante elle-même.

3.3. Méthodes d'études des polyphénols glycosylés

3.3.1. Hydrolyse acide.

L'hydrolyse acide, destinée à rompre les liaisons C-O-C qui interviennent dans les hétérosides, est conduite en milieu HCl à différentes concentrations pendant un temps qui peut varier de quelques minutes à 1heure, au bain-marie à 100°C. La résistance des différentes liaisons à hydrolyser n'est pas la même ; d'une façon générale, les anthocyanines résistent mieux à l'hydrolyse que les hétérosides des flavonols et des flavones. Il faut tenir compte de ces faits, car dans le cas d'hydrolyse incomplète, on observe sur le même chromatographe des aglycones et des hétérosides (NACZK et SHAHIDI, 2004b ; BOUAZIZ et SAYADI, 2005).

Synthèse des données bibliographiques

Les C-glycosides (vitéxine), dans lesquels la molécule de sucre et l'aglycone flavonique sont liés par une liaison C-C sont particulièrement résistante à l'hydrolyse acide et également enzymatique ; on peut d'ailleurs utiliser cette propriété pour les caractériser.

3.3.2. Hydrolyse alcaline.

L'hydrolyse alcaline des esters des acides benzoïques et cinnamiques est réalisée à température ambiante, en milieu alcalin NaOH 2N pendant 4 heures ; il est recommandé d'opérer sous atmosphère d'azote, car de nombreux composés phénoliques sont facilement oxydables en milieu alcalin. Il faut repasser en milieu acide, pour étudier les produits résultant de cette hydrolyse.

Cette saponification est conduite le plus souvent à partir d'une solution aqueuse d'extraction du matériel végétal. Cependant, pour étudier les composés phénoliques du bois, RIBEREAU-GAYON(1968) a opéré par chauffage à ébullition du matériel végétal dans NaOH 1N ; cette opération libère un grand nombre de composés phénoliques simples, à partir de substances complexes de structures indéterminées.

Selon le protocole de MORRISON *et al.* (1993) en utilisant des solutions de soude de deux molarités différentes. Une hydrolyse douce (2 N) permet d'hydrolyser les esters d'acides *p*-hydroxycinnamiques alors qu'une hydrolyse sévère (4 N) libère en plus les éthers. Les milieux réactionnels issus de ces deux types d'hydrolyse sont alors soumis aux mêmes procédures pour récupérer les acides *p*-hydroxycinnamiques libérés.

3.3.3. Séparation des aglycones

Les opérations que nous venons de décrire comprennent une extraction du matériel végétal, puis l'hydrolyse acide et/ou alcaline dans les but de séparer et d'étudier les formes résultantes qualitativement et quantitativement, ce qu'est l'objet de ce travail.

Dans les solutions hydrolysées ainsi obtenues, on extrait les aglycones apparues à l'aide de solvants non miscibles (éther, acétate d'éthyle, alcool isoamylique); il est donc nécessaire d'opérer à partir d'une solution aqueuse. Ceci est une des raisons qui incite à utiliser un solvant aqueux pour extraire le matériel végétal. La solution obtenue peut être hydrolysée directement, puis les aglycones extraits par un solvant non miscible. Si on effectue l'extraction du matériel végétal par l'alcool, il faut d'abord chasser le solvant sous vide et passer en milieu aqueux (NACZK et SHAHIDI, 2004 ; DIABATE *et al.*, 2009).

L'étude des extraits obtenus se fait soit, qualitativement par chromatographie sur couche mince ou sur papier ou par des techniques plus performantes (Chromatographie en Phase Liquide à Haute Pression (HPLC) ou Chromatographie en Phase Gazeuse <CPG>) ; ou quantitativement, par des méthodes couramment utilisées dont feront objet quelques parties de la partie expérimentale.

IV.METHODES DE SEPARATION ET TECHNIQUES D'ANALYSE DES POLYPHENOLS

Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des composés phénoliques ont fait des progrès spectaculaires au cours des trente dernières années (MANCHEIX *et al*, 2005 ; FERNANDEZ DE CORDOVA et MEDINA, 2014), grâce en particulier à l'utilisation quasi systématique de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et des détecteurs à barrettes d'iodes permettent l'analyse des spectres d'absorption en ultraviolet et le couplage de la HPLC avec les techniques physico-chimiques modernes (spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire...) (BENDINI *et al*, 2007 ; QU *et al*, 2012).

La présence d'un ou plusieurs cycles hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal, les caractériser chimiquement et les doser. Il n'existe aucune méthode permettant d'extraire de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques ou une classe bien spécifique (NACZK *et al*, 2004). Le solvant le plus souvent utilisé pour l'extraction des polyphénols des margines est l'acétate d'éthyle (NACZK et SHAHIDI(2004).

V.ACTIVITE ANTI-OXYDANTE DES POLYPHENOLS

5.1.Stress oxydant

En conditions physiologiques, le dioxygène, élément indispensable à la vie, produit au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées réactives (EOR) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire (annexe 08). Ces EOR, dont font partie les radicaux libres, sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, glucose, ...).

Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de mort cellulaire, il est actuellement admis que les EOR sont de véritables messagers secondaires impliqués dans l'expression et la régulation des fonctions de prolifération et de mort cellulaire. De plus, ils sont des médiateurs inflammatoires impliqués dans diverses pathologies neurodégénératives ou vasculaires telles que l'athérosclérose ou l'hypertension (DHALLA *et al*, 2000).

5.2.Mécanismes d'action des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout à fait normalement et en faible quantité dans les mitochondries. Il s'agit des ions oxygène, hydroxyde et de peroxyde d'hydrogène qui sont libérés lors des réactions biochimiques.

Synthèse des données bibliographiques

Avant d'être neutralisés ils provoquent des lésions sur tous les éléments qu'ils côtoient. L'organisme sait cependant se défendre contre eux, grâce aux enzymes antioxydantes contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action antiradicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium. Si ces systèmes de défense sont débordés ou insuffisants (annexe 08), les radicaux libres ont tout le loisir d'être nuisibles : ils s'attaquent alors aux membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés (leur structure est modifiée); ils agressent également les protéines, les microfibrilles de collagène, l'acide hyaluronique, les acides nucléiques des chromosomes et l'ADN lui-même est transformé entraînant l'apparition d'une série d'anomalie dont le risque de cancérisation. Lorsque les radicaux libres lèsent les acides gras insaturés on parle de lipidoperoxydation des membranes cellulaires. Cela déclenche alors une réaction en chaîne sur les divers acides gras du voisinage jusqu'à ce qu'ils soient neutralisés.

5.3.Mécanismes d'action d'un anti-oxydant

Les principaux mécanismes d'activité antioxydante (HALLIWELL, 1994 ; BOUZID *et al*, 2011) sont:

- le piégeage direct des EOR ;
- l'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR;
- la protection des systèmes de défense antioxydants.

Les polyphénols peuvent agir selon ces divers mécanismes.

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation, sont considérés comme éliminateurs de radicaux libres (SHAHIDI *et al*. 2003 ; CHEW *et al*, 2009).

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Grâce à leur faible potentiel redox, les polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes (Fl-OH), sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes (ROO \cdot), alkoxydes (RO \cdot) et hydroxyle par transfert d'hydrogène : Fl-OH + X -----> Fl-O + XH
Où X \cdot représente l'un des EOR mentionnés ci-dessus. Le radical aryloxyde (Fl-O \cdot) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable.

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxydes, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (HODEK *et al*, 2002) (figure 09) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres.

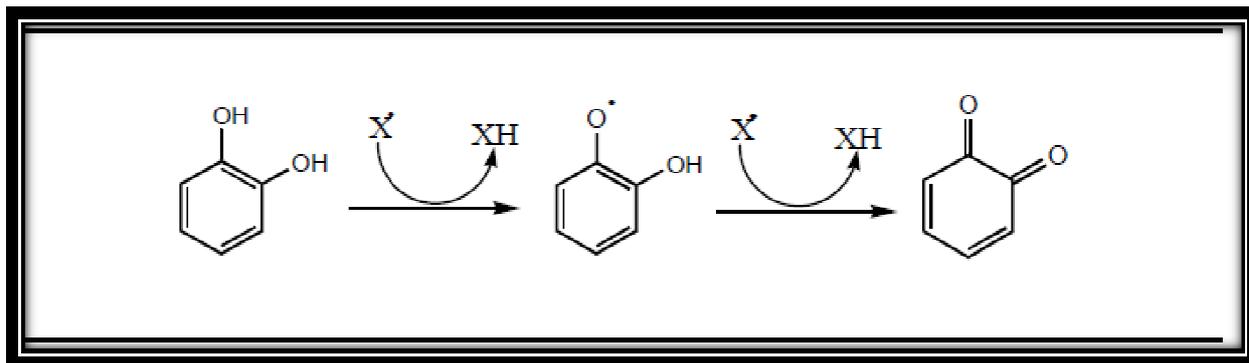


Figure 09 : Piégeage des EOR par les flavonoïdes.

Les propriétés antioxydantes des polyphénols varient en fonction de leur structure chimique (RICE-EVANS, 1996). Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des polyphénols. Les polyphénols porteurs d'un groupement catéchol (un noyau aromatique porteur de deux fonctions hydroxyles adjacentes) ont un potentiel antioxydant élevé. Ainsi, tous les flavonoïdes portant une hydroxylation en 3' et 4' possèdent une activité antioxydante significative (ABEROUMAND et DEOKULE, 2008). De plus, une hydroxylation supplémentaire en 5' comme sur la myricétine augmentera cette activité comparativement à des composés comme la quercétine qui en sont dépourvus (DZIEDZIC *et al*, 1983). L'hydroxylation du noyau B joue donc un rôle important dans l'activité antioxydante des flavonoïdes (SHAHIDI *et al*, 2003) tandis que l'hydroxylation en 5 et 7 sur le cycle A a peu d'influence.

La glycosylation en 3 des flavonoïdes par des mono- ou disaccharides réduit leur activité antioxydante comparativement à leurs aglycones (ainsi le rutoside est moins actif que la quercétine). Il a été montré que les chalcones et en particulier les 3,4- dihydroxychalcones étaient particulièrement efficaces, notamment en comparaison avec leurs flavanones respectives. Par ailleurs, pour les isoflavones, l'hydroxylation en 4' et en 5 est indispensable à une activité antioxydante significative comme dans le cas de la génistéine. De la même manière, l'activité antioxydante des acides phénoliques dépend de leur degré d'hydroxylation. De plus, il a été montré que les acides hydroxycinnamiques étaient plus antioxydants que les acides benzoïques correspondants (SHAHIDI *et al*, 2003).

5.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Les méthodes de l'évaluation du potentiel anti-oxydant sont nombreuses et variées. Le tableau X reprend les méthodes d'estimation de l'activité antioxydante.

Tableau X : Méthodes les plus couramment utilisées pour estimer le pouvoir antioxydant.

| Méthode | Réaction | Auteurs |
|---|--|---|
| Méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) | réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). évalue le pouvoir réducteur des composés La lecture se fait à 700 nm. | PULIDO <i>et al</i> , 2000 ; HINNEBURG <i>et al</i> , 2006). |
| Méthode DPPH | Réduction du radical libre stable de 2,2-diphényl picrylhydrazyl (DPPH.). La lecture se fait à 517 nm. | KOLEVA <i>et al</i> , 2002). |
| Méthode ABTS | le sel de ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2, 2'-azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) perd un électron pour former un radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) de couleur sombre en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation $ABTS^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution. La lecture se fait à 734 nm. | RE <i>et al</i> , 1999 |
| Méthode PPM (PhosPhoMolybdate) | L'hydrogène et l'électron sont transférés vers le complexe oxydant (PPM). | POPOVICI <i>et al</i> , 2009 |

5.5. Relation structure-fonction des polyphénols

Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres. Ainsi, BRAND-WILLIAMS *et al*. (1995) a testé l'activité antioxydante des acides phénoliques et obtenu les résultats suivants:

- Les acides cinnamiques ont une activité anti-radicalaire supérieure à celle des acides benzoïques correspondants. Les acides caféique, sinapique, férulique et *p*-coumarique sont respectivement plus actifs que les acides protocatéchique, syringique, vanillique et *p*-hydroxybenzoïque. Ils sont plus actifs que les phénols simples: acide *p*-coumarique > phénol et acide caféique > pyrocatechol (ANTOLOVICH *et al*, 2004 ; GULÇIN, 2006). Ainsi, le groupe $CH=CHCOOH$ participe à la stabilisation du radical aryloxy par résonance (ABEROUMAND et DEOKULE, 2008).

- Les acides benzoïques sont, quant à eux, moins actifs que leurs homologues phénols, ce qui tend à démontrer le rôle négatif du COOH directement fixé sur le noyau benzénique (NODA *et al*, 2007).
- L'addition d'un second OH sur le cycle aromatique augmente fortement l'activité antioxydante des acides phénoliques, particulièrement quand le second OH est en *ortho* ou *para* du premier: *ortho* = *para*>*méta* ou *para* >*ortho*>*méta* (THUMANN et HERRMAN, 1980). Un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant (ex: acide gallique) (ABEROUMAND et DEOKULE, 2008 ; CZERWINSKA *et al*, 2012).
- Le groupement méthoxyle joue, dans une moindre mesure, le même rôle que les groupements OH (ABEROUMAND et DEOKULE, 2008).

La présence de plusieurs unités de type acide phénolique peut concourir à renforcer l'activité antioxydante (MACHEIX *et al*, 2006). Les travaux sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical-cation de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}) en comparaison avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) permettent d'estimer le paramètre TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée, plus la molécule est active.

➤ **Comparaison de l'activité des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavonoïdes**

L'activité de la quercétine (4,72 mM) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (2,4 mM). La cyanidine a approximativement la même activité antioxydante que celle de la quercétine. Ces résultats démontrent l'importance de la présence d'un cycle central insaturé, qui permet la délocalisation des électrons dans le radical (NODA *et al*, 2007 ; HUANG *et al*, 2013).

➤ **Le rôle du groupe 3-OH sur le cycle C et de la double liaison C2-C3**

La glycosylation du groupement 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) réduit l'activité antioxydante à 2,4 mM et 2,1 mM, respectivement (Figure 10). Ceci démontre l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison C2-C3 et à la fonction 4-oxo. L'importance de la double liaison C2-C3 est confirmée en comparant l'activité de la quercétine avec celle de la taxifoline (dihydroflavonol), qui est deux fois moins active que son analogue flavonol, la quercétine (NODA *et al*, 2007 ; HUANG *et al*, 2013) (Figure 10).

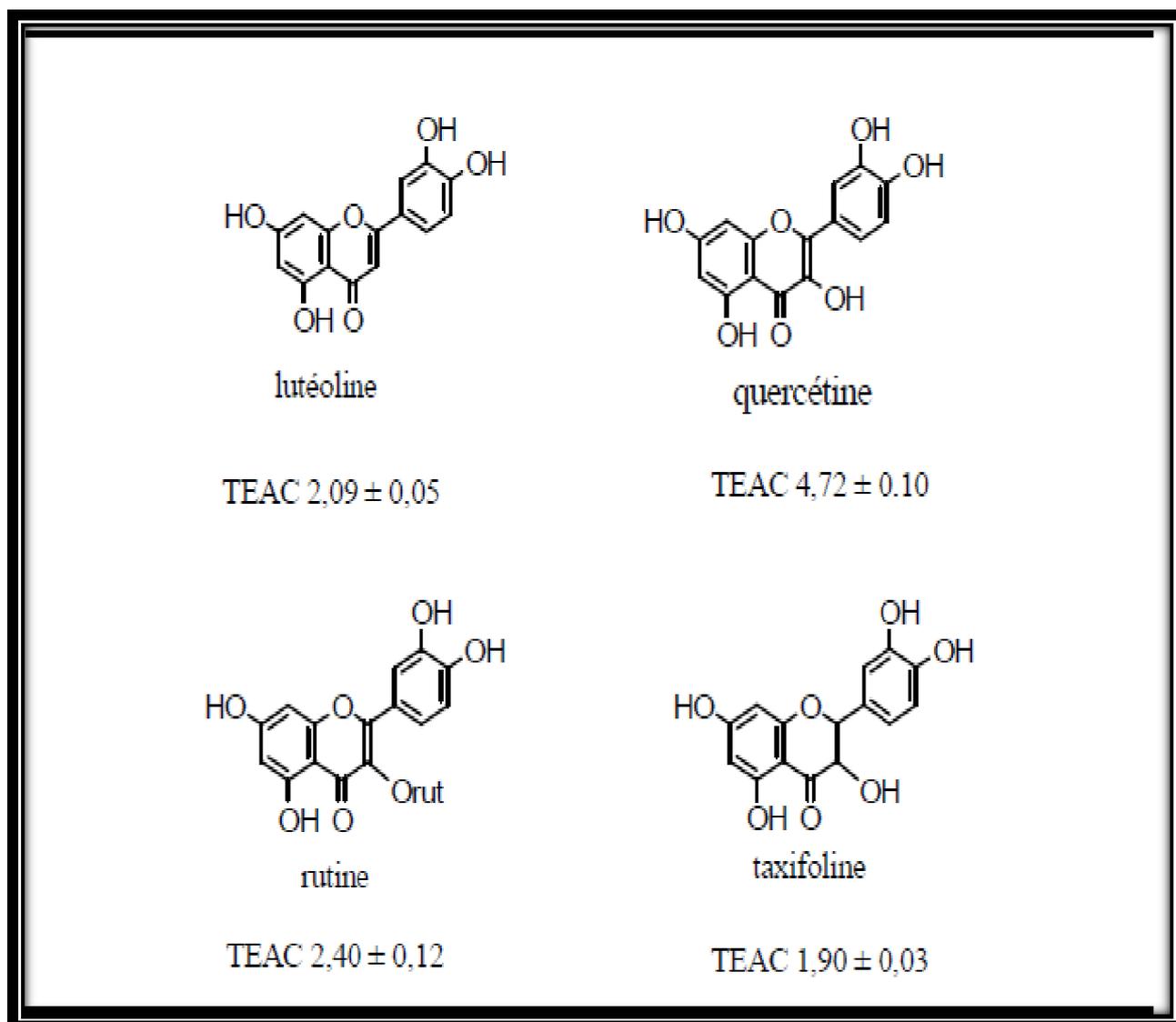


Figure 10 : Valeurs de TEAC indiquant l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison C2-C3 (NODA *et al*, 2007). Les valeurs sont exprimées en mM.

➤ **L'effet de la glycosylation sur l'activité des flavones et flavanones**

La comparaison de la naringénine avec la naringoside (Figure 11) montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue notablement l'activité. Des effets similaires sont observés quand l'hespérétine est comparée avec son rutinoside (hespéridine), et la lutéoline avec son 3',7-diglucoside (Figure 11).

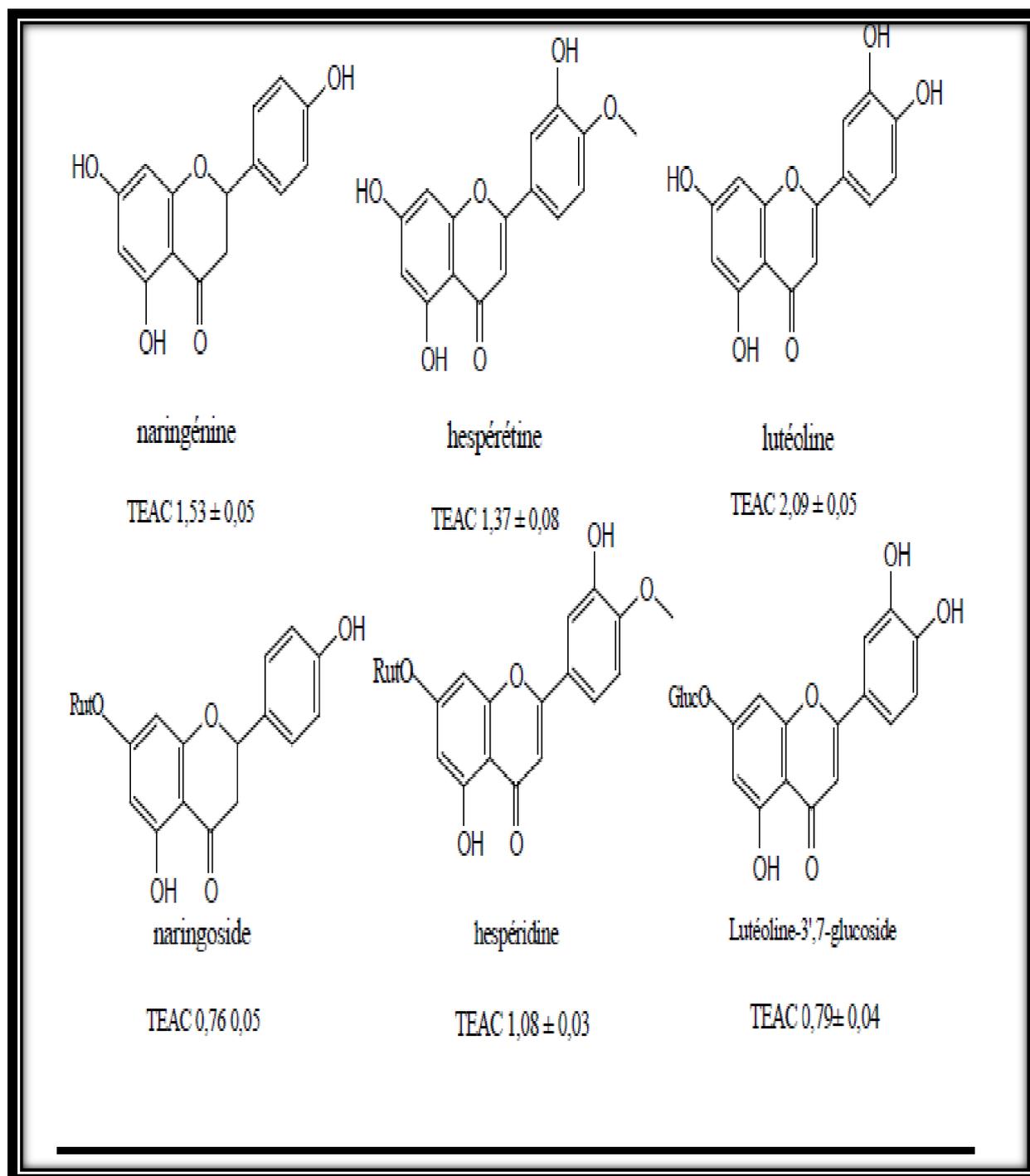


Figure 11 : Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et flavanones (NODA *et al*, 2007). Les valeurs sont exprimées en mM.

➤ **Importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B**

La morine avec deux groupements hydroxyles en méta et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (deux groupements hydroxyles en *ortho*). Les résultats démontrent l'importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B.

La présence d'un troisième groupe OH sur le cycle B (myricétine) diminue légèrement l'activité antioxydante, sans doute en raison de l'instabilité de ce flavonoïde (grande sensibilité à l'autoxydation). Pour les flavones, un cycle B dihydroxylé en ortho est aussi important pour l'activité antioxydante.

En résumé, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- 1- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol).
- 2- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- 3- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

Les flavonoïdes tels que la quercétine qui répondent à ces trois critères structuraux (Figure 12), sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes (impliqués dans la peroxydation lipidique). Enfin, les flavonoïdes possédant une structure catéchol sur le cycle B, et en particulier la catéchine, sont des piègeurs du dioxygène singulet.

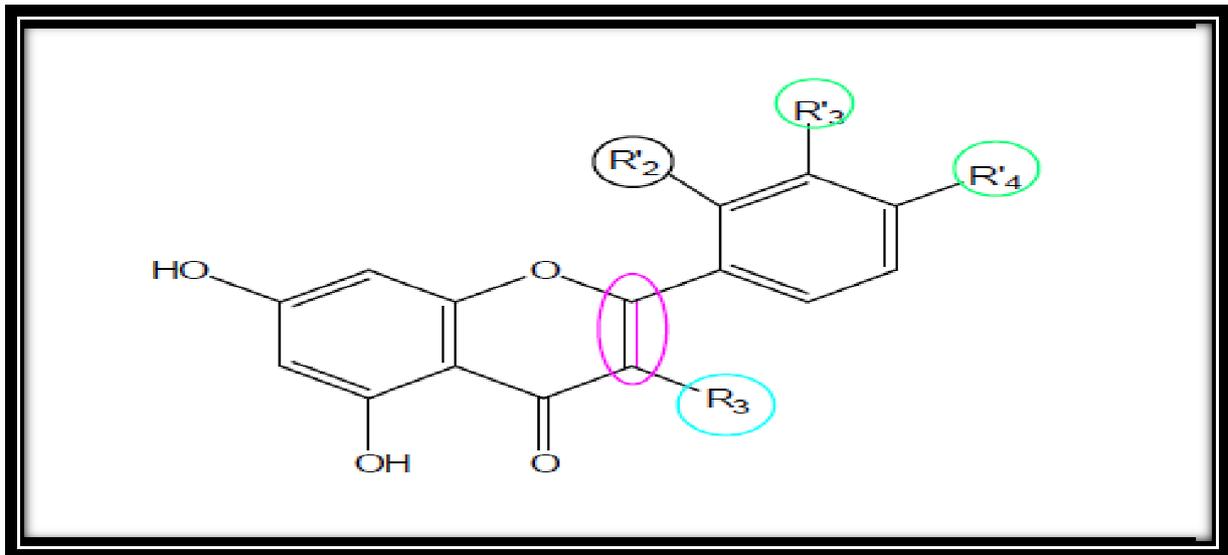


Figure 12 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

Les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- 1- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol).
- 2- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- 3- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.



PARTIE II

Partie expérimentale



Matériels et Méthodes

Partie II : Partie expérimentale

1. Matériels et méthodes :

1.1. Matériels :

1.1.1. Matériel végétal :

- **Classification variété *Chamlal*** : Les margines prises dans notre étude, proviennent de la macération des olives de la variété *chamlal* dont la classification est la suivante :

Cette variété appartient à la série *Sativa* de la sous espèce *euromediterranea* (figure 13).

Embranchement : *spermaphytes*

Sous embranchement : *angiospermes*

Classe : *Dicotylédones*

Sous classe : *gamopétales tétracycliques superovariées*

Ordre : *ligustrales*

Famille : *oléacées*

Sous-famille : *oléoïdées*

Genre : *olea*

Espèce : *europaea*

Sous espèce : *oléa-euromediterranea*

Série : *sativa*

Variété : *chamlal*



Figure 13 : Olives noires (matures) de la variété *Chamlal*.

- **Provenance des margines :**

Les margines utilisées proviennent d'une unité industrielle moderne de trituration d'olives par centrifugation à trois phases, située dans la région de Sidi Naamane (Tizi-Ouzou) pendant la campagne oléicole 2012/2013. Les échantillons ont été prélevés à partir du bassin de stockage des margines puis conservés dans des bouteilles en plastique à -20° C jusqu'au moment de l'emploi. Elles sont récupérées à l'état liquide telles que produites par la centrifugeuse de l'huilerie.

1.1.2. Appareillage :

Les différents appareils utilisés sont donnés dans le tableau XI:

Tableau XI : Tableau regroupant l'appareillage utilisé lors de l'expérimentation.

| Appareil | Firme |
|---|--------------------------------|
| Balance de précision | OHAUS (0,001g - 210g) g:gramme |
| Etuve | MEMMERT |
| Agitateur magnétiques plaque chauffante. | LABINCO |
| Agitateur magnétique | STUART |
| Rotavapor | IKA-WERK |
| Bain-marie thermostaté | MEMMERT |
| Spectrophotomètre UV-Visible | SHIMADSU |
| Centrifugeuses (réfrigérée et non réfrigérée) | SIGMA 2-18K et SIGMA 3-16 P |
| Vortex | BIOBLOCK SCIENTIFIC |
| Lampe UV (254 et 366nm) | DESAGA |
| Lyophilisateur à plateaux | Telstar |

1.1.3. Réactifs et produits chimiques :

Les produits chimiques et les réactifs utilisés sont :

-Solvants organiques : acétate d'éthyle, chloroforme, Hexane, méthanol, éther diéthylique, n-butanol.

-Acides/Bases : acide formique, acide sulfurique, acide acétique, acide chlorhydrique (HCl), hydroxyde de sodium (NaOH), acide trichloroacétique (TCA).

-Etalons (composés phénoliques) : acide gallique, acide *trans*-cinnamique, acide caféique, acide tannique, oleuropéine, rutine, quercétine.

-Réactifs : acétate de sodium, 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), réactif de Folin-Ciocalcu.

-Sels : carbonate de sodium (Na_2CO_3), chlorure de fer (FeCl_3), ferrocyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), trichlorure d'aluminium (AlCl_3), phosphate monopotassique (KH_2PO_4), phosphate dissodique ($\text{Na}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$).

-Autres produits :

* D-glucose.

* Acide ascorbique.

* Phénol.

* papier Watmann N°1.

* Plaques de CCM : plaque d'aluminium de CCM (20x20cm, 0,25mm d'épaisseur), gel de silice-60 254F (Merck).

1.2. Méthodes :

1.2.1. Préparation des extraits phénoliques

1.2.1.1. Méthode d'extraction des polyphénols à partir des margines brutes

L'extraction des polyphénols totaux (ppt) à partir des margines brutes est une extraction de type liquide-liquide qui repose sur le principe de solubilité dans les solvants organiques. Le choix du solvant dépend de la nature des composés à extraire, de leur solubilité dans le solvant et surtout de la nature du matériel végétal.

1.2.1.1.1. Extraction des ppt à l'acétate d'éthyle

Les composés phénoliques contenus dans les margines sont extraits selon la méthode décrite par DE MARCO *et al.* (2007). Les margines doivent, au préalable, subir un prétraitement par l'hexane pour éliminer les lipides. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle celui-ci est souvent utilisé pour ce type d'extraction (DELLA GRECA *et al.*, 2004). En effet, FKI *et al.* (2004) ont démontré que l'acétate d'éthyle est plus efficace que les autres solvants d'extraction avec un taux d'extraction élevé.

- Délipidation des margines

10 ml de margines sont ajoutées à 10 ml d'hexane (V/V). La solution est mélangée pendant 3 min. Le mélange subit ensuite une agitation suivie d'une décantation pendant 10 min. Les margines délipidées sont recueillies après séparation complète en deux phases : l'hexane (surnageant) et les margines délipidées (phase aqueuse) prêtes à une extraction liquide-liquide (annexe 09). Cette étape est reprise trois fois (3 lavages à l'hexane).

- Extraction à l'acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle est additionné aux margines délipidées (V/V), l'ensemble est homogénéisé. Après une centrifugation à 4000g pendant 20 min, le mélange est complètement séparé en deux phases : l'acétate d'éthyle riche en polyphénols (surnageant) et les margines (culot) (figure 14). L'opération d'extraction est répétée trois fois dans le but de récupérer le maximum de composés phénoliques. La phase organique riche en composés phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C (ZAHARI *et al.*, 2014). Le protocole est illustré par la figure 14.

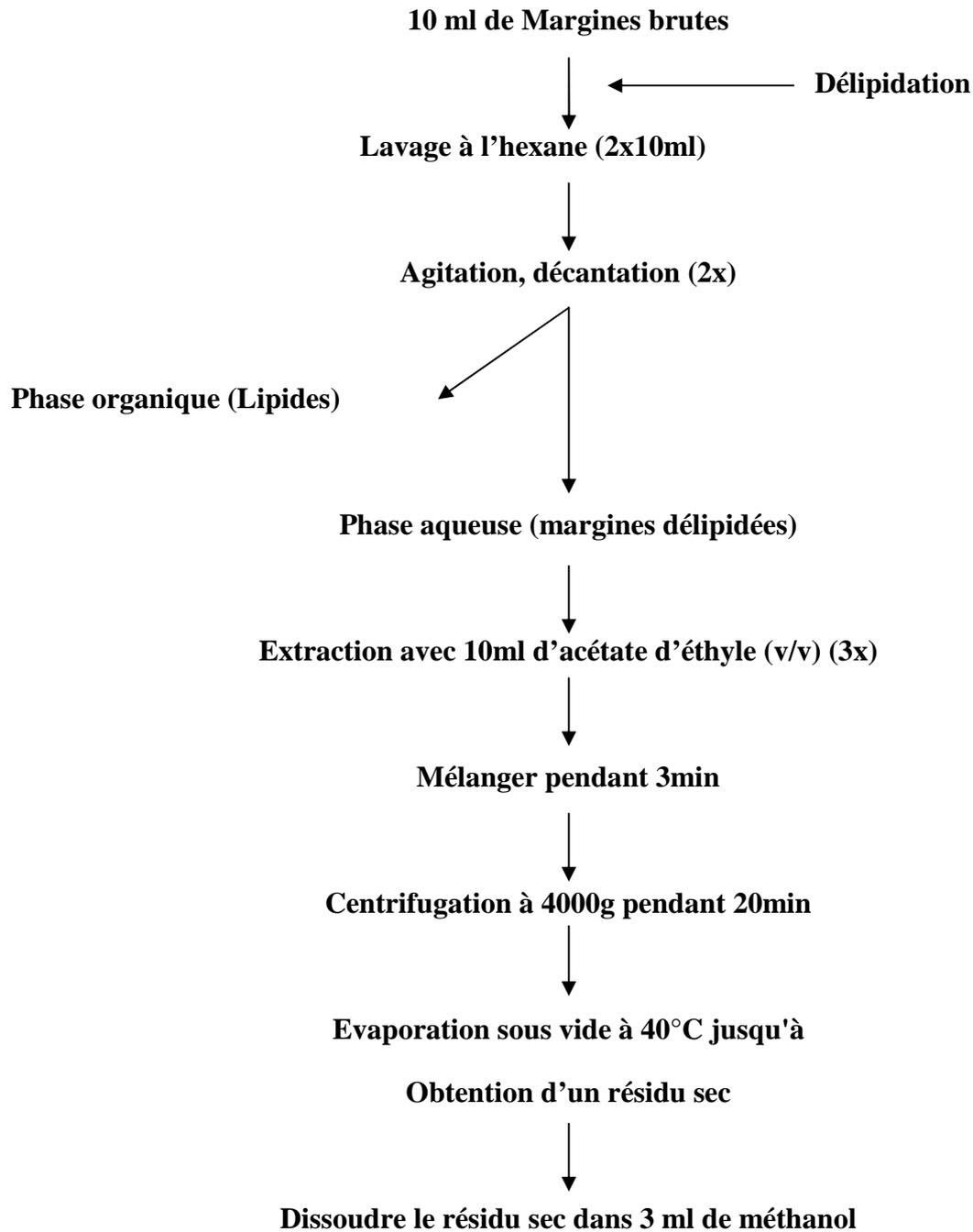


Figure 14 : Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des margines (DE MARCO *et al*, 2007).

1.2.1.1.2. Extraction des polyphénols avec trois solvants à polarité croissante

L'extraction des PP est également réalisée selon la méthode de MARKHAM (1982) avec modification inspirée selon la méthode de BRUNETON (1993). Elle est basée sur le degré de solubilité des polyphénols dans les solvants organiques (Figure 15). De ce fait, trois solvants organiques de polarités différentes ont été utilisés (l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol). Afin de séparer les composés en fractions aglycones, monoglycosides et di et triglycosides, des margines préalablement délipidées sont mélangées avec l'éther diéthylique (v/v) pour obtenir une phase organique contenant les formes aglycones et éventuellement les aglycones (Eth). La phase aqueuse restante subit à son tour trois extractions avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer dans la phase organique certaines formes aglycones mais surtout les monoglycosides (Acét.). La phase aqueuse restante est mélangée avec le *n*-butanol pour récupérer notamment les di et triglycosides, ainsi que les formes C-glycosylées (But.). Les trois fractions récoltées sont concentrées par évaporation à basse pression à 35°C. Les résidus secs sont repris dans du méthanol.

Selon LIU *et al.* (2014), l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des formes aglycones ou mono O-glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le *n*-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycosides et C-glycosides. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode avec AlCl₃ en utilisant comme standard la quercétine, les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en µg EQ/mg d'extrait.

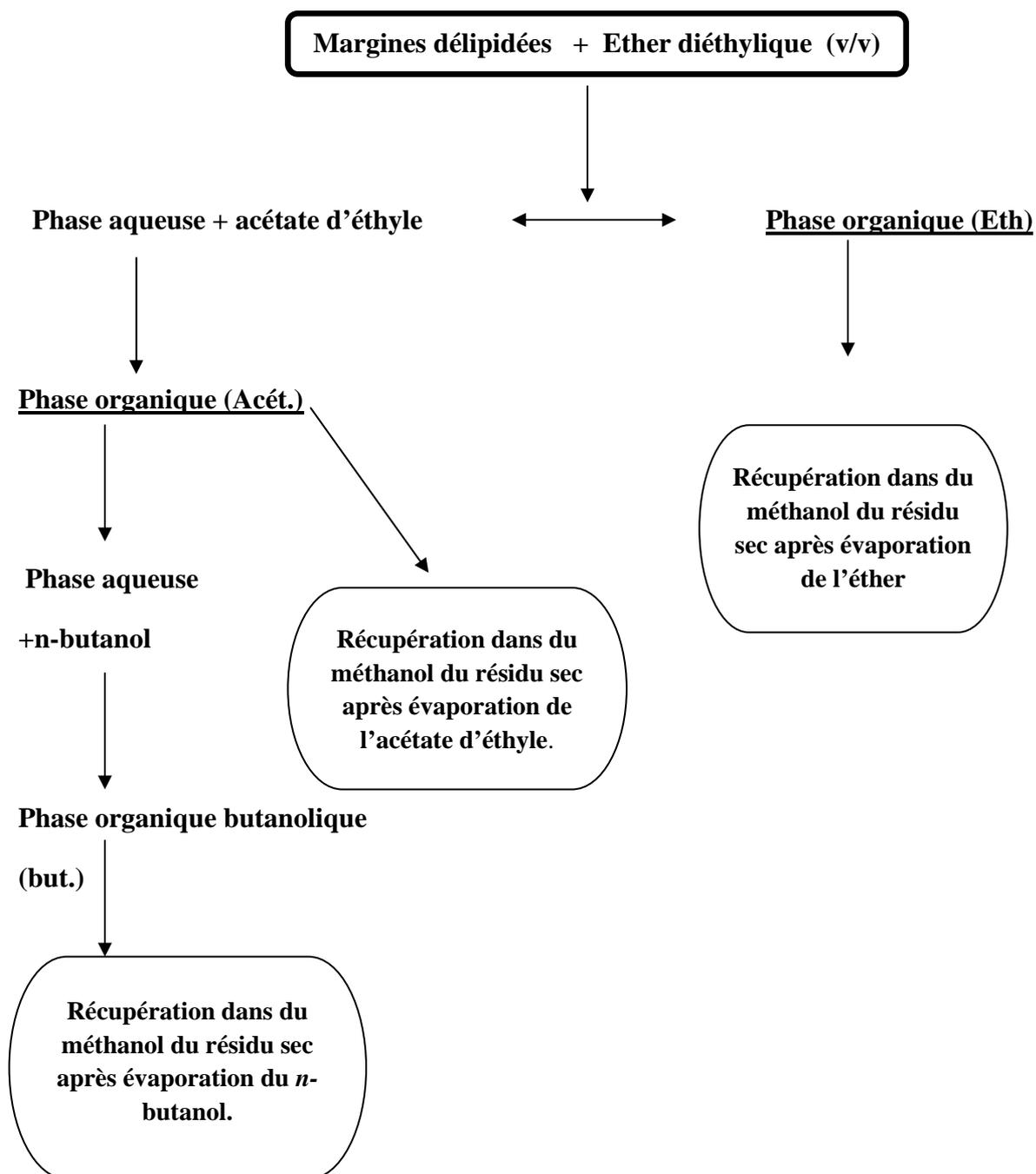


Figure 15 : Protocole de fractionnement des polyphénols contenus dans les margines par trois solvants organiques.

- **Lyophilisation de l'échantillon de margines délipidées :**

Un des protocoles expérimentaux utilisés dans cette étude exige la présence de la matière végétale sous forme de poudre. Or, dans notre cas les margines se présentent sous forme liquide. Pour ce faire, la lyophilisation de l'échantillon de margines délipidées s'impose. Le lyophilisat ainsi obtenu est conservé à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation.

1.2.2. Méthodes de traitement hydrolytique :

1.2.2.1. Hydrolyse à l'acide chlorhydrique (HCl) destinée à rompre les liaisons C-O-C liant les sucres aux polyphénols.

Principe de l'extraction :

La méthode d'extraction décrite par ROBLES *et al.* (1998) repose sur l'hydrolyse acide à chaud des hétérosides présents dans le matériel végétal. En effet, les flavonoïdes sont généralement sous forme d'hétérosides. Selon la liaison qui intervient, l'hétéroside peut-être un O-glycosylflavone (liaison C-O-C entre un OH alcoolique ou phénolique de l'aglycone et un OH d'une molécule glucidique) ou un C-glycosylflavone (liaison C-C entre le C₆ ou le C₈ de l'aglycone et un carbone de l'ose). La liaison C-O-C des O-glycosylflavones est une liaison fragile qui se rompt à l'hydrolyse enzymatique ou acide libérant les aglycones. Par contre, la liaison C-C des C-glycosylflavones est résistante à ce type d'hydrolyse.

- **Hydrolyse des liaisons hétérosidiques des composés phénoliques avec HCl 2N :**

Pour la recherche des aglycones, une hydrolyse acide destinée à rompre les liaisons (C-O-C) est effectuée sur 2 g de matériel végétal (lyophilisat) qui sont placés en présence de 160 ml de HCl 2 N froid (figure 16). Les solutions sont ensuite placées au bain-marie à 100°C pendant 40 min. Deux procédures de traitement acide ont été réalisées. Après refroidissement, les pp sont extraits de la phase aqueuse acide par différents solvants organiques pour les comparer ultérieurement qualitativement et quantitativement.

- **La première procédure**

- Une première extraction est réalisée avec l'acétate d'éthyle. Puis, le solvant est évaporé à basse pression au rotavapor à 35°C . le résidu sec est repris dans 4 ml de méthanol, c'est l'extrait (Acét 2N).
- La phase aqueuse résultante est mélangée au *n*-butanol cette étape est refaite 3 fois. Le butanol est éliminé par évaporation sous vide à 40°C . le résidu sec ainsi obtenu est dissout dans 4 ml de méthanol constituant ainsi l'extrait (But 2N).

- **La deuxième procédure**

- Les aglycones: les aglycones de la phase aqueuse acide sont extraits 3 fois par l'éther éthylique. La phase organique obtenue subit une concentration par évaporation au rotavapor, le résidu sec obtenu est dissous dans 4 ml de méthanol constituant ainsi l'extrait (Eth 2N).
- Les composés C-glycosylés : la phase aqueuse restante subit un lavage au *n*-butanol (3fois). La phase butanolique ainsi obtenue est concentrée par évaporation au rotavapor puis repris dans 4 ml de méthanol. Cet extrait est (But 2N).

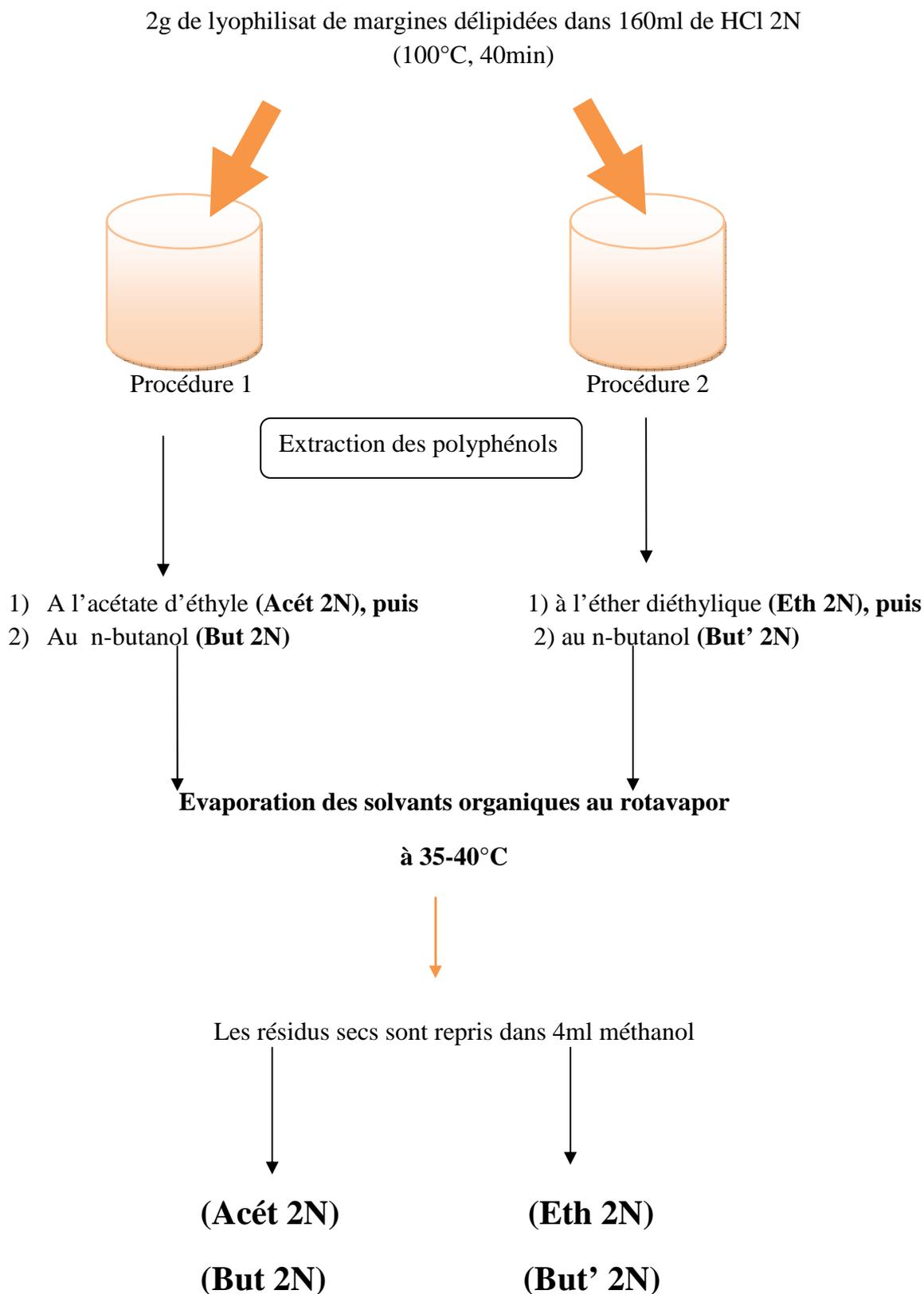


Figure 16: Protocole d'extraction des polyphénols totaux suite à une hydrolyse acide (HCl 2N).

- **Hydrolyse acide avec HCl 6N:**

Cette fois-ci, on effectue le traitement sur l'échantillon sous sa forme liquide, les margines délipidées subissent un traitement acide en l'opérant dans un solvant constitué de volumes égaux de HCl 6 N et de margines délipidées. Le mélange est porté au bain-marie bouillonnant pendant exactement 5 min. Deux essais ont été réalisés à des fins comparatives ultérieures (figure 17), après refroidissement, les ppt sont extraits comme suit :

-Essai 1 :

- **Extraction à l'acétate d'éthyle :** pour ce deuxième essai, une première extraction a été faite par l'acétate d'éthyle (3 lavages), ce dernier est recueilli après centrifugation du mélange (à 4000g pendant 20 min) et contiendrait les formes aglycones et éventuellement les formes mono-hétérosidiques. Il correspond à la fraction (Acét 6N).
- **Extraction au *n*-butanol :** la phase aqueuse résultante du lavage à l'acétate d'éthyle est mélangée au *n*-butanol en vue de l'extraction des formes glycosylées n'ayant pas pu être extraites par l'acétate d'éthyle. Cet extrait est récupéré après une centrifugation à la même vitesse de rotation du rotor. Il est abrégé par (But 6N).

-Essai 2 :

- **Extraction par l'éther diéthylique :** la phase aqueuse acide est mélangée au diéther (v/v) (3 fois) pour en extraire les aglycones. Le mélange subit une centrifugation pendant 20 min à 4000g. La phase organique étherée est retenue, elle constitue l'extrait (Eth 6N).
- **Extraction par le *n*-butanol :** les polyphénols glycosylés de la phase aqueuse restante après lavage à l'éther sont extraits au *n*-butanol, trois lavages sont faits. Une centrifugation est réalisée à 4000g pendant 20 min. La fraction récupérée correspond à l'extrait (But' 6N).

Les quatre fractions obtenues sont concentrées séparément par évaporation sous vide au rotavapor à une température de 35°C. Les résidus secs sont repris dans du méthanol constituant ainsi les solutions extractives obtenus nommés (Eth 6N, But 6N, Acét 6N et But' 6N).

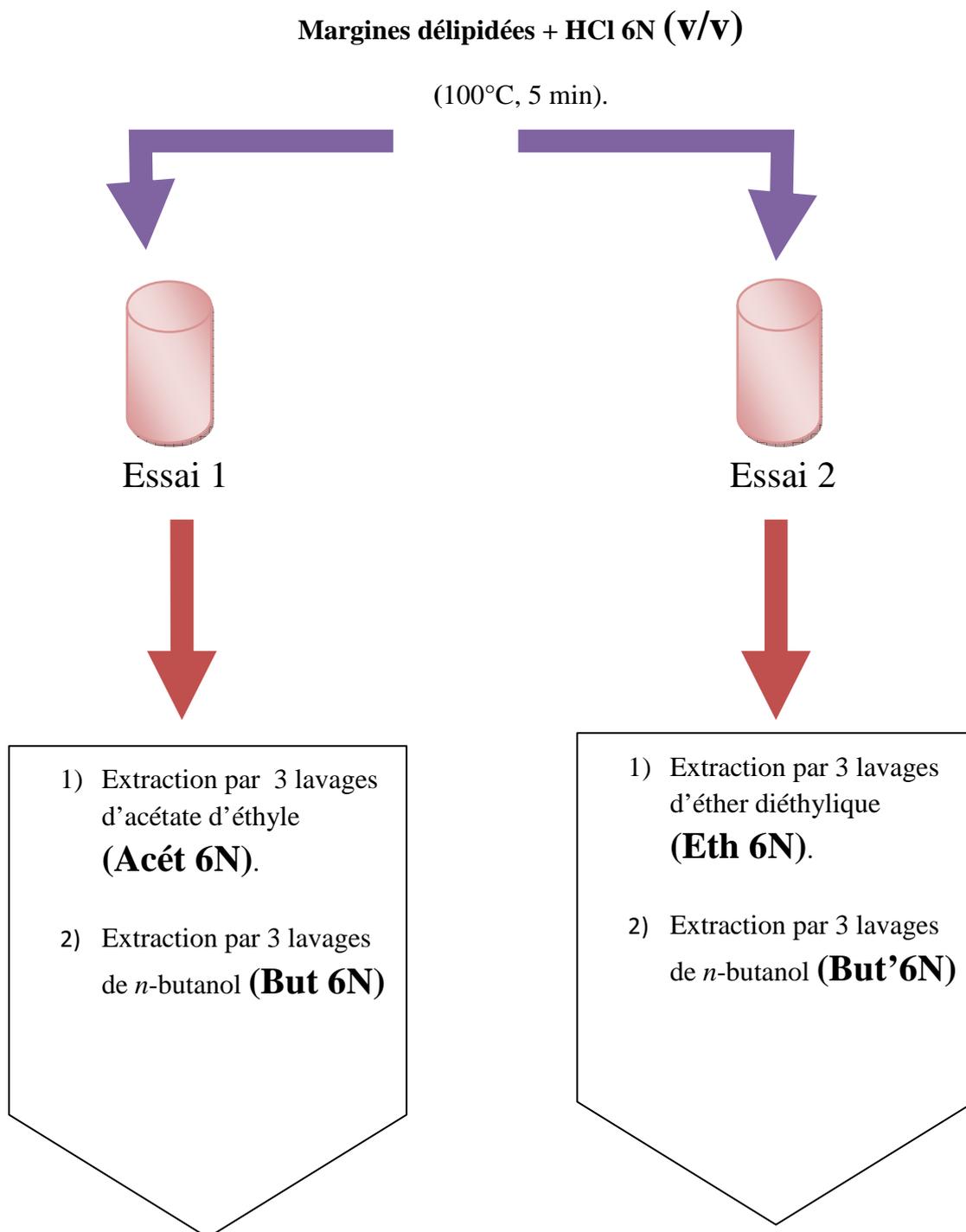


Figure 17: Protocole expérimental d'extraction de polyphénols totaux issus d'un traitement d'hydrolyse chimique ménagée utilisant l'acide chlorhydrique 6N (Inspiré par la méthode décrite par RIBEREAU-GAYON (1968)).

1.2.2.2. Hydrolyse alcaline suivie d'une hydrolyse acide

L'hydrolyse alcaline utilisée est celle adaptée par la méthode de RIBEREAU-GAYON (1968). Elle est conduite dans un milieu NaOH 2N à température ambiante, sous une atmosphère vidée, pendant 4 heures, cette étape est suivie d'un traitement acide, ce dernier consiste en une acidification à HCl concentré jusqu'à obtention d'un pH identique à celui de HCl 2N, puis porter au bain-marie bouillonnant pendant 3 minutes (figure 18). Ce type d'hydrolyse est destiné à rompre les liaisons esters et les liaisons C-O-C pouvant relier le sucre aux polyphénols, éventuellement.

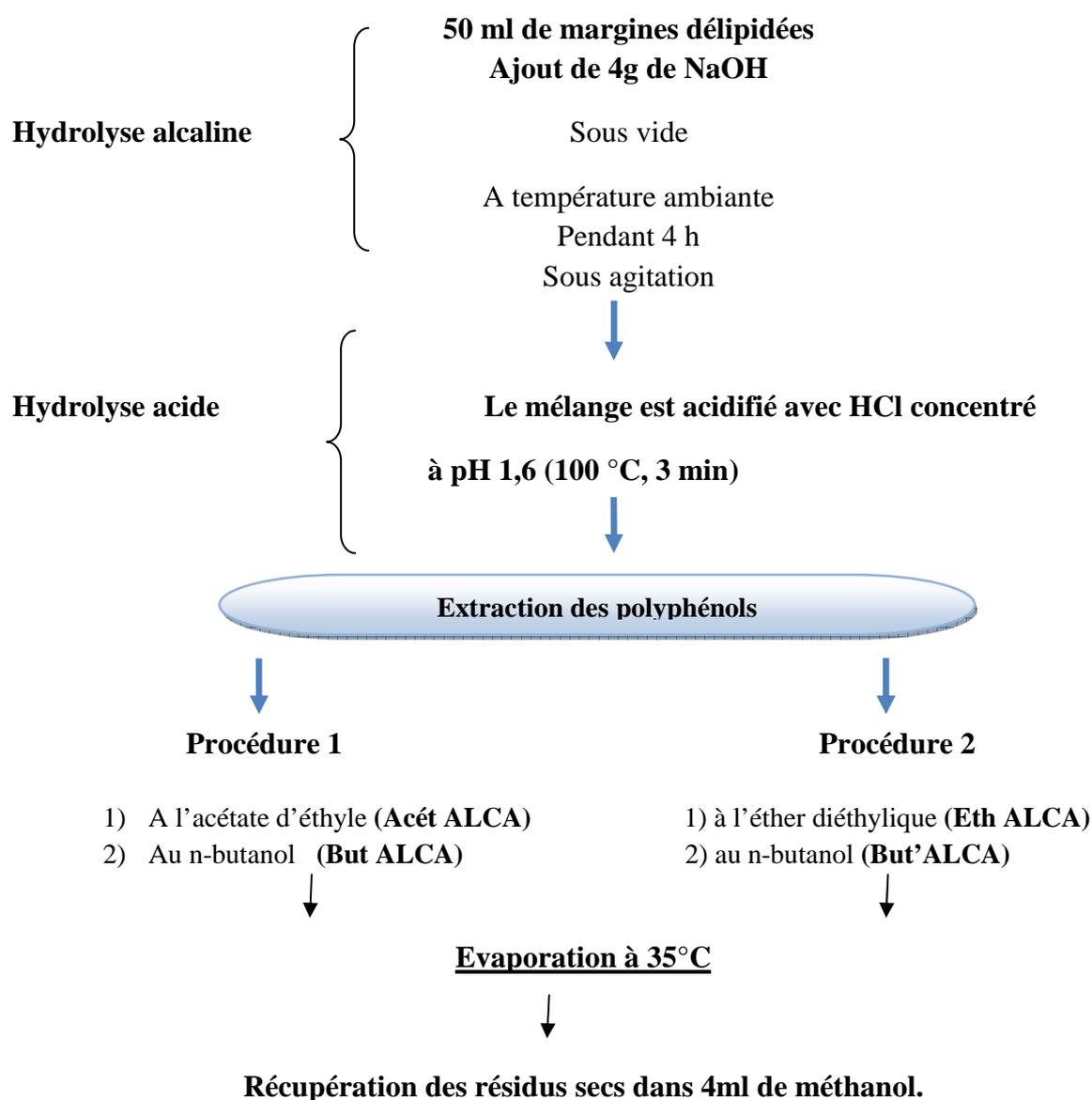


Figure 18 : Protocole d'extraction des acides phénoliques (RIBEREAU-GAYON, 1968).

1.2.3. Caractérisations quantitative et qualitative des extraits phénoliques

1.2.3.1. Analyse quantitative des extraits phénoliques obtenus

1.2.3.1.1. Détermination de la matière sèche totale des margines

La matière sèche totale (MST) correspond au résidu sec appelé parfois extrait sec. Il s'agit des matières restantes après séchage de l'échantillon à 105°C jusqu'à obtention d'un résidu sec à poids constant. La matière sèche comprend à la fois les matières en suspension et les composés dissous.

Pour notre étude, elles ont été déterminées par étuvage (à 105°C) aussi bien pour les margines brutes que pour les margines délipidées. Elles servent à exprimer la quantité des composés dosés par spectrophotométrie, en milligrammes contenus dans 1 gramme de MST.

1.2.3.1.2. Dosage des composés phénoliques par colorimétrie

La teneur en composés phénoliques des différents extraits obtenus à partir des margines traitées et non traitées a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique 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. Les solutions des différents échantillons à doser et la gamme étalon sont préparées de la même manière et dans les mêmes conditions.

A 125 µl de chaque extrait ou dilution, sont ajoutés 500µl d'eau distillée puis 125 µl du réactif Folin-Ciocalteu, six minutes plus tard, 1,25 ml de la solution aqueuse de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7% (annexe 10) sont additionnés au milieu réactionnel puis le mélange est ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée. Après 60 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm au spectrophotomètre contre un blanc sans extrait (figure 19). 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 quantité des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200µg/ml) (annexe 10) et est exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matières sèches totales des margines brutes et de margines délipidées selon le cas.

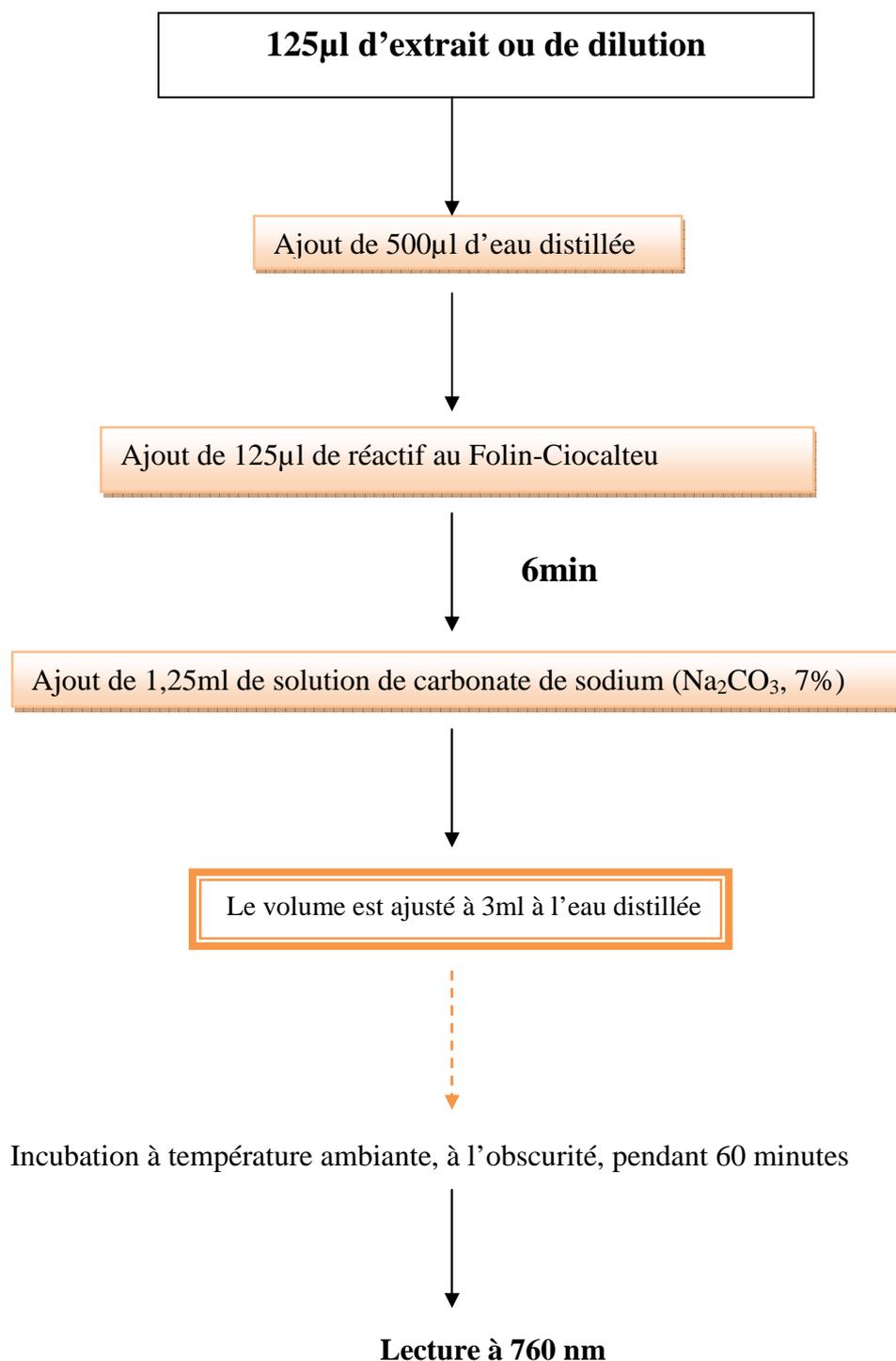


Figure 19 : Etapes de dosage des polyphénols selon SINGLETON et ROSSI (1965).

1.2.3.1.3. Dosage de flavonoïdes totaux par spectrophotométrie

L'évaluation quantitative des flavonoïdes totaux dans les différentes fractions est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (BAHORUN *et al*, 1996). A 1 ml de chaque échantillon est ajouté 1ml de solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2% dans le méthanol (annexe10). Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm (figure 20). Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (1-25 $\mu\text{g/ml}$) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matières sèches totales (MST).

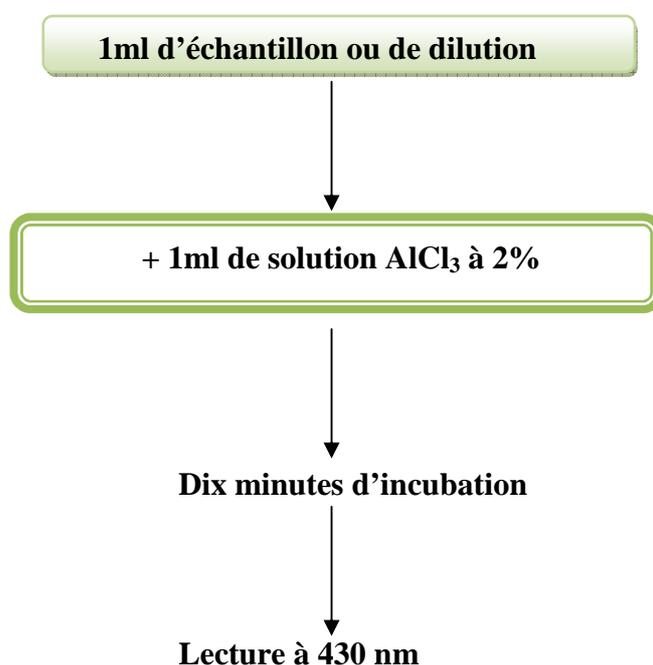


Figure 20 : Dosage des flavonoïdes totaux par la méthode publiée par (BAHORUN *et al*, 1996).

1.2.3.1.4. Détermination de la teneur en tanins totaux

Seules les solutions extractives obtenus à partir des margines non traitées sont utilisées lors de ce test afin de bien caractériser l'échantillon de départ avant d'apporter tout traitement chimique. Ces mêmes extraits sont utilisés aussi bien pour la quantification des phénols totaux que les tanins. La quantité de ces derniers est estimée en utilisant la méthode par la précipitation à la caséine avec quelques modifications après optimisation. On prélève 6 ml d'aliquote de chaque échantillon et on ajoute 12 ml d'eau distillée ; 1g de caséine en poudre et on agite pendant 3 heures. Un blanc sera fait avec 18 ml d'eau distillée et 1g de caséine. On filtre avec du papier Whatman N°1. Chaque bécher utilisé est soigneusement rincé avec 10ml d'eau distillée et on ajuste le filtrat à 25ml. Un aliquote de 2 ml de ces solutions est prélevé pour la détermination des phénols. La quantité de tanins est donnée par la différence entre la quantité des phénols totaux et celle obtenue après fixation des tanins sur la caséine (LI *et al*, 2011).

1.2.3.1.5. Dosage de sucres totaux

La quantité de sucres totaux est déterminée par spectrophotométrie. La méthode utilisée est celle décrite par DUBOIS *et al.* (1956). Les sucres simples, oligosaccharides, polysaccharides et leurs dérivés réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orange. La réaction est sensible, la coloration reste stable pendant plusieurs heures. Pour les margines, 1ml de l'échantillon (extrait méthanolique) est mélangé à 1 ml d'une solution phénolique (5%) et 3ml d'acide sulfurique concentré (97%). Après agitation, les tubes sont conservés à l'obscurité pendant 10 min puis transférés dans un bain marie à 30 °C pendant 30 min. La densité optique est mesurée à 488 nm. Les valeurs obtenues sont traduites en concentration par référence à une courbe étalon de D-glucose préalablement établie de concentrations allant de 0 à 60µg/ml.

1.2.3.2. Analyse qualitative des extraits méthanoliques

1.2.3.2.1. Mise en évidence de la présence des tanins par le test au FeCl₃.

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait méthanolique, 2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ à 1% (Annexe 10). Une coloration bleu-noire indique la présence de tanins galliques et une coloration vert-noire la présence de tanins catéchiques (figure 21).

Si on a un mélange des deux, une solution de formaldéhyde-chlorhydrique est additionnée à 10 ml d'extrait, l'ensemble est chauffé jusqu'à ébullition. Les catéchols se condensent en précipité rouge que l'on peut filtrer. Le filtrat est neutralisé avec l'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl₃ à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une coloration bleue indique la présence des tanins galliques (TREASE et EVANS, 1987).

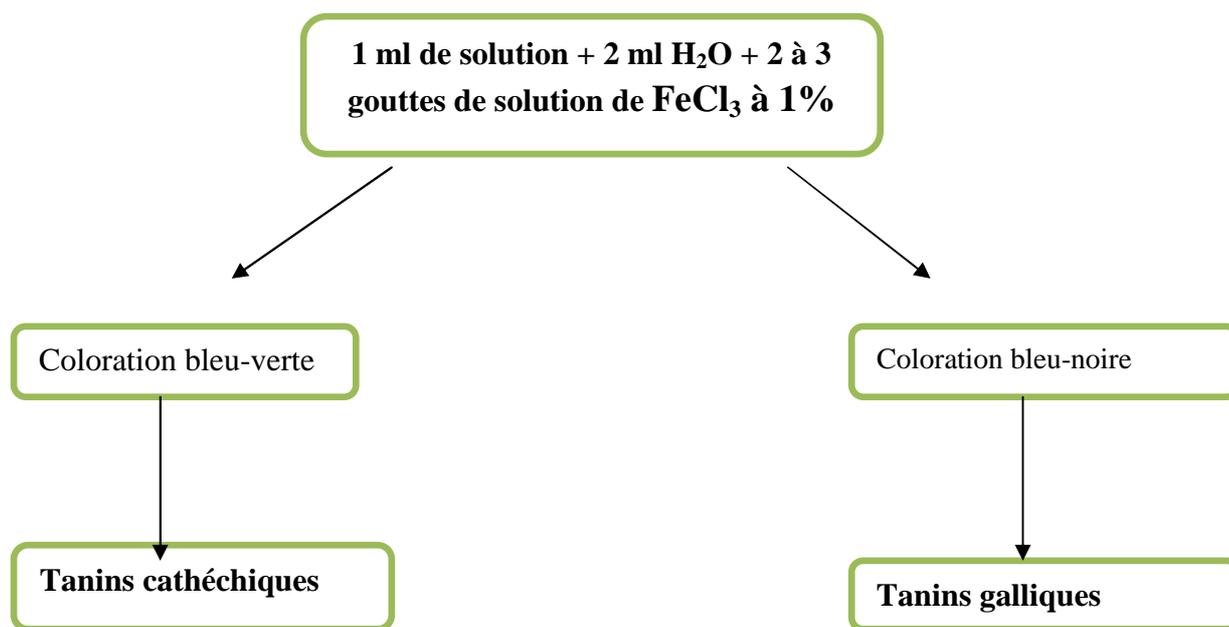


Figure 21 : Mise en évidence de la présence de tanins dans un extrait phénoliques selon TREASE et EVANS, (1987).

1.2.3.2.2. Recherche des anthocyanes

2 ml d'extrait sont ajoutés à 2 ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose- rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniaque indique la présence d'anthocyanes (Figure 22) (RIBEREAU-GAYON, 1968).

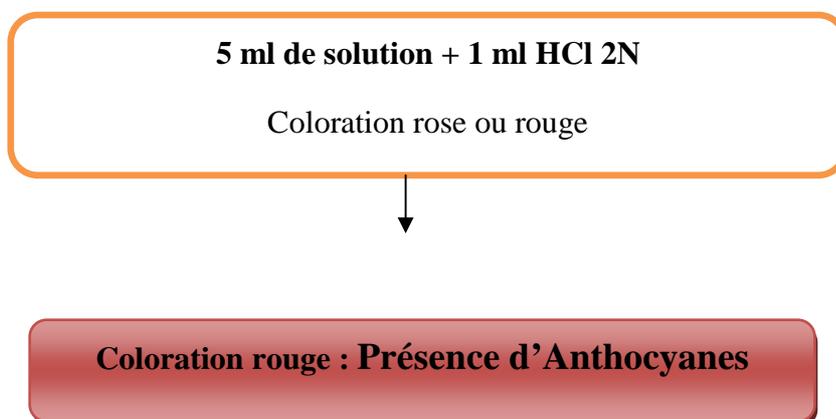


Figure 22 : Recherche des anthocyanes dans un extrait végétal.

1.2.3.2.3. Caractérisation par chromatographie sur couche mince

- **Principe de la méthode**

Toute méthode de chromatographie est basée sur la distribution des substances à séparer entre deux phases. La phase mobile s'écoule au long d'une phase stationnaire. Selon leur affinité, les substances en solution sont plus ou moins retenues par la phase stationnaire, ce qui rend possible leur séparation. Il existe plusieurs applications pratiques, les phases peuvent en particulier être solides, liquides ou gazeuses.

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire solide fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires, ceci est valable lorsque l'éluant est à caractère peu polaire ou apolaire. Après avoir déposé les échantillons sur des points repères à environ 1cm du bord inférieur de la plaque, les dépôts sont séchés et la plaque est introduite dans une cuve de migration dont l'enceinte est préalablement saturée (annexe 11).

-Révélation des composés séparés

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes : radiations UV, fluorescence, iode, ou atomisation. Sauf indications contraires, nous utiliseront les radiations UV. En exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés apparaissent sous forme de taches brillantes. Si un indicateur fluorescent est incorporé à l'adsorbant, la plaque entière devient fluorescente lorsqu'elle est soumise à une radiation UV; les composés y sont révélés sous forme de taches sombres.

-Calcul du rapport frontal (R_f)

$$R_f = D_c / D_s$$

Où

D_c : distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache)

D_s : distance parcourue par le front du solvant.

- **Protocole expérimental**

Dans la présente étude, les échantillons sont analysés en utilisant des plaques commerciales prêtes à être utiliser, de gel de silice de dimension (20x20cm).

- Plusieurs systèmes de solvants ont été essayés

I : Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau (v/v/v) (100/13,5/10) (RADOMIR *et al*, 2010).

II : Chloroforme/Acétate d'éthyle/Acide acétique (v/v/v) (50/50/10) (CHA *et al*, 2011).

III : Chloroforme/Méthanol/Acide acétique/Eau (100/15/0,3/0,5) (AMIOT *et al*, 1995).

IV : Chloroforme/Acétate d'éthyle/Acide formique (50/40/10) (RIOV et GOTTLIEB, 2006).

V : Acide acétique 2 % et 15 % (RIBEREAU-GAYON, 1968).

Seuls les deux systèmes (II) et (IV) ont montré une bonne séparation.

1.2.3.3. Etude de l'activité anti-oxydante

La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel d'activité anti-oxydante (MEIR *et al*, 1995 ; APAK *et al*, 2007). La réduction du Fe^{3+} est souvent employée pour étudier la capacité d'une substance à donner des électrons. Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action anti-oxydante (EBRAHIMZADEH *et al*, 2008).

1.2.3.3.1. Test du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium

-Principe

Le pouvoir réducteur est basé sur la transformation de Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} en présence d'un antioxydant qui a le pouvoir de céder des électrons. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés.

-Protocole expérimental

L'activité réductrice du fer des extraits phénoliques obtenus avant et après déglycosylation est déterminée selon la méthode décrite par OYAIZU (1986), modifiée par CHEW *et al*. (2009) qui est basée sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} impliquant le mécanisme de transfert des électrons.

Ainsi 2,5 ml des CPM de concentration d'environ 10 μ g/ml ont été mélangés avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et 2,5 ml de ferrocyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) (1%) (Annexe 10). Le mélange ainsi obtenu a été incubé à 50 °C pendant 20 min. Ensuite, est ajouté au mélange 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) (Annexe 10) pour arrêter la réaction. Le mélange subit une centrifugation à 3000xg pendant 10 min. Le surnageant est récupéré, 2,5 ml de ce dernier ont été mélangés avec le même volume d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de $FeCl_3$ à 0,1%. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. La même procédure est réalisée pour les autres concentrations des CPM avant et après traitements d'hydrolyse, à savoir 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70,80, 90 et 100 μ g/ml dans l'eau distillée.

La même expérience a été réalisée pour l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide ascorbique, et l'oleuropeine à différentes concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 μ g/ml dans l'eau distillée). Les essais ont été répétés 3 fois pour l'ensemble des composés testés.

1.2.3.3.2. Capacité de piégeage d'espèces radicalaires

- Réaction entre le radical libre DPPH[•] et l'antioxydant

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 23). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, donc le DPPH[•] reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH[•]. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleu-violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH[•], mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

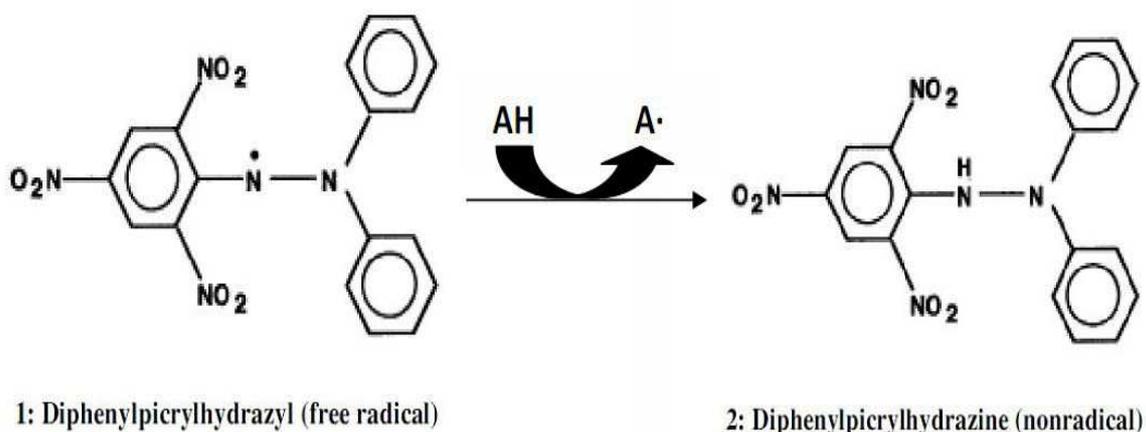


Figure 23 : Structure de DPPH[•] (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH.

Le test DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH[•] donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH[•] par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (MOLYNEUX, 2004).

Dans la réaction ci-dessous (1), le radical DPPH est représenté par Z[•] et la molécule du donneur par AH, la réaction primaire est: $Z^{\bullet} + AH => ZH + A^{\bullet}$ (1)

ZH est la forme réduite du radical DPPH[•]. Notons que compte tenu de la solubilité en milieu organique du DPPH, cette méthode est plus adaptée pour les dosages qui se déroulent en milieu alcoolique (méthanol et éthanol) (MANSOURI *et al*, 2011).

- **Evaluation du potentiel anti-radicalaire**

Pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH[•] à un temps de référence (par exemple après une heure du début de la réaction) ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH[•] et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction (SANCHEZ-MORENO *et al.*, 1998 ; GODOY et SCHERER, 2009). Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage % RSA (Radical Scavenger Activity) ou pourcentage d'inhibition (% I), ou l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (contrôle négatif) à un temps t :

$$\% \text{ RSA} = [(\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle négatif}] \times 100\%$$

- **Protocole expérimental :**

Le protocole expérimental utilisé est celui de BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995). La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100ml de méthanol. 50µl des solutions d'extraits phénoliques ou standards sont ajoutés à 2ml de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 1heure et la décoloration par rapport au contrôle négatif qui contient uniquement la solution de DPPH qu'on mesure à 517nm. Dans notre test le contrôle positif est représenté par une solution d'acide gallique synthétique comme un antioxydant standard. Les concentrations des extraits phénoliques de margines (avant et après déglycosylation) dans le milieu réactionnel, ainsi que celle de l'acide gallique utilisé comme témoin dans plusieurs tests, sont de 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100 ; 150 ; 200 et 250µg/ml. La diminution de l'absorbance est évaluée par le pourcentage d'inhibition (% I) et l'IC50 (quantité équivalente en extrait qui neutralise 50% du DPPH). Une IC50 faible correspond à une activité antioxydante ou anti-radicalaire élevée de l'extrait. Ce paramètre a été introduit par BRAND-WILLIAMS et ses collaborateurs (1995) et a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995 ; BOSKOU *et al.*, 2006 ; LOŽIENE *et al.*, 2007; CHEW *et al.*, 2009).

Le pouvoir antiradicalaire APR est inversement proportionnel à l'IC50 (APR=1/IC50) (PRAKASH *et al.*, 2007 ; CHEW *et al.*, 2009).

1.2.3.4. Analyse statistique :

Les résultats obtenus suite à l'évaluation de l'activité anti-oxydante (en utilisant le test au DPPH) sont analysés statistiquement. Ils subissent une ANOVA à deux facteurs. L'analyse de la variance (terme souvent abrégé par le terme anglais ANOVA : ANalysis Of VAriance) est un test statistique permettant de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population et/ou présentant des différences. Ce test s'applique lorsque l'on mesure une ou plusieurs variables explicatives catégorielles (appelées alors facteurs de variabilité, leurs différentes modalités étant parfois appelées « niveaux ») qui ont de l'influence sur la distribution d'une variable continue à expliquer. On parle d'analyse à un facteur, lorsque l'analyse porte sur un modèle décrit par un facteur de variabilité, d'analyse à deux facteurs ou d'analyse multifactorielle.

Dans cette étude, ce traitement statistique est réalisé sur ordinateur en utilisant le logiciel STATBOX version 6.4. La variable mesurée prise en compte est le pouvoir anti-oxydant (PAO) mesuré. Les deux facteurs étudiés sont : type solvant et concentration ; puisque la nature des polyphénols retrouvés dans un extrait dépend du type de solvant lui-même ayant servi à leur extraction, et le deuxième facteur (la concentration des ppt des extraits) doit impérativement être pris en compte puisque le pouvoir anti-oxydant est variable en fonction de ce paramètre.



Résultats et discussion

2-Résultats et discussion

2.1. Analyse quantitative

2.1.1. Matières sèches totales

Les matières sèches totales (MST) des margines sont déterminées par étuvage et sont représentées dans le tableau XII.

Tableau XII : Résultats des matières sèches totales.

| Margines | Matières sèches totales (Moyenne \pm Ecart type) (g/l) |
|----------------------------|--|
| Margines brutes | 74,70 \pm 4,10 |
| Margines délipidées | 50,50 \pm 2,12 |

Le taux de matières sèches totales (en g/l) est déterminé (74, 70 \pm 4,10). Il est nettement plus élevé que celui des margines prises comme échantillon par STEEGMANS et FRAGEMAN (1992) (19,2 g/l), et celui des margines étudiées par PAREDES *et al.* (1999) ; par contre, EL ABBASSI *et al.* (2011) ont trouvé que leur échantillon de margines contenait 90 g/l de MST. Ces variations 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 d'huile.

2.1.2. Choix de la méthode d'hydrolyse

L'hydrolyse acide des liaisons hétérosidiques est plus au moins facile selon leur nature ; RIBEREAU-GAYON (1968) a déterminé la vitesse de cette hydrolyse pour différents hétérosides de quelques échantillons végétaux pris pour son étude, en opérant à 100°C dans un solvant constitué de volumes égaux d'échantillon ou d'extrait méthanolique et de solution chlorhydrique (HCl). On peut donc opérer un traitement similaire, la problématique est de trouver la concentration de HCl la plus efficace et la durée de traitement donnant un meilleur taux de polyphénols totaux lors de leur quantification. Pour cela, différentes concentrations de HCl ont été utilisées et testées en des intervalles de 10 min, les polyphénols totaux sont extraits par l'acétate d'éthyle, un même solvant pris comme référence en vue de comparer la quantité extraite en fonction du temps, pour chaque concentration de HCl. Une mise au point de cette méthode d'hydrolyse a été établie. Une représentation graphique est dressée (figure 24).

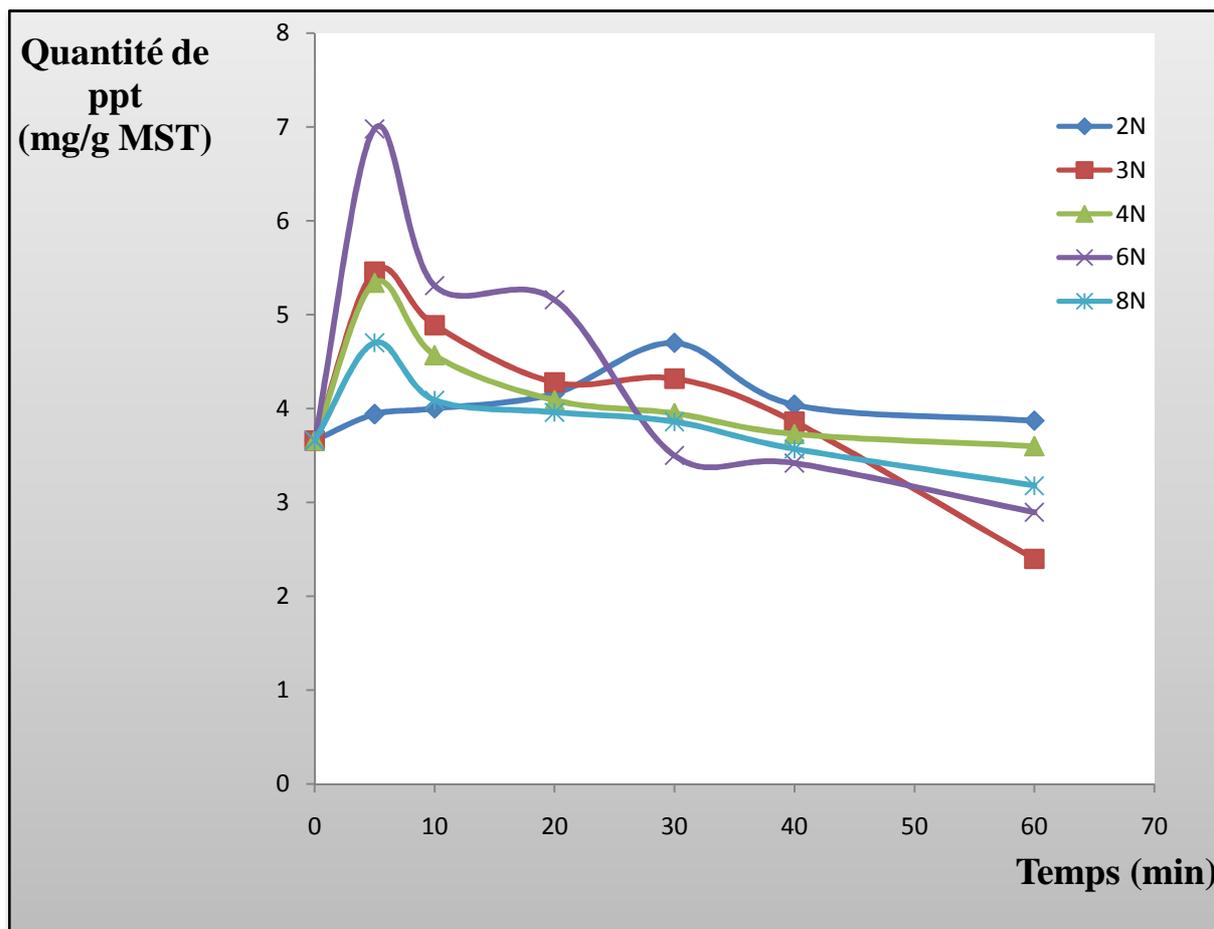


Figure 24 : Optimisation d'une méthode d'hydrolyse acide par des concentrations différentes de HCl. L'hydrolyse se fait dans une solution contenant des volumes égaux d'échantillon de margines et de HCl (V/V).

D'après la représentation ci-dessus, on constate clairement qu'il y a un meilleur taux de polyphénols totaux donné par l'un des traitements essayés. On pourrait donc retenir la concentration de HCl 6N, en une durée relativement plus réduite qui est de 5 minutes. Chose qui, effectivement, a été faite et a servi de comparaison avec le premier type de traitement acide.

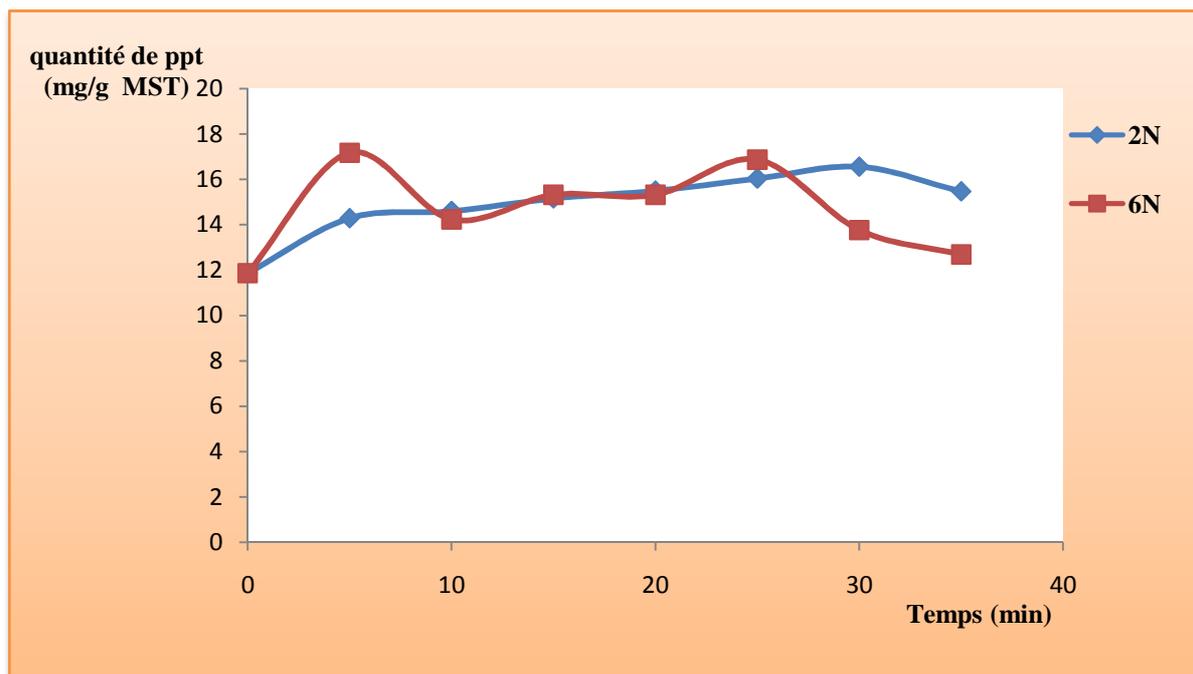


Figure 25 : Optimisation de la méthode d'hydrolyse acide (volumes égaux d'échantillon et de HCl) à 100°C.

2.1.3. Dosage des polyphénols totaux :

L'étape d'extraction des polyphénols à l'acétate d'éthyle est précédée d'une étape d'acidification à pH 2 avec HCl, cette étape est très importante. En effet le milieu acide favorise 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 cela a été confirmé par dosage spectrophotométrique que la quantité de polyphénols dans les margines acidifiées est plus élevée que la quantité de polyphénols dans les margines brutes (OBIED *et al*, 2005 ; DE MARCO *et al*, 2007). Dans notre étude, il est préférable d'extraire les polyphénols à partir des margines brutes telles qu'elles sont rejetées, afin de les quantifier et d'évaluer leur activité puis de les comparer aux polyphénols issus de margines traitées volontairement.

La concentration des ppt est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu à partir d'une courbe étalon utilisant l'AG comme standard (Figure 26), la quantité de ppt a été exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique (EAG)/g de matières sèches totales (MST). En plus de sa sensibilité, cette méthode de dosage présente une reproductivité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon, $R^2 = 0,999$ (figure 26).

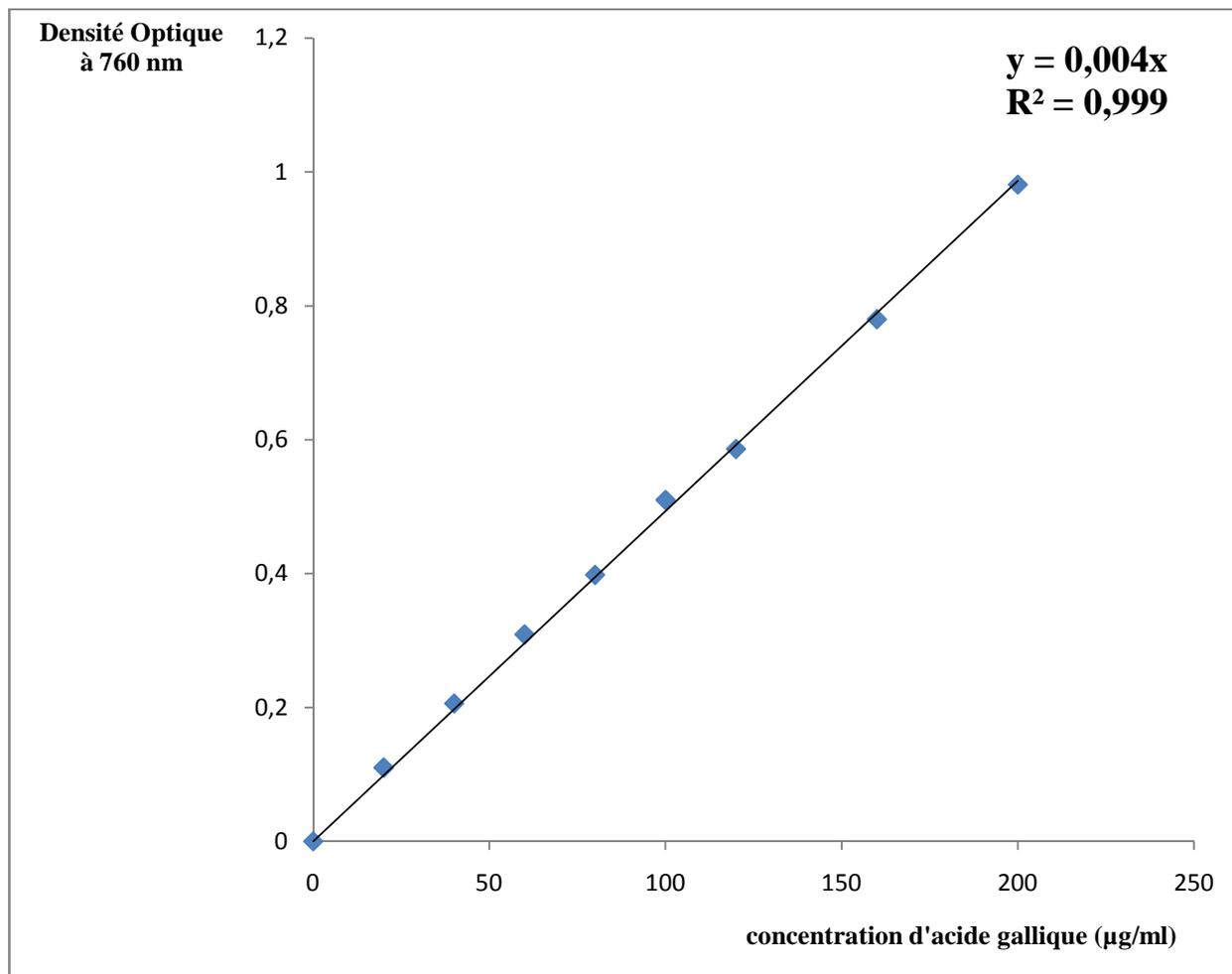


Figure 26 : Courbe d'étalonnage à l'acide gallique.

La détermination quantitative des CP est habituellement réalisée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Cependant, cette méthode n'est pas très spécifique car elle ne donne pas d'indication sur la nature des CP présents dans l'extrait (TASIOULA-MARGARI et OKOGERI, 2001). En outre, certaines substances, telles que la vitamine C, les caroténoïdes, les sucres réducteurs et les acides aminés aromatiques, peuvent en réduisant le complexe phosphotungstique-phosphomolybdénique interférer et conduire à une surestimation de la teneur en CP (OBIED *et al*, 2005). En fait cette méthode donne un aperçu sur la qualité réductrice d'un ensemble de composés en plus des CP.

Cette méthode satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée, la longueur d'onde (760 nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent colorée, c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche à travers le monde (HUANG *et al*, 2013).

Les teneurs des PPT déterminées ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols du matériel de départ, elles sont en fait, basées sur la capacité réductrice relative à une capacité réductrice équivalente à l'acide gallique (EAG). Les valeurs obtenues par la méthode colorimétrique fournissent des informations directes sur la quantité des groupes phénoliques antioxydants de l'extrait qui dépend essentiellement du nombre des groupes hydroxyles de ces derniers (BALASUNDRAM *et al*, 2006).

La quantité de PPT trouvée peut varier selon un certain nombre de facteurs. Les facteurs contribuant à la variabilité dans la teneur en PP pourraient être liés au cultivar, au stade de maturation, des conditions climatiques (température, précipitations), de la période de récolte (CRIADO *et al*, 2004 ; MORELLO *et al*, 2004 ; VINHA *et al*, 2005 ; YOUSFI *et al*, 2006 ; BEN AHMED *et al*, 2007 ; GOMEZ-RICO *et al*, 2008). Les processus technologiques auxquels les olives sont exposées peuvent également affecter de manière significative le contenu phénolique (RYAN et ROBARDS, 1998 et 1999 ; BUTINAR, 2006).

Cependant le profil phénolique varie également selon l'origine. Le profil phénolique des olives de Chine (*Canarium album* L) est totalement différent de celui des olives méditerranéennes (*Olea europaea* L). Dans les olives de Chine l'acide gallique et ellagique sont les PP les plus abondants (HE et XIA, 2007).

Dans cette étape d'étude, les polyphénols extraits des margines sont dosés. Leur taux a été déterminé puis représenté en histogramme (figure 27).

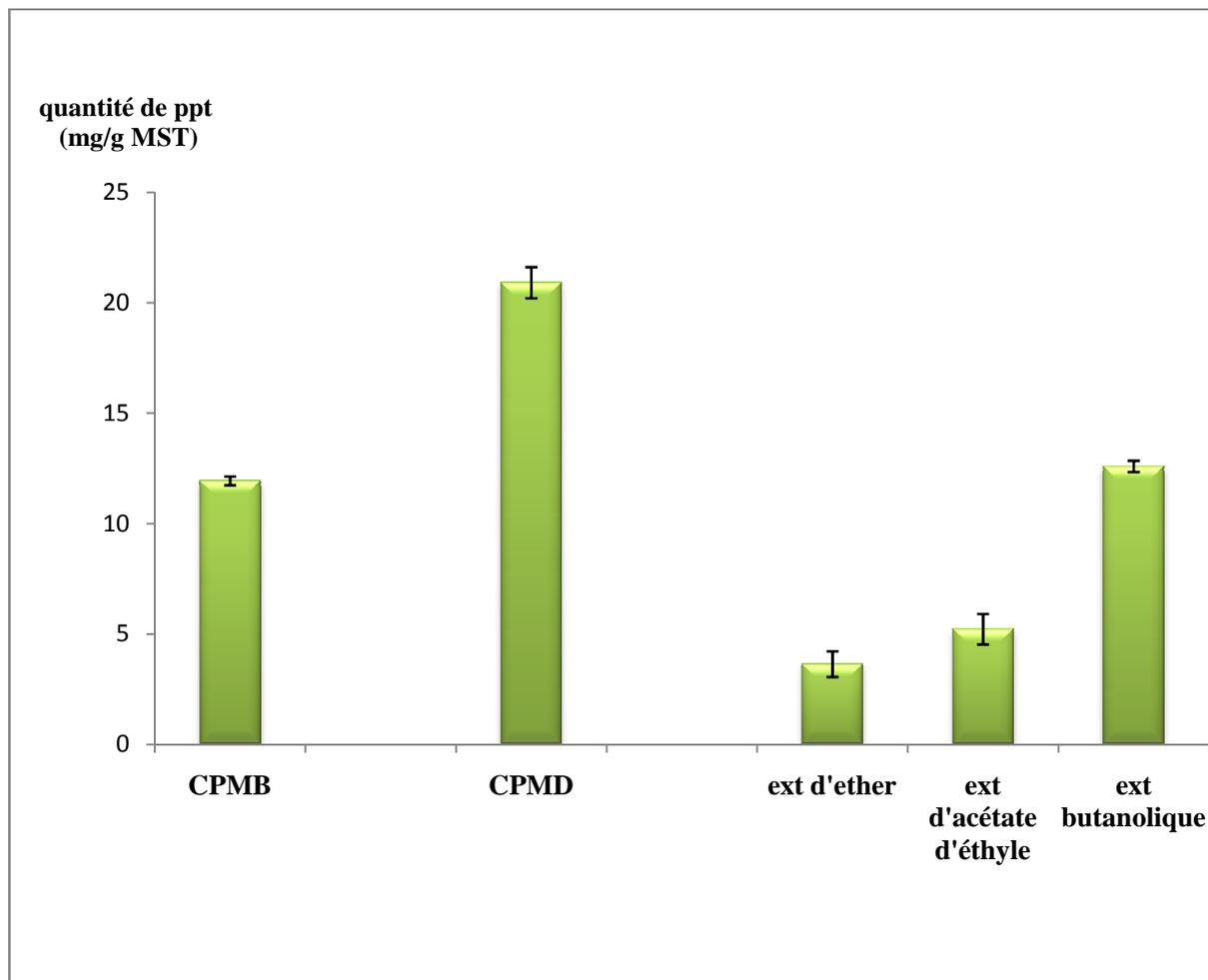


Figure 27 : Quantité de ppt extraits par différents solvants organiques à partir des margines brutes et délipidées, avant hydrolyse. CPMB : composés phénoliques extraits à l'acétate d'éthyle à partir des margines brutes ; CPMD : composés phénoliques extraits à l'acétate d'éthyle à partir des margines délipidées.

D'après les résultats obtenus illustrés par cette figure, la quantité des polyphénols est estimée à $(12 \pm 0,20)$ mg d'EAG/g de matières sèches de margines brutes (CPMB), et celle des polyphénols extraits des margines délipidées est estimée à $(21 \pm 0,70)$ mg EAG/g MST de margines délipidées ; ceci, concerne les polyphénols extraits par l'acétate d'éthyle.

Une autre extraction a été faite, à des fins comparatives. Elle aboutit à trois extraits phénoliques issus des margines délipidées utilisant successivement trois solvants organiques à polarité croissante, pour tester justement leur efficacité et surtout leurs spécificité vis-à-vis de certaines formes phénoliques.

Selon DE MARCO *et al.* (2007, 2013), l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des formes aglycones ou mono O- glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycosides et C-glycosides. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AlCl_3 en utilisant

comme standard la quercétine, les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait.

L'éther utilisé en premier, a pu extraire une quantité d'aglycones, en second, l'acétate d'éthyle qui pourrait remplir la fonction d'extracteur d'une large gamme de structures monoglycosylées ou éventuellement aglycones, le n-butanol, ayant une polarité plus élevée que les deux solvants précédemment cités, semble extraire les formes les plus polaires, ainsi les quantités des PPT estimés pour ces extraits en mg EAG/g de MST de margines délipidées sont respectivement $(3,64 \pm 0,58)$, $(5,22 \pm 0,69)$ et $(12,60 \pm 0,26)$.

2.1.4. Dosage des flavonoïdes totaux :

Les fractions représentant les flavonoïdes totaux (FT) dans les différents extraits phénoliques récoltés avant et après traitements acide et basique, sont déterminées en mg équivalent de quercétine par gramme de matières sèches totales (MST). Les FT ont été quantifiés par la méthode utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3), la quercétine est le flavonoïde pris comme référence pour la courbe d'étalonnage (figure 28).

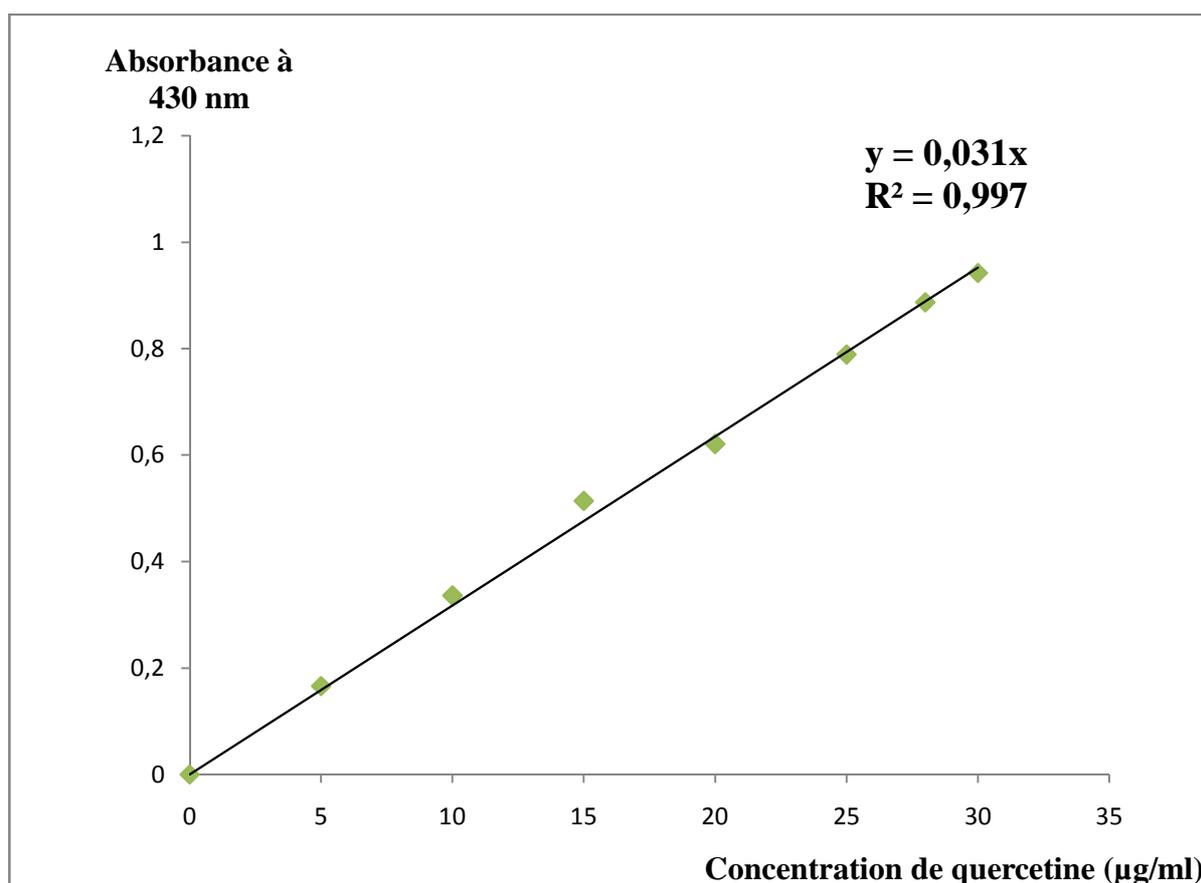


Figure 28 : Courbe étalon à la quercétine ayant servi à quantifier les flavonoïdes totaux.

L'évaluation quantitative des flavonoïdes (la quercétine sert de standard) montre une corrélation positive entre la variation de ce flavonoïde (0 à 30 $\mu\text{g/ml}$) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,997$ (figure 28).

2.1.5. Dosage des sucres totaux :

La détermination du taux de sucres totaux (ST) est réalisée par la méthode utilisant le phénol et l'acide sulfurique (méthode de DUBOIS et *al*, 1956). La courbe étalon ayant servi à la quantification des ST est représentée dans la figure 29.

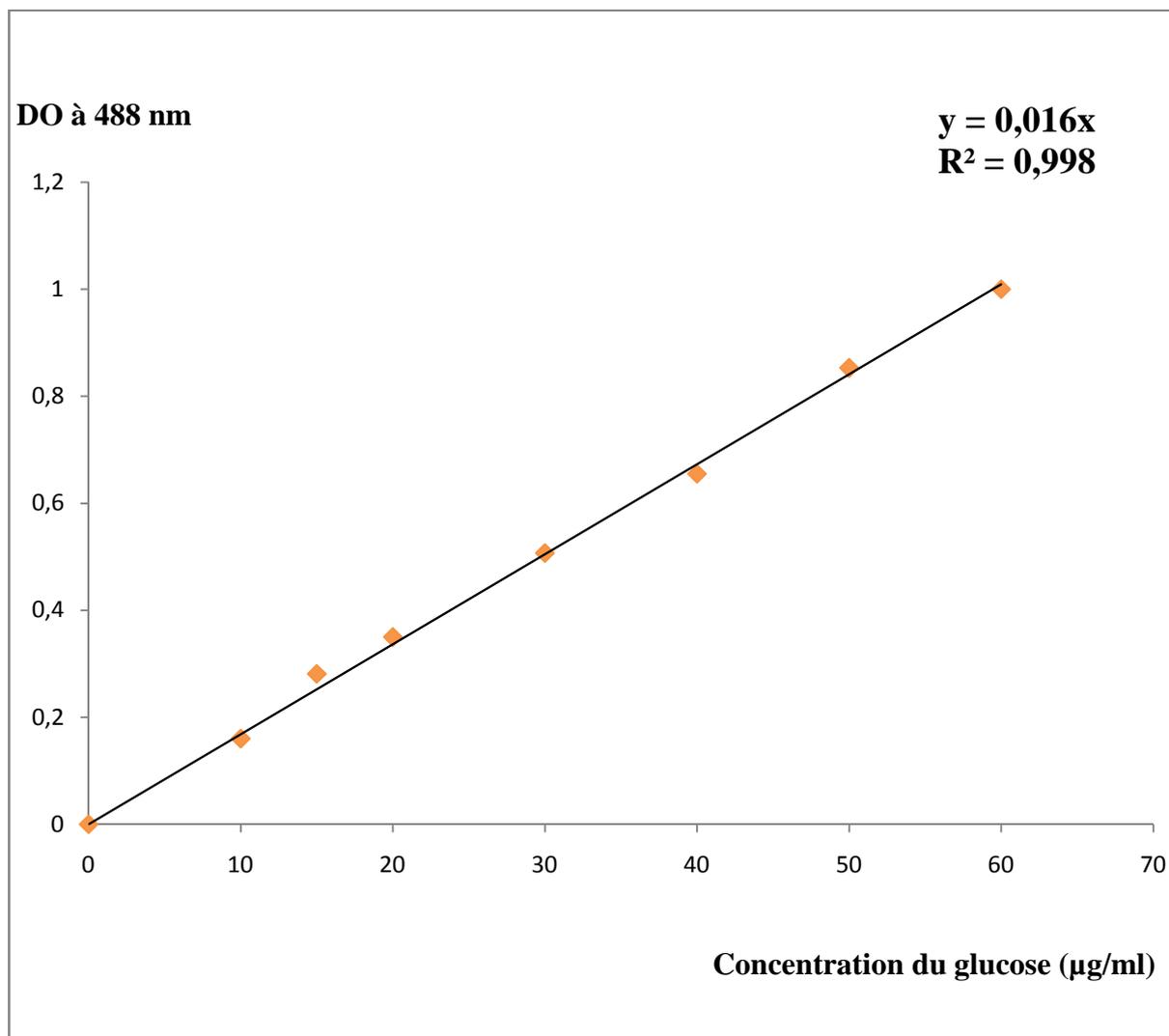


Figure 29 : Courbe d'étalonnage au D-glucose pour le dosage des sucres totaux.

Les résultats de la quantification des sucres totaux montrent que les extraits butanoliques issus des margines avant et après traitements acides et/ou alcalin, sont les plus riches en sucres comparativement aux extraits étherés et d'acétate d'éthyle, ce qui prouverait la présence des CP à haut degré de glycosylation (plus polaires) dans les extraits phénoliques au *n*-butanol.

2.1.6. Dosage des tanins totaux:

La quantité de tanins des extraits méthanoliques est déterminée en utilisant leur propriété à précipiter les caséines. Ces dernières ont été obtenues après leur fractionnement et leur isolement à partir du lait bovin cru selon le protocole utilisé dans notre laboratoire. Après ajout des caséines, les tanins ont tendance à se lier à ces protéines, formant ainsi des complexes plus denses qui précipitent, formant un culot après centrifugation. Le surnageant contiendrait les polyphénols solubles autres que les tanins. De ce fait, la quantité de tanins totaux correspond à la différence entre la quantité de polyphénols totaux avant la précipitation à la caséine et celle obtenue en dosant les polyphénols du surnageant. Elle est exprimée en mg EAG/g de MST.

La fraction que représentent les tanins de la fraction phénolique totale a été déterminée, comme l'a montré le tableau XIII, la quantité de ppt extraits avec l'acétate d'éthyle (CPMB) à partir des margines brutes est de $(12 \pm 0,2)$ mg EAG/g de MST et celle des tanins est $(9,145 \pm 0,035)$ mg EAG/g de MST soit 76% environ.

Quant aux composés phénoliques extraits à partir des margines par trois solvants organiques à polarité différente, il a été établi que les quantités de tanins totaux représentent près de 42%, 9,77% et 38,57% de la fraction totale, extraits respectivement par l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol.

Tableau XIII : Tableau récapitulatif des résultats de dosages spectrophotométriques effectués sur les extraits des margines brutes et délipidées.

| | Polyphénols totaux (mg EAG/g MST) | Flavonoïdes totaux (mg/g MST) | Sucres totaux (mg/g MST) | Tanins totaux (mg/g MST) |
|------|--|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| CPMB | 12 ± 0.2 | 0,245 ± 0 | 5,023 ± 0,587 | 9,145 ± 0,035 |
| CPMD | 21 ± 0.70 | 0,390 ± 0,007 | 9,756 ± 0,006 | Non dosés |
| Eth | 3,64 ± 0.58 | 0,190 ± 0,039 | 1,283 ± 0,040 | 1,54 ± 0,20 |
| Acét | 5,22 ± 0.69 | 0,151 ± 0,002 | 5,373 ± 0,504 | 0,51 ± 0 |
| But | 12,60 ± 0.26 | 0,480 ± 0,03 | 24 ± 0 | 4,86 ± 0,22 |

Les résultats de ce tableau ont été repris puis représentés en histogrammes (figure 30) pour mieux cerner les différences existant entre la contenance des différents extraits méthanoliques en composés dosés (polyphénols, sucres, et flavonoïdes).

La quantité de sucres liés et/ou libres se retrouvant dans l'extrait phénolique ; la plus grande partie (majorité) correspond à la fraction glucidique liés au composés phénoliques. 412 mg/g MS est la quantité de sucres totaux représentant la fraction glucidique totale dans les margines délipidées (à l'hexane) estimée par la méthode de DUBOIS et *al.* (1956).

Une petite partie seulement de cette quantité passe, lors de l'extraction à l'acétate d'éthyle des composés phénoliques, dans l'extrait phénolique (méthanolique) et est estimée à 15,47 mg/g de MS (soit 3,75 %).

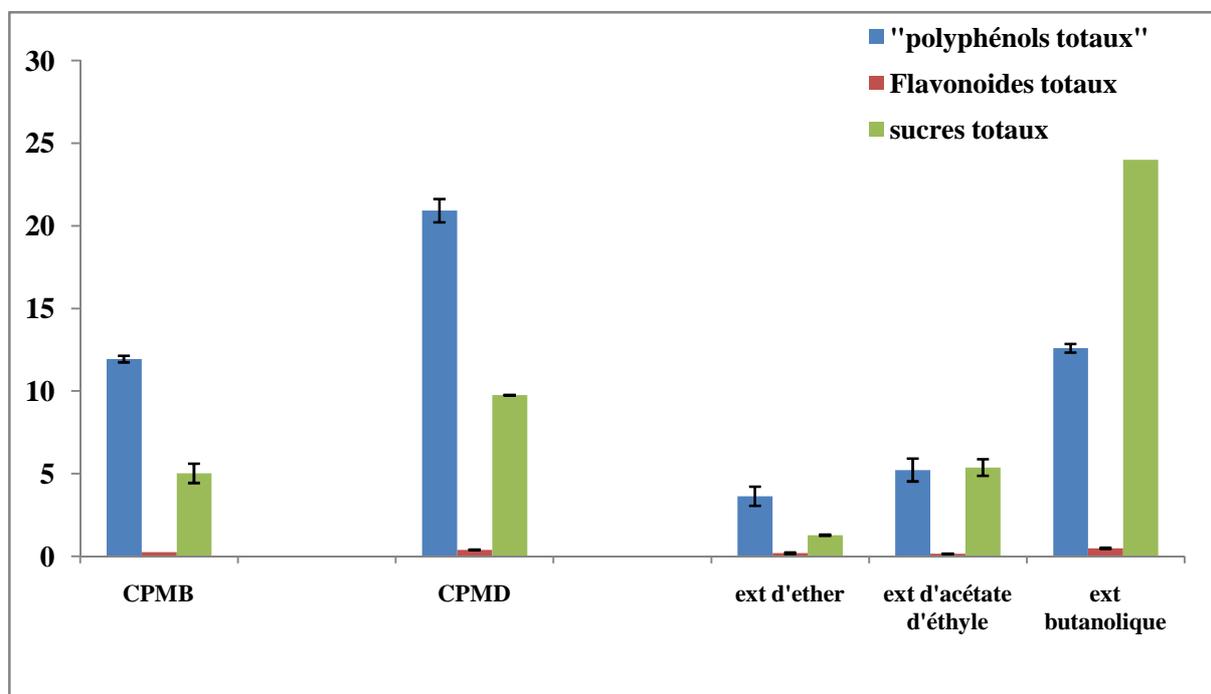


Figure 30: Histogrammes représentant les taux de composés dosés dans les extraits phénoliques issus des margines avant les hydrolyses.

CPMB : extrait à l'acétate d'éthyle à partir des margines brutes.

CPMD : extrait à l'acétate d'éthyle à partir des margines délipidées.

Ext d'ether : extrait étheré obtenu à partir des margines.

Ext d'acétate d'éthyle : extrait d'acétate d'éthyle obtenu après l'extraction à l'éther.

Ext butanolique : extrait au *n*-butanol obtenu après l'extraction à l'acétate d'éthyle.

L'acétate d'éthyle semble extraire l'ensemble des polyphénols retrouvés dans les margines. La somme des quantités de PPT extraits par les trois solvants est presque identique à la quantité de PPT extraits par l'acétate d'éthyle seul (21mg/g de MST). Nous pouvons dire que ce sont les mêmes composés phénoliques des margines pouvant se présenter sous différentes formes structurales (aglycones, hétérosides, polymères...) et sont extraites par différents solvants organiques à polarités différentes. De plus, AIT BADDI *et al.* (2008) ont démontré que l'acétate d'éthyle exerce lui aussi un haut pouvoir d'extraction.

L'utilisation de l'hexane ou le chloroforme n'augmente pas la concentration des PPT dans l'extrait mais elle permet d'éliminer la fraction lipidique du matériel végétal (DE MARCO *et al.*, 2007).

Les teneurs en flavonoïdes des extraits obtenus à partir des margines sont représentées sous forme de pourcentages par rapport à la fraction phénolique totale. Les résultats sont représentés en histogrammes dans la figure 31.

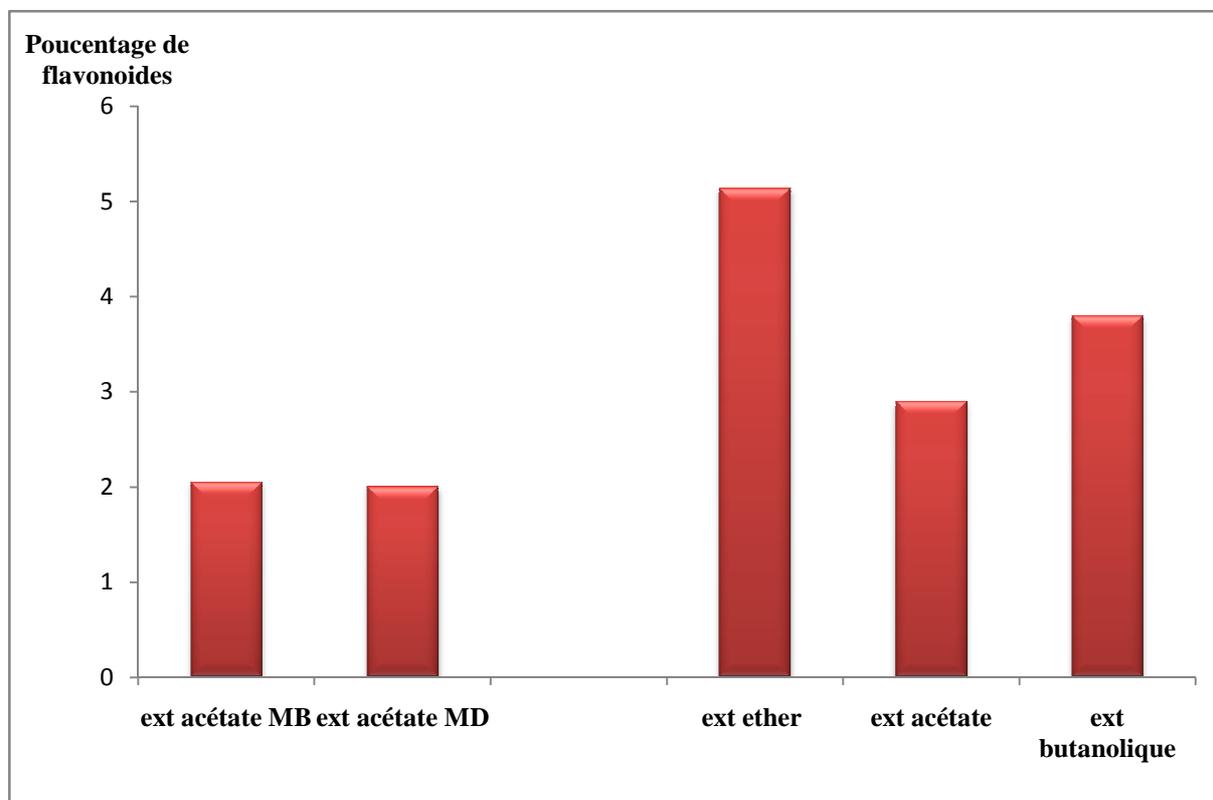


Figure 31: Représentation graphique des flavonoïdes en pourcentages (%) par rapport à la fraction phénolique totale pour chaque extrait obtenu avant traitement d'hydrolyse.

- **Analyse quantitative des extraits issus de l'hydrolyse acide (HCl 2N)**

Le traitement à l'acide chlorhydrique apporté est destiné à rompre les liaisons C-O-C reliant les sucres aux polyphénols. Le but de cette étape est de vérifier si le taux de polyphénols, de sucres et de flavonoïdes varie après hydrolyse acide avec HCl 2N. Les quantités des composés dosés sont représentées dans le tableau XIV.

Tableau XIV: Teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en sucres totaux extraits après traitement avec HCl 2N.

| Les différents hydrolysats | PPT | Flavonoïdes totaux | Sucres totaux |
|----------------------------|--------------|--------------------|-----------------|
| Acét 2N | 45,60 ± 0,79 | 1,925 ± 0,33 | 37,300 ± 1,98 |
| But 2N | 28,75 ± 0,79 | 4,665 ± 0,078 | 167,812 ± 10,87 |
| Eth 2N | 35,70 ± 0,23 | 1,010 ± 0,30 | 18,767 ± 0,64 |
| But' 2N | 39,50 ± 0,50 | 6,710 ± 0,78 | 102 ± 7,42 |

Pour mieux caractériser les différences quantitatives existant entre ces extraits, les valeurs de ce tableau ont été reprises en histogramme (figure 32).

Cette représentation montre qu'il y a une augmentation du taux de PPT suite au traitement hydrolytique prouvant ainsi leur libération de toutes combinaisons antérieures.

La quantité de PPT extraits par l'éther (Eth 2N) est de (35,70 ± 0,23) mg EAG/g de MST alors que celle extraite par (But' 2N) est de (39,50 ± 0,50) alors que la teneur en polyphénols extraits par l'acétate d'éthyle (Acét 2N) est de (45,60 ± 0,79) prouvant ainsi que l'acétate d'éthyle, en plus des aglycones, peut extraire les mono-O-glycosides comme a été rapporté par LIU *et al.* (2014). Ce même auteur a également rapporté que le *n*-butanol avait une spécificité pour les formes di et triglycosylées, puisqu'il est très polaire. Du moment que l'acétate d'éthyle a pu extraire quelques formes glycosylées le butanol n'a pu extraire que (28,75 ± 0,79) mg EAG/g de MST quantité relativement faible par rapport à l'extrait butanolique obtenu après l'extraction à l'éther puisque ce dernier a pu extraire les formes aglycones, le *n*-butanol dans ce cas a extrait plus de formes glycosylées.

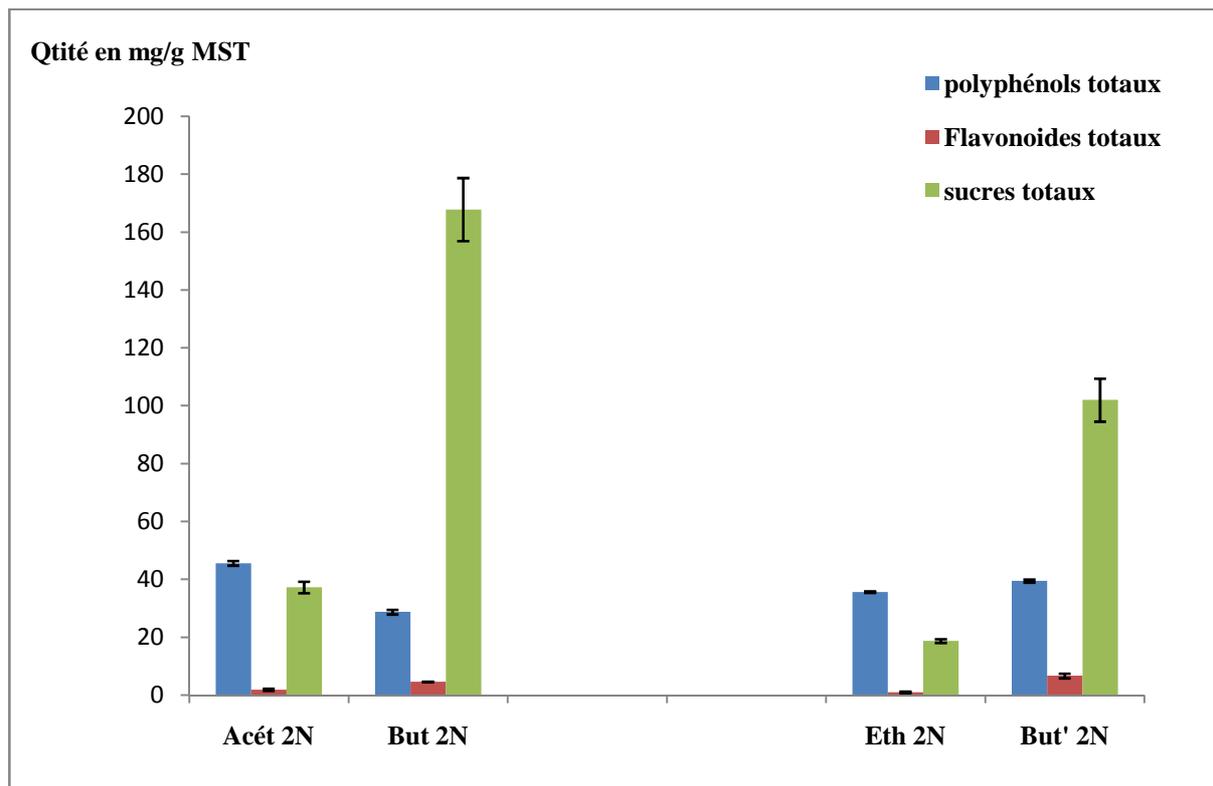


Figure 32 : Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en sucres totaux après hydrolyse acide (HCl 2N).

Nous constatons également que les extraits butanoliques sont ceux qui contiennent le plus de sucres (figure 32) avec $(167,812 \pm 10,87)$ et $(102 \pm 7,42)$ mg Equivalent de glucose/g de MST, suivi de l'extrait d'acétate avec $(37,300 \pm 1,98)$ et enfin l'extrait étheré avec $(18,767 \pm 0,64)$. De ces résultats, nous pouvons confirmer que plus les formes phénoliques sont glycosylées plus elles auront tendance à être extraites par les solvants polaires.

La figure 33 est une représentation en histogrammes des pourcentages (%) que représentent les fractions de flavonoïdes par rapport aux fractions phénoliques totales.

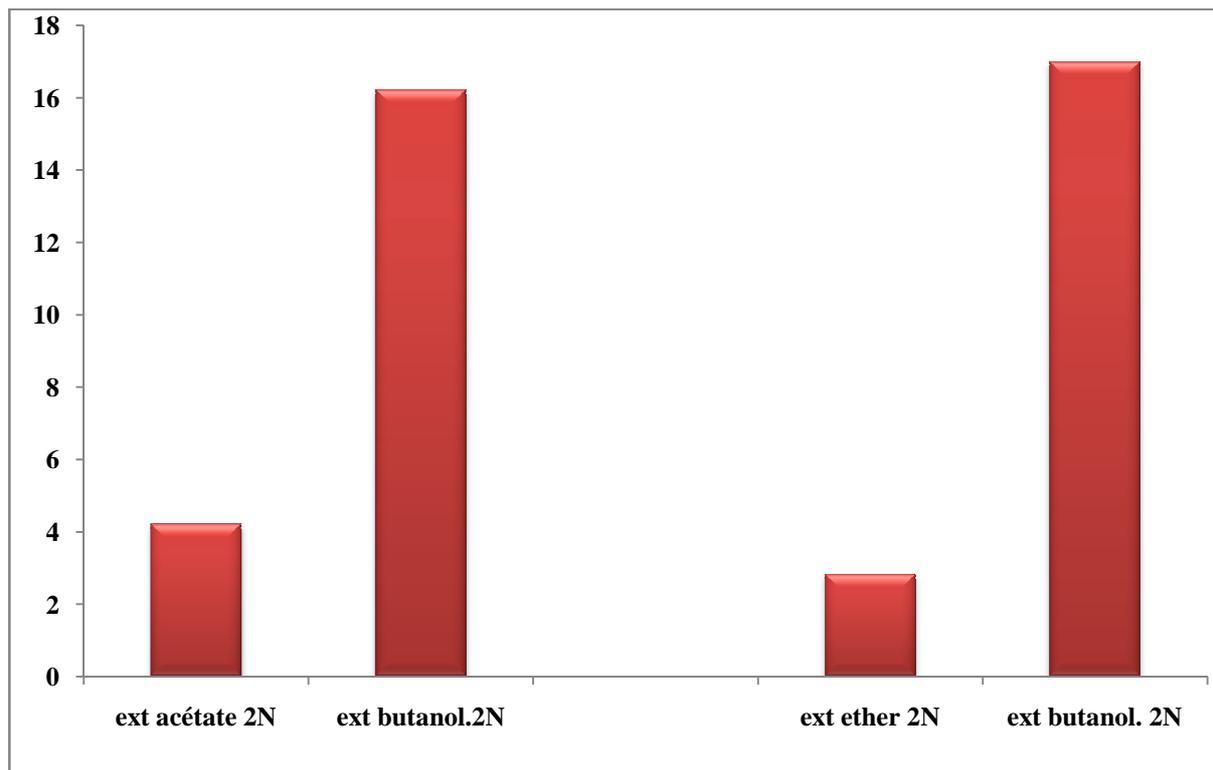


Figure 33 : Histogramme des fractions des flavonoïdes issus de l'hydrolyse acide à l'HCl 2N.

Cette représentation montre que les extraits butanoliques contiennent plus de flavonoïdes comparativement aux extraits d'acétate d'éthyle et étheré. On pourrait expliquer cela par la polarité des solvants qui extraient des entités différentes ayant des polarités différentes aussi, ce qui implique la présence de différentes structures phénoliques dans chacun des extraits.

- **Résultats de l'analyse quantitative des extraits issus de l'hydrolyse à l'HCl 6N**

La méthode d'hydrolyse avec HCl 6N est mise en œuvre dans cette étude afin de comparer les résultats des dosages entre les deux méthodes d'hydrolyse acide (HCl 2N et 6N).

L'hydrolyse avec HCl 6N est conduite en mélangeant des volumes égaux de HCl 6N et de margines délipidées selon le protocole précédemment décrit. Le tableau XV récapitule les résultats des dosages.

Tableau XV : Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en sucres totaux obtenus après traitement avec HCl 6N.

| 6N | Polyphénols totaux | Flavonoïdes totaux | Sucres totaux |
|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| Extrait d'acétate | 25,66 ± 0,225 | 1,946± 0,0665 | 24,927 ±1,38 |
| Ext.butanolique | 65,875 ± 6,45 | 12,950 ±1,797 | 263,500 ± 6,36 |
| Ext. Éthéré | 10,415 ± 3,23 | 1,103± 0,100 | 12,035 ± 0,40 |
| Ext. Butanolique | 49,93 ± 3,72 | 9,175± 2,066 | 242,333 ± 28,71 |

Les quantités sont exprimées en mg/g des MST (MOY±Ecart type).

Les valeurs de ce tableau sont reprises en histogramme dans la figure 34.

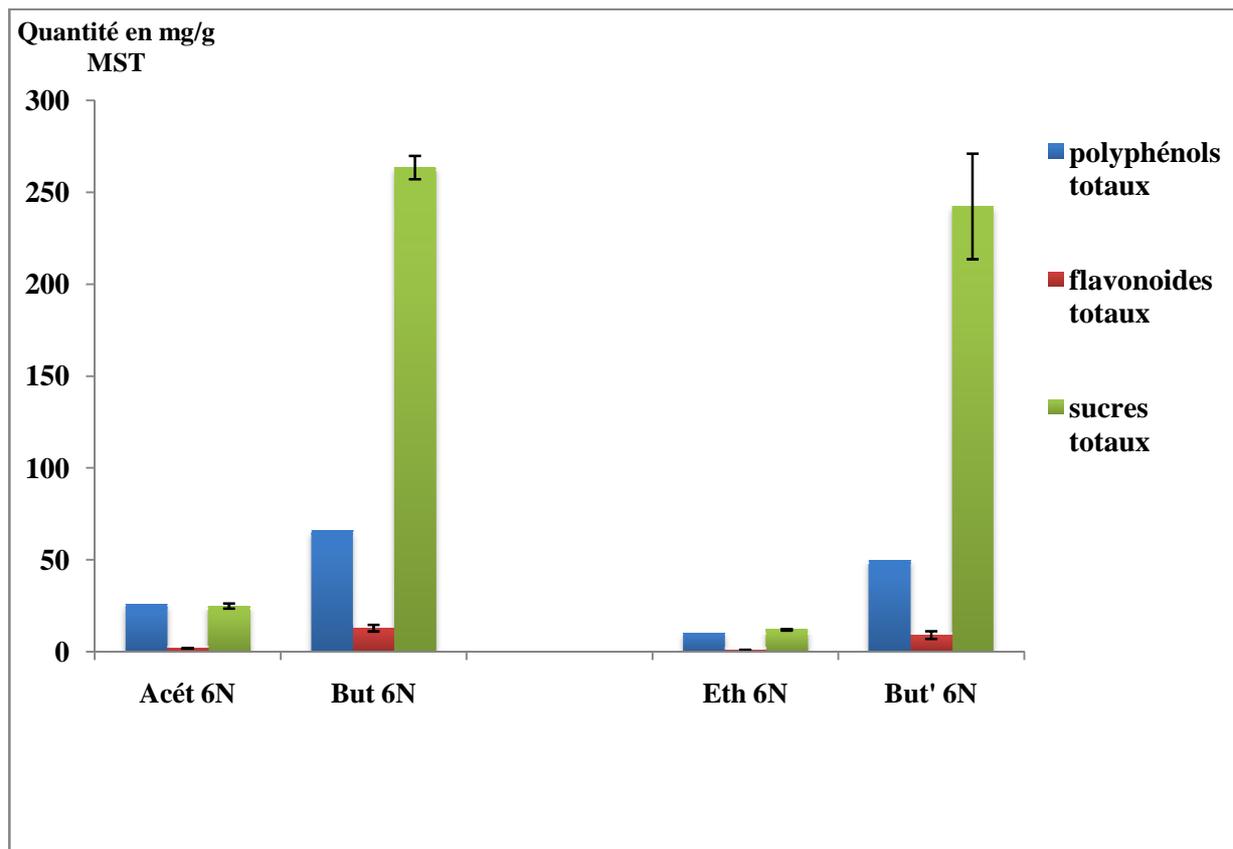


Figure 34 : Résultats de la quantification des polyphénols, des flavonoïdes et des sucres totaux des extraits issus de l'hydrolyse avec HCl 6N.

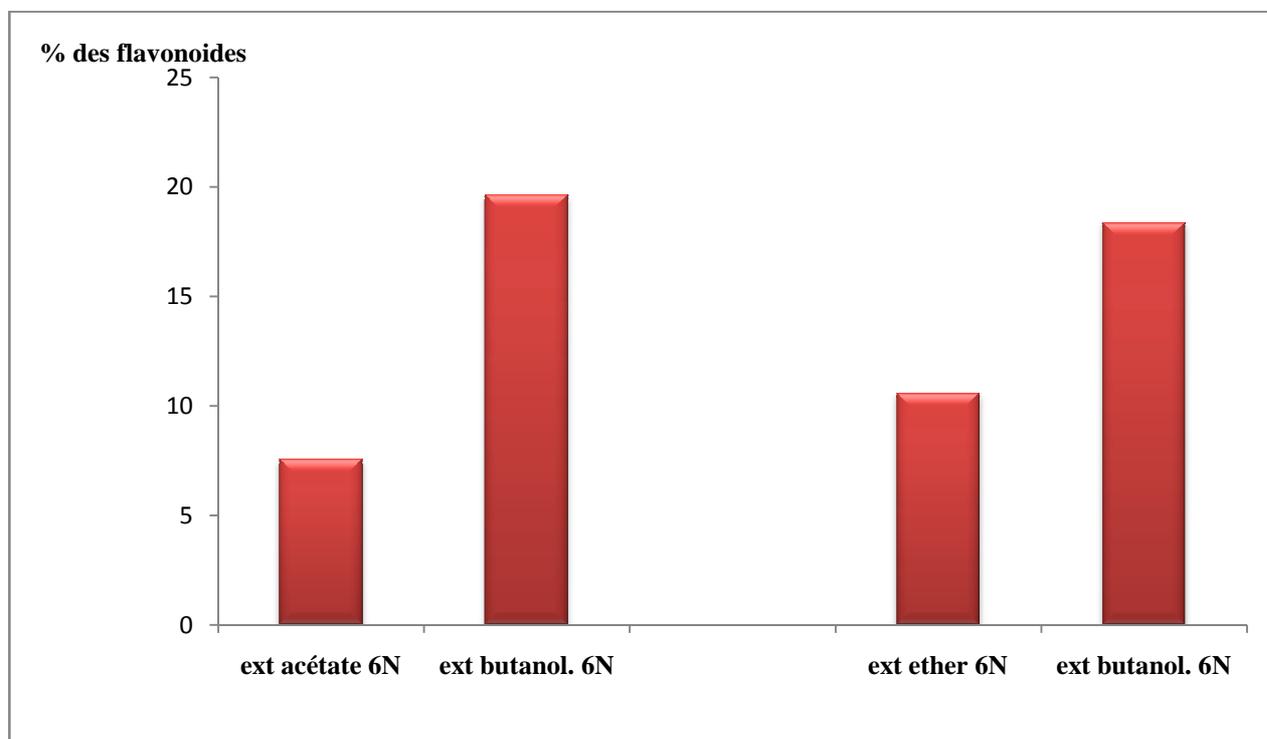


Figure 35 : Pourcentages que représentent les flavonoïdes dans les extraits issus de l'hydrolyse acide avec HCl 6N.

- **Analyse quantitative des extraits issus des margines après hydrolyse alcaline suivie d'une hydrolyse acide :**

Ce type d'hydrolyse est conçu pour libérer les formes phénoliques aglycones de toutes combinaisons possibles avec les sucres (les combinaisons ester pouvant être rompues par une hydrolyse alcaline sous vide et éventuellement, des liaisons O-glycosidiques qui peuvent se rompre par un traitement acide à chaud).

Les polyphénols, les flavonoïdes et les sucres ont également été quantifiés pour les extraits issus après hydrolyse alcaline. Les résultats sont représentés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Résultats des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des sucres totaux après hydrolyse alcaline suivie de l'hydrolyse acide.

| ALCA+ACIDE | Polyphénols totaux | Flavonoïdes totaux | Sucres totaux |
|------------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| Extrait acétate (Acét ALCA) | 12,5± 0,71 | 0,856 ± 0,08 | 2,867± 0,09 |
| Ext.butanolique (But ALCA) | 7,84 ± 0,86 | 1,563 ± 0,26 | 22,387 ±0,30 |
| Ext. Ethéré (Eth ALCA) | 6,54 ± 0,32 | 1,816 ± 0,16 | 6,932 ±0,08 |
| Ext. Butanolique (But'ALCA) | 7,50 ± 0,37 | 2,073 ± 0,49 | 23,318 ± 1,58 |

La figure 36 reprend les résultats des dosages en représentation en colonnes.

La figure 36 présente une allure générale différente des histogrammes obtenus des margines traitées avec HCl, puisque l'extrait d'acétate est celui qui a extrait le plus de polyphénols ($12,5 \pm 0,71$) mg EAG/g MST, le *n*-butanol ayant été utilisé pour extraire les polyphénols après l'extraction à l'acétate d'éthyle, dans la première expérience, a extrait une quantité de ($7,84 \pm 0,86$)mg/g MST, tandis que les quantités de PPT extraits lors de la deuxième expérience par l'éther puis au *n*-butanol sont ($6,54 \pm 0,32$) et ($7,50 \pm 0,37$)mg/g MST respectivement.

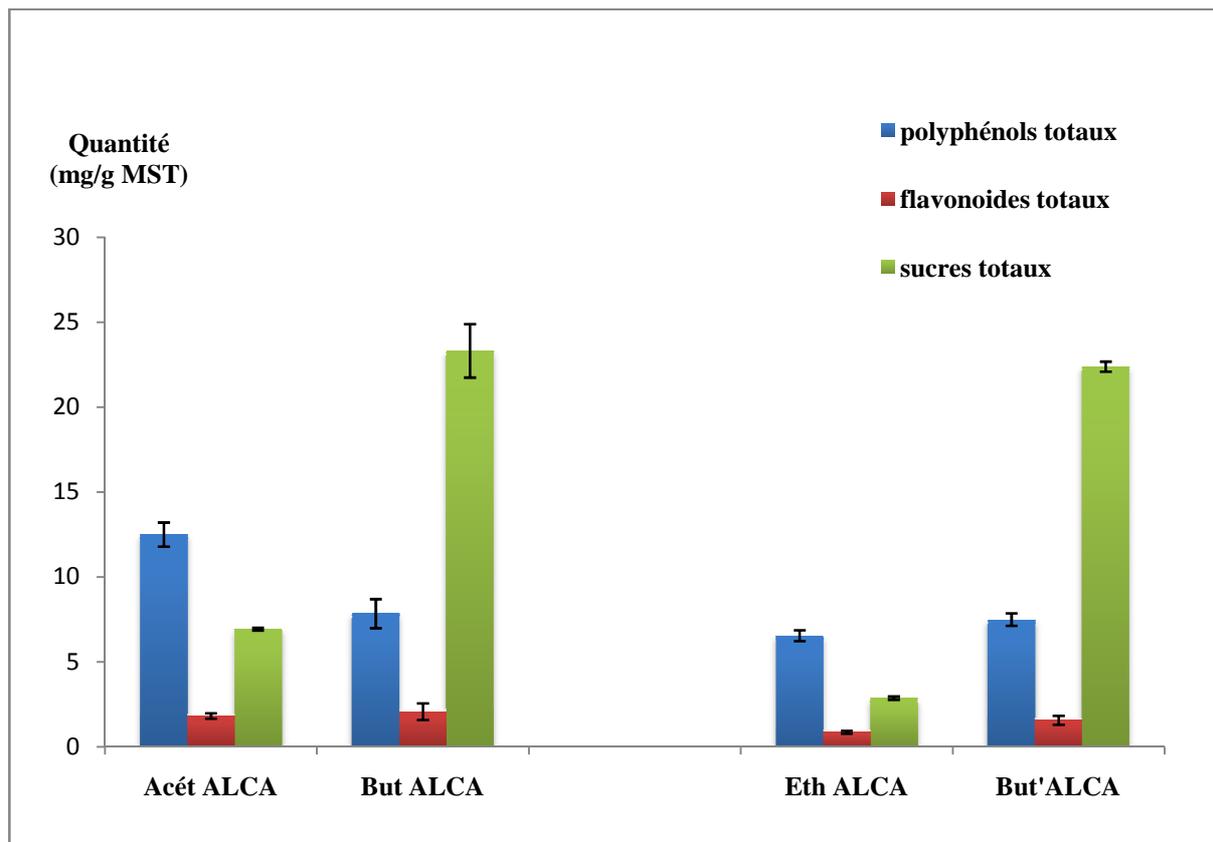


Figure 36 : Résultats des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des sucres totaux après hydrolyse alcaline suivie d'hydrolyse acide.

Les extraits butanoliques contiennent plus de sucres, confirmant ainsi ce qui a été publié par DE MARCO *et al.* (2013), à savoir que le n-butanol est spécifique aux formes fortement polaires (glycosylées).

Les pourcentages que représentent les flavonoïdes dans la fraction phénolique totale sont représentés en histogramme dans la figure 37.

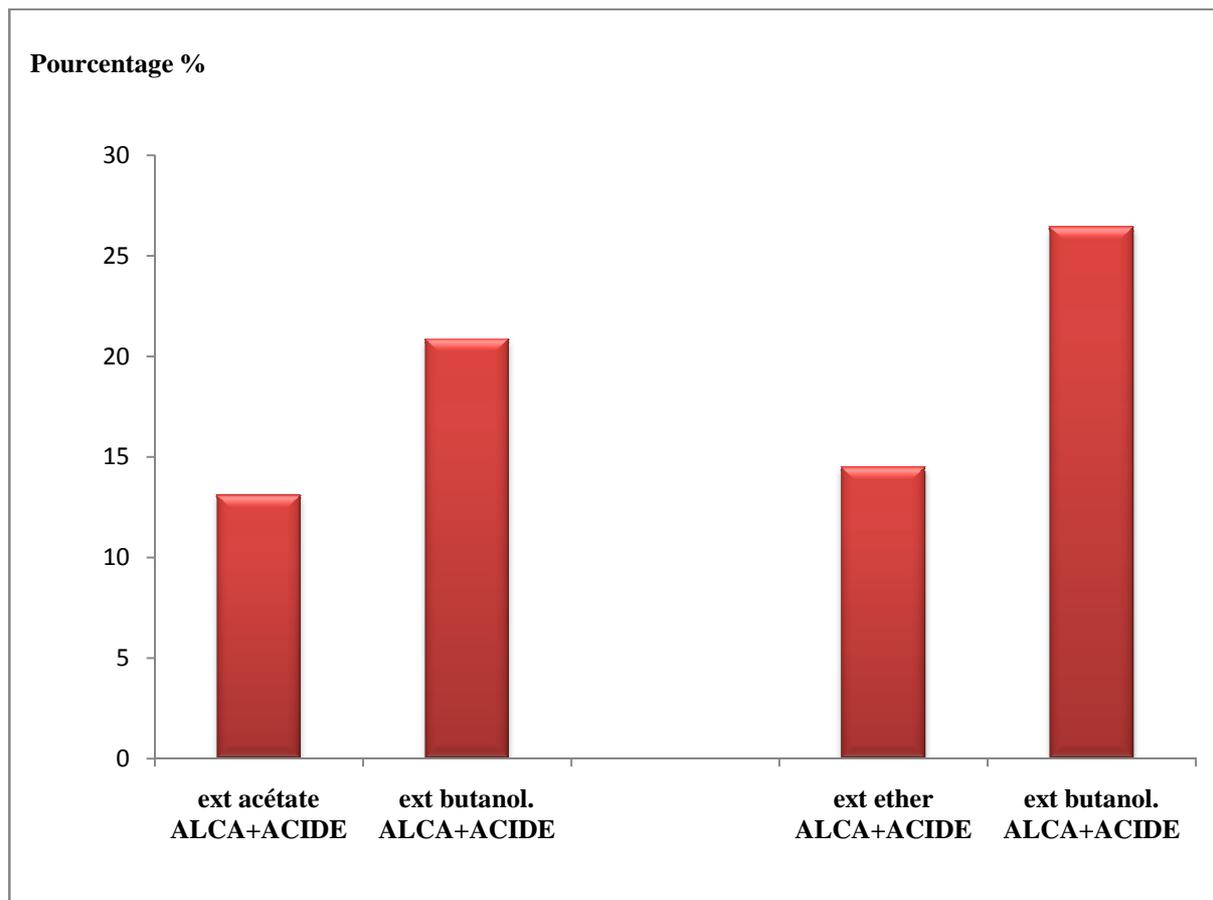


Figure 37 : Fractions flavoniques en pourcentages obtenus par différents solvants après hydrolyse alcaline suivie d'hydrolyse acide.

La figure ci-dessus montre clairement que la quantité la plus importante de flavonoïdes est extraite par le *n*-butanol, que ce soit après l'extraction à l'acétate d'éthyle (procédure 1) ou à l'éther (procédure 2).

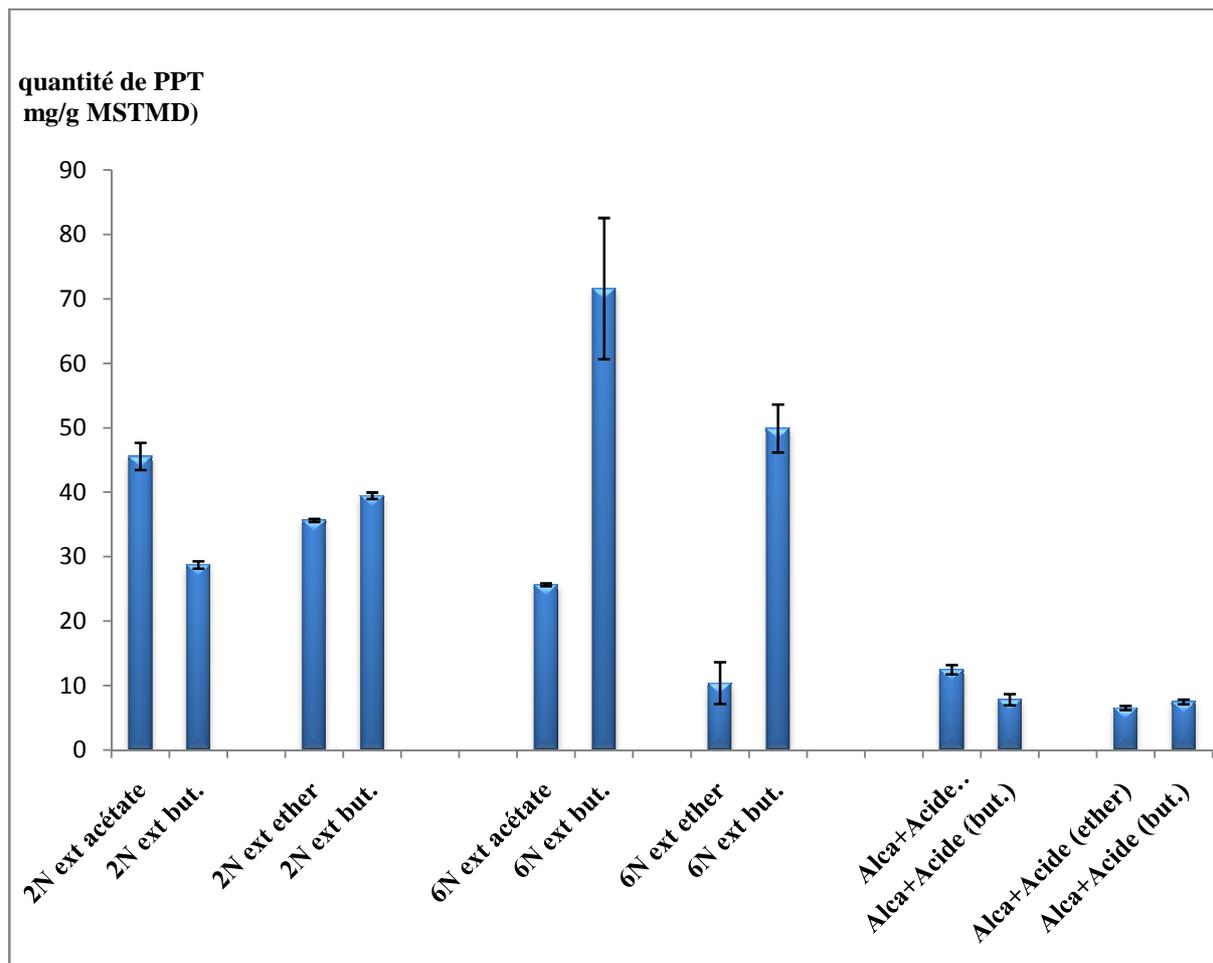


Figure 38 : Quantité des polyphénols totaux après différentes hydrolyses chimiques effectuées acides et/ou alcaline.

Parmi les composés phénoliques des margines, selon DE MARCO *et al.* (2007), le plus abondant et très intéressant de point de vue nutritionnel est l'hydroxytyrosol [2-(3, 4-dihydroxyphényl) éthanol : HT], largement étudié, ses propriétés antioxydantes et pharmacologiques ont été démontrées. Dans les margines, HT se présente à l'état libre (monomère), sous forme lié (oleuropéine, verbascoside) et sous forme glycosylée (OBEID *et al.*, 2007). Un autre composé phénolique simple identifié dans les margines est le 3, 4-dihydroxyphénylglycol (DHPG), de structure similaire à celle de HT mais avec présence d'un groupe hydroxyle supplémentaire et doué des propriétés antioxydantes (LIMIROLI *et al.*, 1996), en plus des autres structures phénoliques identifiées monomériques qu'elles soient ou pas polymériques pouvant se trouver glycosylées ou pas.

2.2. Résultats des analyses qualitatives :

2.2.1. Analyse des extraits obtenus avant et après déglycosylation par CCM :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple dont le principe est basé sur le phénomène d'adsorption. Elle est utilisée dans la séparation et l'identification des molécules pures, les extraits (mélange complexes de métabolites) et les échantillons biologiques. Trois microlitres de chaque extrait sont déposés à des points précis, à 1cm du bord inférieur de la plaque de gel de silice (20x20 cm d'épaisseur).

Après plusieurs essais de systèmes de solvants, nous avons adopté, après optimisation, le système suivant : Chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique (v/v/v) (50/40/10) (RIOV et GOTTLIEB, 2006).

Après le développement dans la cuve en verre, la lecture a été faite par observation des plaques sous lampe UV (lumière ultra-violette) à 366 nm. Les rapports frontaux des spots ont été calculés.

2.2.1.1. Choix des margines brutes :

Au début de l'étude, des traitements ont été apportés aux margines au préalable dans le but de justifier pourquoi a-t-on choisi d'utiliser les margines à l'état brut pour cette étude ?

Trois expériences sont réalisées à cette fin, la première consiste à récupérer le surnageant d'un échantillon de margines brutes ayant subi une centrifugation, la deuxième, à récupérer le filtrat obtenu après filtration, chacune des deux, consiste en une élimination des matières en suspension et la troisième expérience consiste à utiliser les margines telles qu'elles sont récupérées de l'huilerie.

L'extraction des polyphénols est réalisée à l'acétate d'éthyle. Les profils chromatographiques des extraits phénoliques obtenus des trois expériences sont représentés dans les figures 39 (a et b).

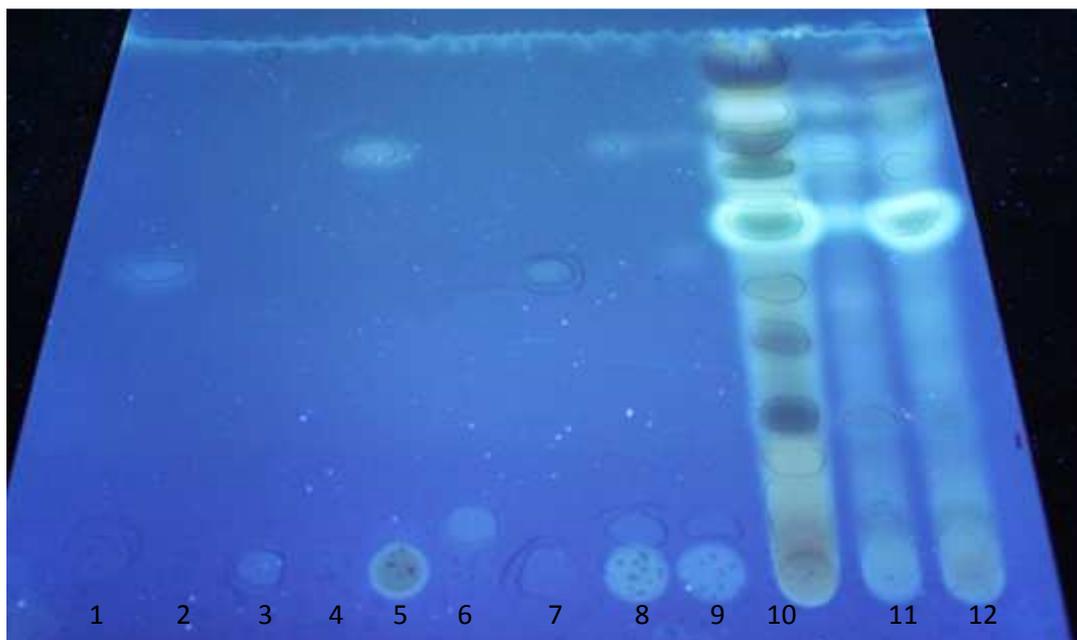


Figure 39-a : Profil chromatographique des extraits méthanoliques des polyphénols issus des margines brutes, centrifugées et filtrées. Visualisation sous lampe UV à 366 nm.

1.acide gallique.2.acide cinnamique.3.acide tannique.4.acide caféique.5.rutine.6. Oleuropeine. 7. Acide gallique+acide tannique. 8. acide caféique+rutine+oleuropeine. 9. acide gallique+acide caféique+acide tannique+rutine+oleuropeine. 10. Extrait phénoliques issus des margines brutes. 11. Extrait phénoliques issus des margines centrifugées. 12. Extrait phénoliques issus des margines filtrées.

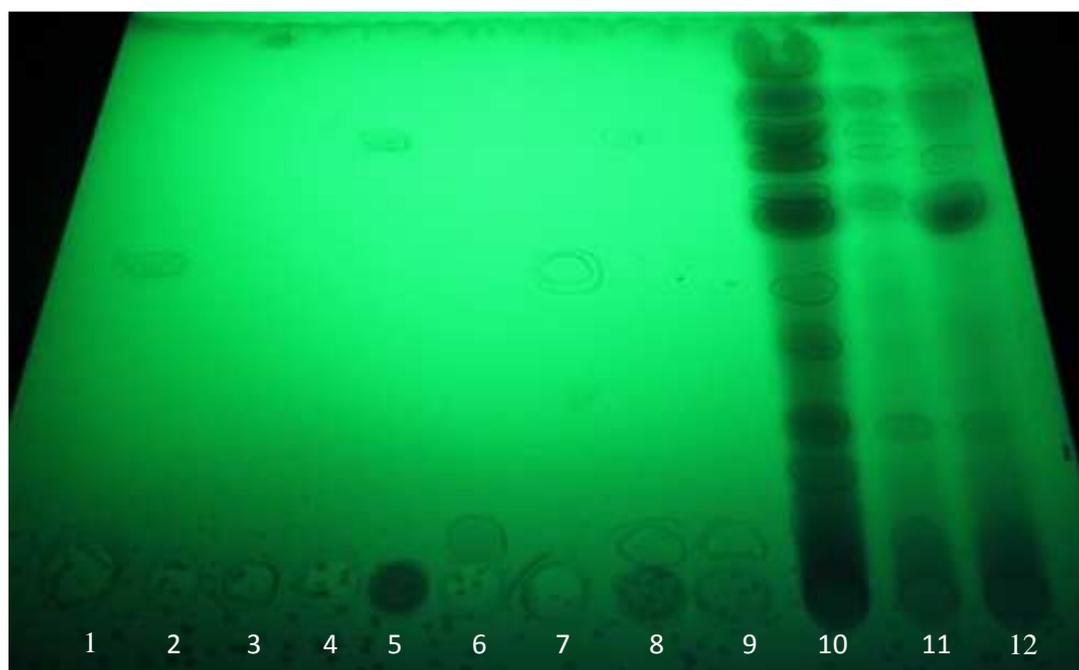


Figure 39-b : Profil chromatographique des extraits méthanoliques des polyphénols issus des margines brutes, centrifugées et filtrées. Visualisation sous lampe UV à 254nm.

1. acide gallique.2.acide cinnamique.3.acide tannique.4.acide caféique.5.rutine.6. Oleuropeine. 7. acide gallique+acide tannique.8. Acide caféique+rutine+oleuropeine.9. acide gallique+acide caféique+acide tannique+rutine+oleuropeine.10. Extrait phénoliques issus des margines brutes.11. Extrait phénoliques issus des margines centrifugées.12. Extrait phénoliques issus des margines filtrées.

Il apparaît clairement sur ce chromatogramme que l'extrait phénolique issu des margines brutes sont les plus riches en polyphénols, montrant ainsi un nombre plus important de spots. Ce qui implique que les traitements apportés ne sont pas nécessaires dans cette présente étude, puisque nous voulons récupérer la fraction phénolique totale (le maximum qu'on puisse extraire) des margines brutes. Apparemment, la centrifugation et la filtration élimine les matières en suspension qui pourraient lier des structures phénoliques diverses. On a même des spots qui présentent le même niveau de migration mais d'intensité différente, ce qui pourrait aussi être expliqué par la différence de concentration de ces composés due aux traitements apportés au préalable (centrifugation et filtration) qui ont fait que la plupart des composés ne se retrouvent pas dans l'extrait d'acétate d'éthyle.

2.2.1.2. Analyse qualitative des extraits obtenus avant et après hydrolyse acide (HCl 2N)

Le profil chromatographique obtenu après migration des composés phénoliques extraits des margines avant et après hydrolyse acide avec HCl 2N, dans un système de solvant composé de (Chloroforme/Acétate d'éthyle/Acide formique (v/v/v) : 50/40/10) est donné par la figure 40 (a et b).

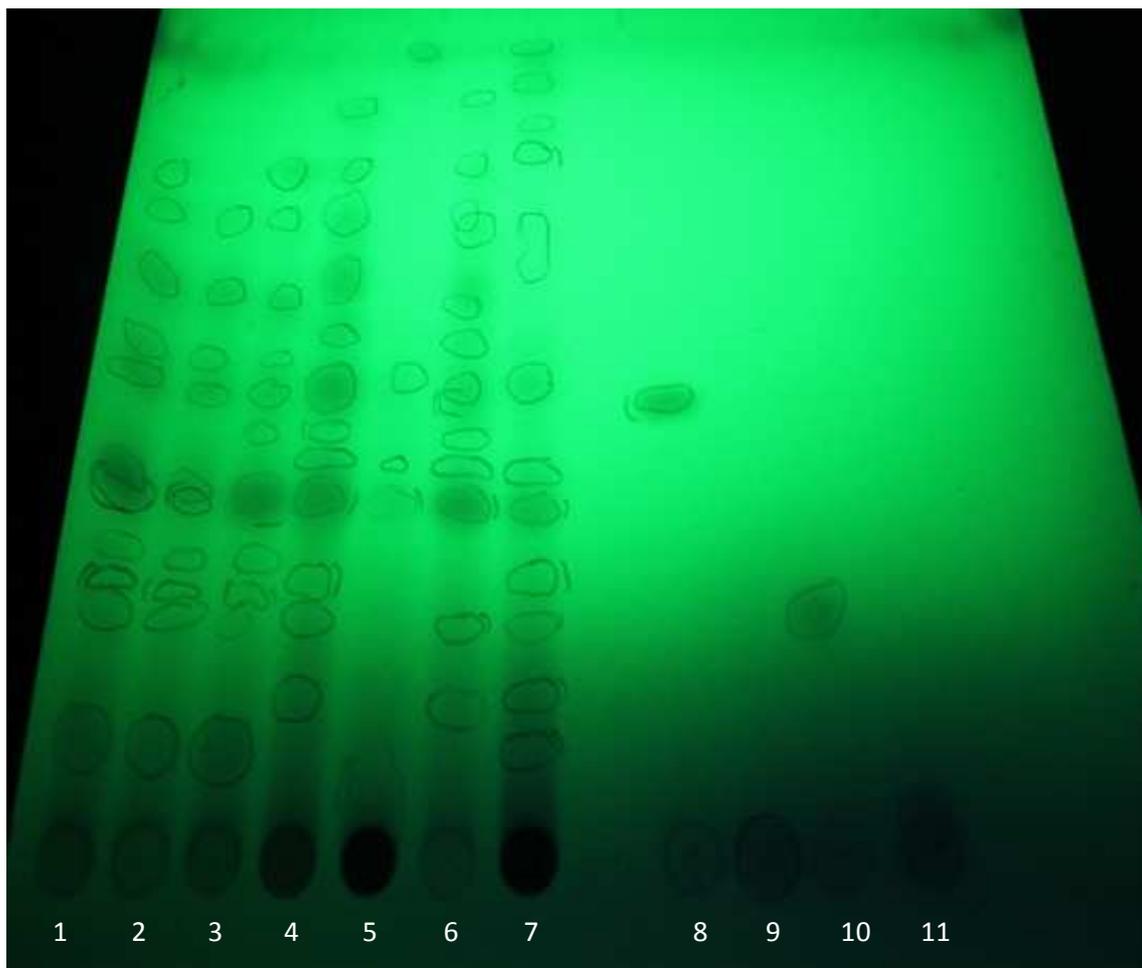


Figure 40-a : Profil chromatographique des extraits phénoliques obtenus avant et après traitement avec HCl 2N. Visualisation sous lampe UV à 254nm. **1.**CPMB. **2.** CPMB. **3.**CPMD. **4.**Acét 2N. **5.**But 2N. **6.**Eth 2N. **7.**But'2N. **8.**acide caféique. **9.**rutine. **10.**acide gallique. **11.**oleuropeine.

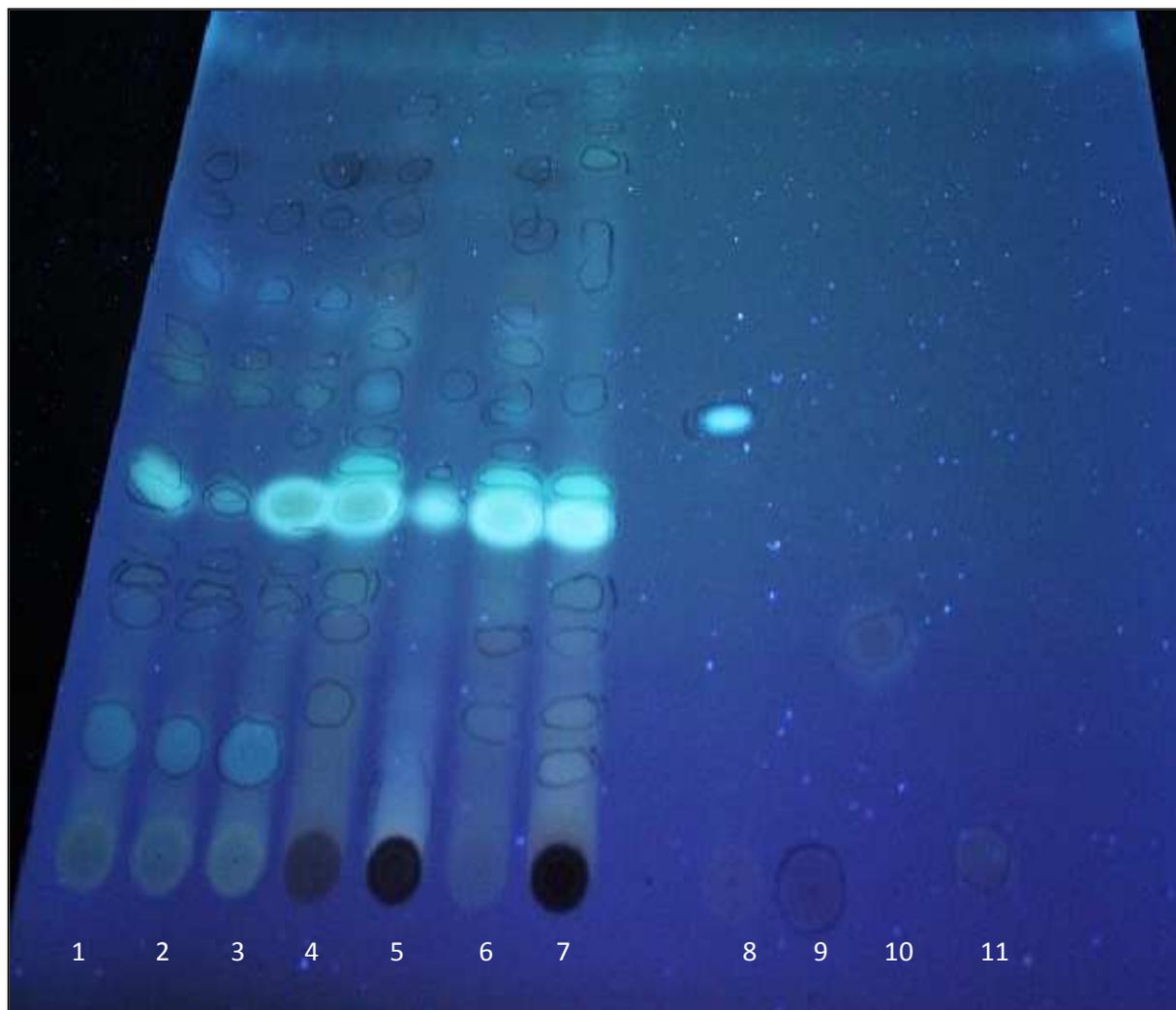


Figure 40-b : Profil chromatographique des extraits phénoliques obtenus avant et après traitement avec HCl 2N. Visualisation sous lampe UV à 366 nm. **1.** CPMB. **2.** CPMB. **3.** CPMD. **4.** Acét2N. **5.** But 2N. **6.** Eth 2N. **7.** But'2N. **8.** acide caféique. **9.** rutine. **10.** acide gallique. **11.** oleuropeine.

Sur le profil des figures 40-a et b, chacun des dépôts semble contenir des entités moléculaires de composés phénoliques pouvant être différentes ou au contraire se ressembler, puisque, les extraits obtenus suite à l'hydrolyse en milieu HCl 2N semblent présenter des profils plus ou moins différents. Nous pouvons remarquer que l'extrait étheré présente un profil avec des spots ayant migré plus loin que ceux représentant les entités retrouvées dans l'extrait d'acétate ou l'extrait butanolique. Dans l'extrait d'acétate d'éthyle, il a été constaté qu'il contenait en plus de quelques composés pouvant être extrait par l'ether (les formes aglycones) des formes, probablement, plus polaires, plus volumineuses qui sembleraient correspondre à des formes aglycones ayant résisté à la dégradation par HCl.

Pour les profils des extraits butanoliques, il semble que celui obtenu après l'extraction à l'ether (But'2N), contient plus de composés que ne l'a fait l'extrait (But 2N) obtenu après l'extraction à l'acétate d'éthyle. Cela confirme le fait que l'acétate d'éthyle ait extrait des formes aglycones dont les niveaux de migration sont identiques à la majorité de composés

séparés de l'extrait étheré (Eth 2N) en plus de certaines formes de CP glycosylées avec des niveaux de migration plus faibles.

Les rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits ainsi que ceux des témoins rapportés dans le tableau XVII montrent que les extraits polyphénoliques obtenus à partir des margines brutes (MB) (dépôt 1 et 2) et des margines délipidées (MD) (dépôt 3) ont donné lieu à des spots communs de points de vue coloration, position et même dans le nombre, donc on confirme que les deux extraits possèdent une composition identique. La seule différence qui réside entre les MB et les MD est que ces dernières ont subi une délipidation.

Tableau XVII : Rapports frontaux (Rf) des spots des extraits phénoliques issus des margines brutes et des témoins dans le système : Chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique : 50/40/10, v/v/v).

| | CPMB | CPMD | ETH | ACET | BUT | Oleuropeine | Acide gallique | Acide caféique | rutine |
|---|--|--|--|---|--|-------------|----------------|----------------|----------|
| Rapports frontaux des différents spots obtenus | 0* 0,11* 0,22 0,26* 0,29 0,35* 0,38 0,46 0,52 0,59* 0,69 0,74 | 0* 0,11* 0,22 0,26* 0,29 0,35* 0,38 0,46 0,52 0,59* 0,69 0,74 | 0 0,11* 0,29 0,42* 0,60 0,62 (j) 0,68 | 0 0,11 0,29 0,42* 0,57* 0,67 | 0 0,02* 0,12 0,42 0,57* | 0,03 | 0,21 | 0,43* | 0 |

(*) : Absorption de la lumière ultra-violette à 366 nm.

(j) : couleur jaune du spot.

De ce tableau nous relevons des différences entre la contenance des différents extraits, puisque chaque solvant utilisé présente une certaine polarité donc une affinité bien précise pour un composé donné. Par exemple, l'éther diéthylique est moins polaire que l'acétate d'éthyle, il ne peut donc extraire que les formes aglycones qui sont moins polaires que les structures phénoliques possédant des sucres liés. Plus le solvant est polaire, plus il a tendance à extraire les formes polaires (possédant plus de groupements polaires). Ces formes glycosylées sont donc polaires, et sont retenues par la phase stationnaire (gel de silice) et le système de solvants (phase mobile) n'entraîne que les entités ayant une affinité meilleure pour la phase mobile. C'est la raison pour laquelle, dans l'extrait butanolique, nous retrouvons des composés qui sont restés au point de dépôt (n'ont pas été véhiculées par le solvant mobile), ou

des entités qui n'ont pas migré plus aussi loin que ne l'ont fait les composés phénoliques extraits par d'autres solvants.

Les rapports frontaux correspondant aux niveaux de migrations des composés séparés contenus dans les différents extraits issus des margines avant et après hydrolyse avec HCl 2N, sont mentionnés dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII : Rapports frontaux (Rf) des composés phénoliques extraits avant et après traitement avec HCl 2N ainsi que ceux des étalons séparés dans le système de solvants (Chloroforme/Acétate d'éthyle/Acide formique (v/v/v) : 50/40/10).

| | CPMB | Acét 2N | But 2N | Eth 2N | But' 2N | Oleuropeine | Acide caféique | Rutine | Acide gallique |
|-----------|-------|------------|-----------|-----------|------------|-------------|-------------------|--------|-------------------|
| | 0* | 0,14 | 0 | 0,13 | 0 | 0,03 | 0,43* | 0 | 0,21 |
| | 0,11* | 0,21 | | 0,2 | 0,09* | | | | |
| | 0,22 | 0,26* | 0,06* | 0,34* | 0,14* | | | | |
| | 0,26* | 0,34* | | 0,37 | 0,21* | | | | |
| | 0,29 | 0,38 | | 0,39 | 0,25* | | | | |
| Rf | 0,35* | 0,41 | 0,34* | 0,43 | 0,34* | | | | |
| | 0,38 | 0,46 | | 0,43* | 0,37 | | | | |
| | 0,46 | 0,52 | 0,375 | 0,45 | 0,46 | | | | |
| | 0,52 | 0,59 | 0,46 | 0,5 | 0,62 | | | | |
| | 0,59* | 0,69 | 0,88 | 0,54 | 0,75* | | | | |
| | 0,69 | 0,74 | | 0,65 | 0,79 | | | | |
| | 0,74 | 0,83 | | 0,67 | 0,86 | | | | |
| | | | | 0,73 | 0,88 | | | | |
| | | | | 0,83 | | | | | |

Du tableau XVIII, nous remarquons que, d'un extrait à un autre, il y a des différences et des similitudes entre les niveaux de migration des spots. Nous retrouvons certaines entités aussi bien dans l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait étheré que dans les extraits butanoliques avec des intensités différentes et absorbant à des longueurs d'onde identiques.

2.2.1.3. Analyse qualitative des extraits obtenus après hydrolyse acide avec HCl 6N et hydrolyse alcaline

Les profils chromatographiques obtenus après séparation des composés phénoliques extraits par différents solvants suite à l'hydrolyse acide dans un mélange contenant des volumes égaux de margines délipidées et de HCl 6N et à l'hydrolyse alcaline suivie d'une hydrolyse acide, sont photographiés (figures 41-a et b).

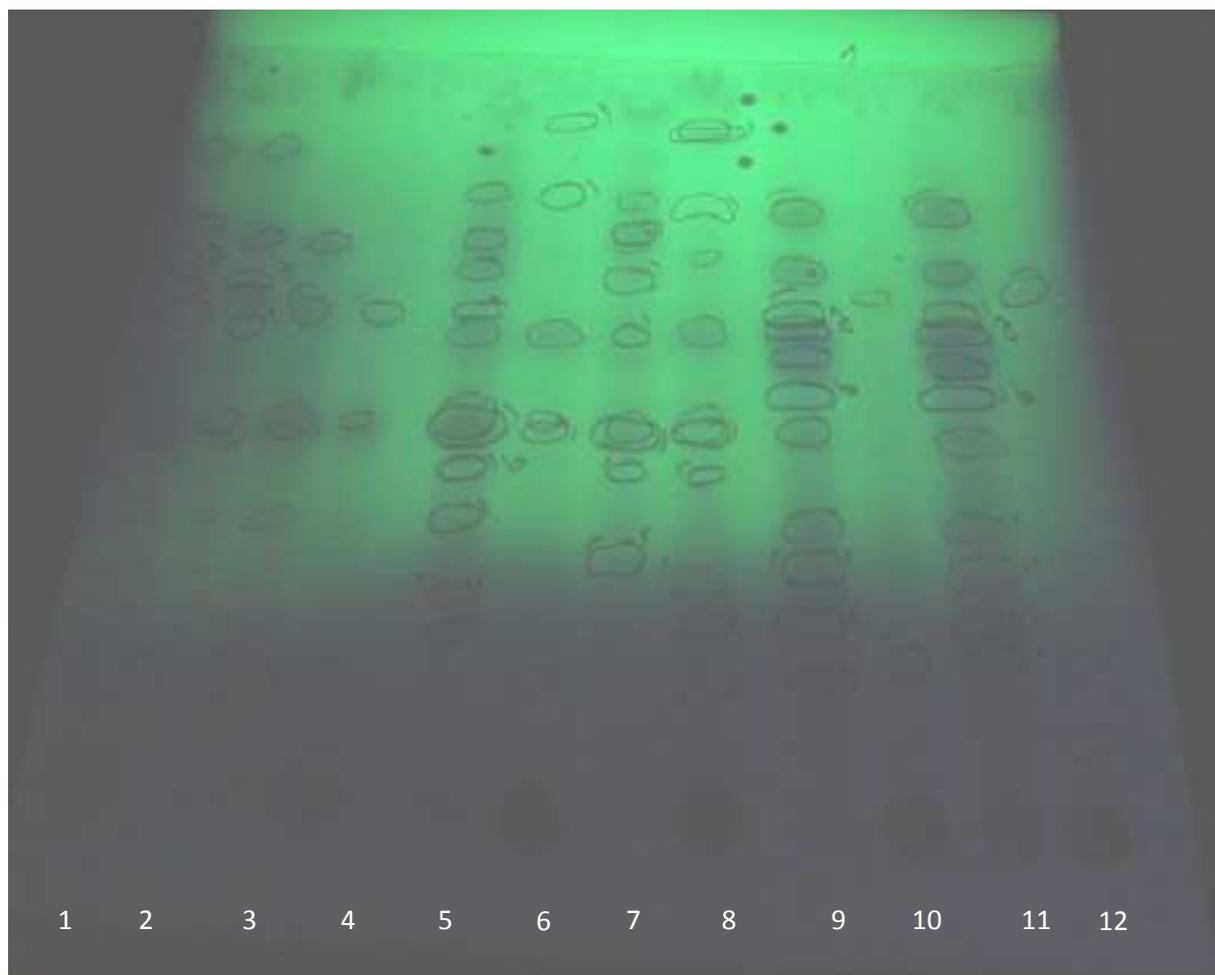


Figure 41-a : Profil chromatographique des extraits obtenus avant et après hydrolyse acide (HCl 6N) et alcaline. Lecture à 254nm.

1. CPMB 2. Extrait étheré (margines brutes) 3. Extrait d'acétate d'éthyle (margines brutes) 4. extrait butanolique (margines brutes).
5. Acét 6N. 6. But 6N. 7. Eth 6N. 8. But' 6N.
9. Eth ALCA 10. But' ALCA. 11. Acét ALCA. 12. But ALCA.

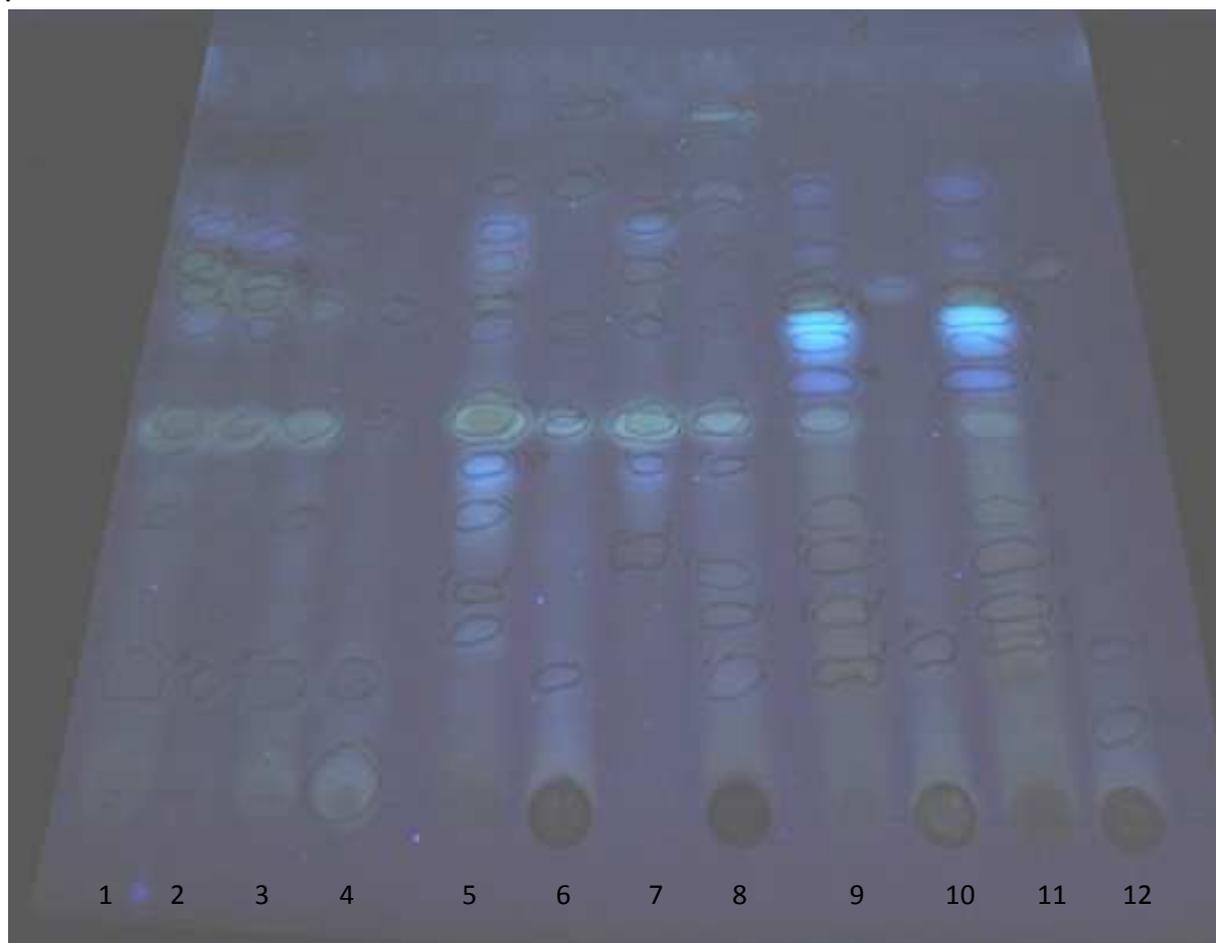


Figure41-b : Profil chromatographique des extraits obtenus avant et après hydrolyse acide (HCl 6N) et alcaline. Lecture à 366 nm.

- 1.** CPMB **2.** Extrait étheré (margines brutes)**3.** Extrait d'acétate d'éthyle (margines brutes)**4.** extrait butanolique (margines brutes).
5. Acét 6N. **6.** But 6N. **7.** Eth 6N. **8.** But' 6N.
9. Eth ALCA **10.** But' ALCA. **11.** Acét ALCA. **12.** But ALCA.

Les rapports frontaux (Rf) sont calculés et repris dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Rapports frontaux (Rf) des composés phénoliques extraits à partir des margines après hydrolyses avec HCl 6N et alcaline séparés par CCM dans le système de solvants (Chloroforme/Acétate d'éthyle/Acide formique (v/v/v): 50/40/10).

| | Acét 6N | But 6N | Eth 6N | But' 6N | Acét ALCA | But ALCA | Eth ALCA | But' ALCA |
|------------------------------|------------|-----------|-----------|------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| Rapports frontaux | 0,18 | 0,14 | 0,27(r)* | 0,14* | 0,18 (r) | 0,094* | 0,15 (r) | 0,17* |
| | 0,225(r)* | 0,42* | 0,37* | 0,21(r) | 0,22(r) | 0,17* | 0,22(r)* | 0,62 |
| | 0,31* | 0,44 | 0,42* | 0,25* | 0,275(r)* | 0,64* | 0,27(r)* | |
| | 0,37(b)* | 0,55 | 0,43 | 0,37* | 0,32 (r) | | 0,32 | |
| | 0,42* | 0,76* | 0,55* | 0,42* | 0,43 | | 0,44 | |
| | 0,44 | 0,88* | 0,62* | 0,44* | 0,49(b)* | | 0,48(b) | |
| | 0,54 | | 0,69 | 0,56 | 0,53 | | 0,53 | |
| | 0,58* | | 0,71 | 0,67 | 0,57 | | 0,57 | |
| | 0,64 | | 0,75 | 0,75* | 0,61(j) | | 0,59(j)* | |
| | 0,69 | | | 0,87 | 0,66 | | 0,66 | |
| | 0,76 | | | 0,875 | 0,76 | | 0,75* | |

(*) : Absorption à 366nm. (r) : coloration rouge. (b) : coloration bleue. (j) : coloration jaune.

De ces valeurs de rapports frontaux, on constate que les taches (figures 44-a et b) correspondant aux niveaux de migration des composés phénoliques issus des margines et extraits par différents solvants organiques présentent des différences au niveau de leur coloration, de leur intensité, de la longueur d'onde à laquelle elles apparaissent (longueur d'onde d'absorption).

Un même niveau de migration peut être obtenu par des spots correspondant à deux entités moléculaires différentes, puisque deux composés phénoliques peuvent avoir un même niveau de migration donc la même polarité et même masse, ce qui les différencie est leur apparition sous la lampe à lumière Ultra-violette, il s'avère que les deux composés ne sont pas identiques puisque l'un absorbe à la longueur d'onde de 254nm et l'autre au contraire apparaît sous longueur de 366nm, on peut citer l'exemple des spots ayant le Rf de (0,14) correspondant à un niveau de migration de composés extraits au *n*-butanol après hydrolyse acide (HCl 6N), dans l'extrait (But 6N) butanolique obtenu après l'extraction à l'acétate d'éthyle le spot est visible à la longueur d'onde de 254nm alors que dans l'extrait (But'6N) obtenu après l'extraction à l'éther diéthylique il apparaît aussi bien sous lampe UV à longueur d'onde de 254nm qu'à 366nm ; on peut donc conclure que les entités ayant migré à ce niveau sont bien différentes vu qu'au sein d'un même spot, nous pouvons avoir plusieurs composés à même niveau de migration.

2.2.1.4. Séparation par CCM des acides phénoliques extraits à partir des margines avant et après déglycosylation

La séparation des acides phénoliques a été optimisée en utilisant le système de solvants (chloroforme/méthanol/acide formique (v/v/v) : 85/15/01) (RIBEREAU-GAYON, 1968) comme éluant et la plaque utilisée comme phase stationnaire est imprégnée de gel de silice. Le résultat de l'analyse est photographié et est représenté dans la figure 42.

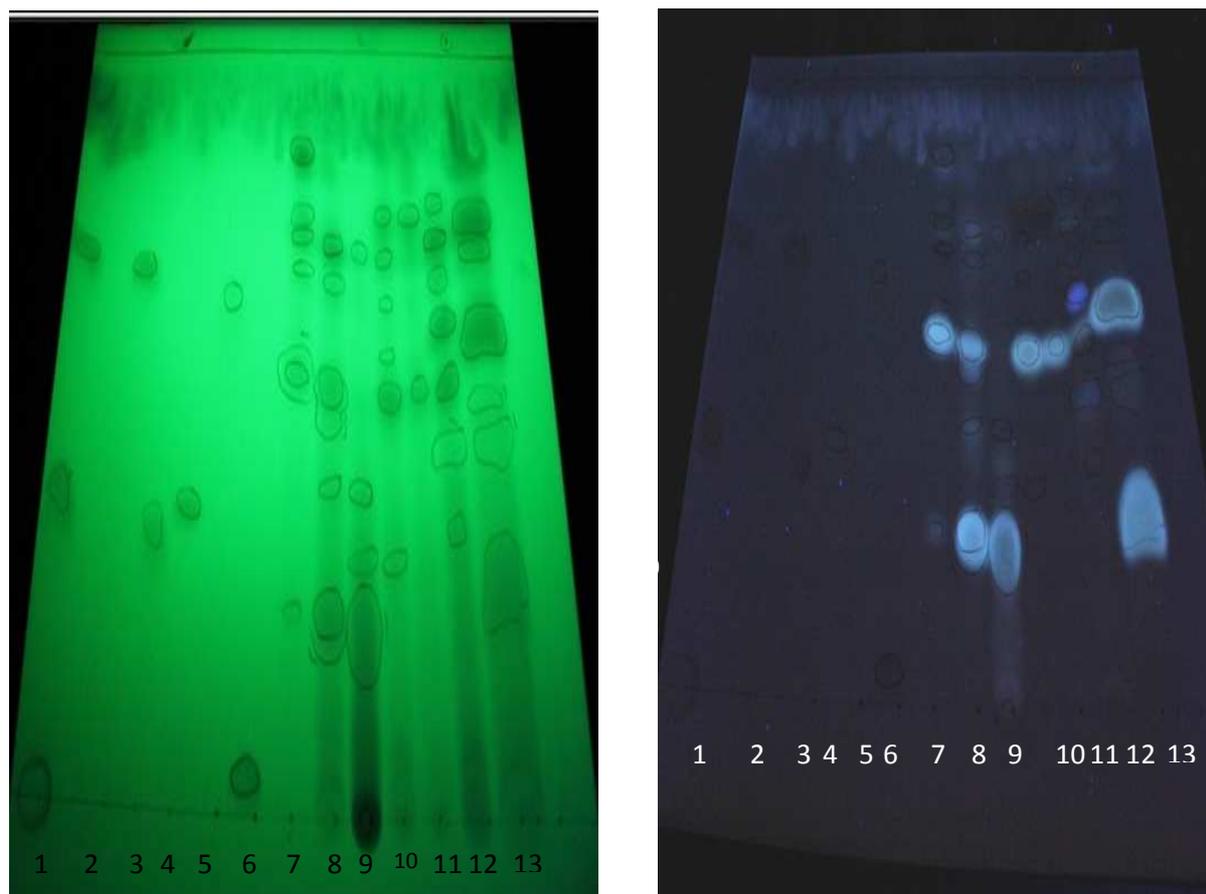


Figure 42 : Profil chromatographique des extraits obtenus avant et après hydrolyse acide (séparation des acides phénoliques). Système de solvant utilisé : (chloroforme/méthanol/acide formique : 85/15/01).

Profil gauche : Visualisation à 254 nm. Profil droit : visualisation à 366 nm.

1. Acide tanique+acide gallique+acide caféique.2. Acide caféique.3.acide gallique.4. Oleuropeine.5.Quercétine.6. Rutine.7.Eth.8.Acét.9.But.10.Eth 2N.11.Eth 6N.12.Eth ALCA.13.CPMD.

Puisque l'hydrolyse alcaline suivie d'hydrolyse acide ont été utilisées afin de libérer les aglycones de type acides phénols exerçant un pouvoir anti-oxydant important, on a tenté de caractériser les extraits éthers obtenus après traitements acide et basique, puis de comparer entre leurs profils chromatographiques et par rapport à des composés phénoliques pris comme étalons séparés dans les mêmes conditions.

Les rapports frontaux des composés phénoliques séparés sont calculés et sont repris dans le tableau XX.

Tableau XX : Rapports frontaux des composés phénoliques séparés par CCM des extraits obtenus avant et après traitements acide et alcalin et ceux des étalons utilisés dans le système de solvants (chloroforme/méthanol/acide formique : 85/15/01)

| | Acide caféique | Acide gallique | Acide tannique | Oleuropeine | Rutine | Quercétine |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------|--------|------------|
| Rapports frontaux | 0,67 | 0,30 | 0 | 0,33 | 0,037 | 0,59 |

| | CPMD | Eth | Acét | But | Eth 2N | Eth 6N | Eth ALCA |
|-----------------|-------|-------|-------|------|--------|--------|----------|
| Rapports | 0,25 | 0,20 | 0,19* | 0* | 0,26 | 0,47 | 0,30 |
| Frontaux | 0,39* | 0,49* | 0,20 | 0,18 | 0,47 | 0,72 | 0,39(b)* |
| | 0,46* | 0,64 | 0,33 | 0,26 | 0,51 | | 0,48 |
| | 0,55* | 0,67 | 0,45* | 0,33 | 0,59 | | 0,57(b)* |
| | 0,67 | 0,72 | 0,47 | 0,67 | 0,67 | | 0,63 |
| | 0,72 | 0,82 | 0,61 | | 0,72 | | 0,67 |
| | | | 0,67* | | | | 0,74 |

(*) : Absorption du composé à 366 nm.

(b) : coloration bleue.

Les valeurs de ce tableau montrent que les extraits présentent des compositions différentes en termes de nombre et de type de composés phénoliques présents. L'extrait éthéré issu de l'hydrolyse alcaline suivie de l'hydrolyse acide (Eth ALCA) présente plus de composés avec sept spots. Tout spot peut correspondre à un ou plusieurs composés. De plus, un même rapport frontal pourrait être donné par deux composés différents absorbant la lumière ultra-violette à des longueurs d'onde différentes (exemples, les spots au Rf=0,67 sont présents dans tous les extraits analysés, ils absorbent tous la lumière à 254nm mais dans l'extrait d'acétate d'éthyle (Acét) obtenu à partir des margines brutes avant hydrolyse apparaît sous lampe UV à 254nm et 366nm).

Par ailleurs, nous distinguons des taches ayant le même niveau de migration mais apparaissant avec des couleurs distinctives et d'intensités différentes.

Les taches ayant le rapport frontal de 0,67 pourraient s'agir de l'acide caféique, celle qui a le Rf apparue dans l'extrait éthéré (Eth ALCA) obtenu après hydrolyse alcaline suivie d'hydrolyse acide, semble correspondre à l'acide gallique, l'acide phénolique qui pourrait se libérer après rupture des liaisons esters, par l'hydrolyse alcaline, qui liaient les molécules d'acide gallique et de glucose dans les structures des tanins hydrolysables.

Le spot dont le Rf de 0,33 correspond à celui de l'oleuropeine également retrouvé dans l'extrait (Acét) d'acétate d'éthyle obtenu à partir des margines brutes, ce qui concorde avec les données bibliographiques qui rapportent que les margines peuvent contenir l'oleuropeine à

des concentrations variées selon quelques facteurs climatiques, le stade de maturation de l'olive... (YAAKOUBI *et al*, 2010 ; ZBAKH et EL ABBASSI, 2012).

Le $R_f=0,59$ est celui la quercétine également retrouvé dans l'extrait étheré obtenu après hydrolyse dans un milieu HCl 2N. Ce qui laisse supposer que la quercétine pouvait être libérée, suite à l'hydrolyse acide, d'une combinaison glycosidique antérieure.

2.2.2. Mise en évidence de la présence des tanins dans les extraits méthanoliques

La mise en évidence de la présence des tanins dans les extraits méthanoliques de polyphénols issus des margines avant et après traitements de déglycosylation est réalisée par le test au chlorure de fer ($FeCl_3$). Dans l'extrait phénolique issus des margines brutes (CPMB), il a été mis en évidence qu'un mélange de tanins hydrolysables et de tanins catéchiques existe (annexe 12).

Le test est refait et a révélé que les margines brutes et les margines centrifugées renfermaient des tanins cathéchiques par apparition d'une couleur verte indicatrice (vert, vert-marron), alors que pour les extraits phénoliques issus des margines acidifiées, on a constaté qu'il y avait une différence remarquable puisque l'extrait dilué a pris une couleur marron claire. D'ailleurs les résultats du dosage des tanins totaux à la caséine sont confirmés par de nombreuses publications. ZBAKH et EL ABBASSI (2012) rapportent que les margines sont riches en tanins et AISSAM (2003) confirme que les margines contiennent aussi bien les tanins hydrolysables pouvant être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique, que les tanins catéchiques.

2.2.4. Mise en évidence de la présence des anthocyanes dans les extraits phénoliques issus des margines

Dans le but de mettre en évidence la présence des anthocyanes dans l'échantillon de margines brutes, un traitement d'acidification est apporté. La coloration rouge indicatrice de la présence d'anthocyanes est apparue.

2.3. Evaluation de l'activité antioxydante avant et après déglycosylation

2.3.1. Etude du potentiel réducteur sur ferrocyanure de potassium des polyphénols extraits par différents solvants avant et après traitements d'hydrolyse chimique (acide et alcaline)

Par ce test, on évalue la capacité d'un composé à transformer le Fe^{3+} en Fe^{2+} . On détermine ainsi la capacité de ce composé à donner des électrons. Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action anti-oxydante. Plus l'absorbance mesurée à 700 nm augmente plus le pouvoir réducteur du composé est élevé (EBRAHIMZADEH *et al*, 2008).

La figure 43 montre les DO lues lors du test de réduction du ferrocyanure de potassium par quelques polyphénols et l'acide ascorbique pris comme étalons.

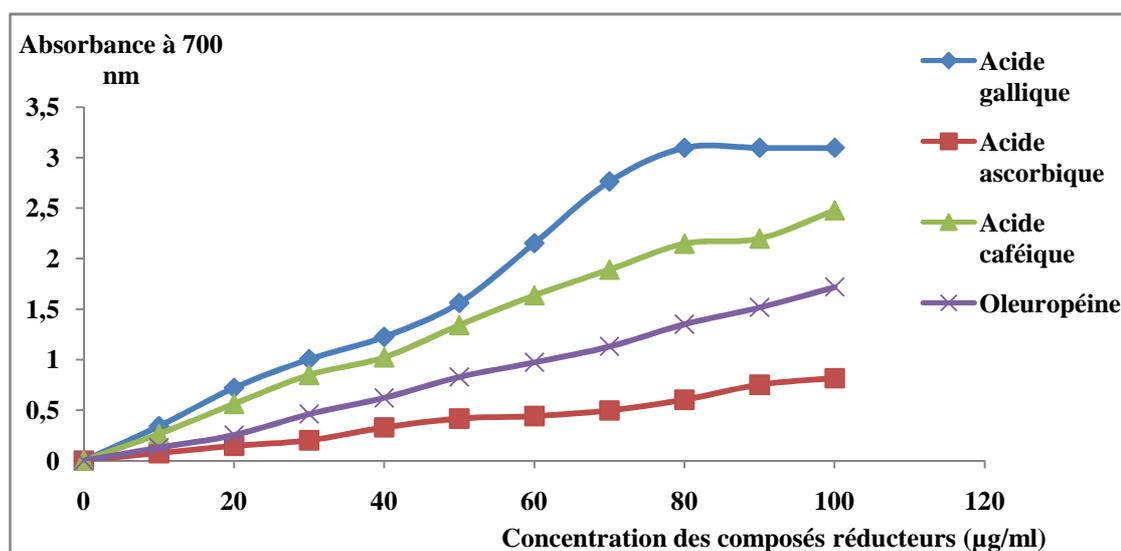


Figure 43 : Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium des étalons.

Le pouvoir réducteur des quatre étalons évolue avec l'augmentation des concentrations.

Visiblement l'acide gallique réduit plus rapidement et plus efficacement le ferrocyanure de potassium, suivi de l'acide caféique. Cette figure montre également que l'acide ascorbique possède un pouvoir réducteur qui est relativement faible. L'activité réductrice de l'oleuropeine s'avère être intermédiaire, cela a été confirmé par les travaux de GULCIN (2006).

Le potentiel réducteur des composés phénoliques extraits des margines brutes par différents solvants organiques est évalué. Les résultats du test sont représentés dans la figure 44.

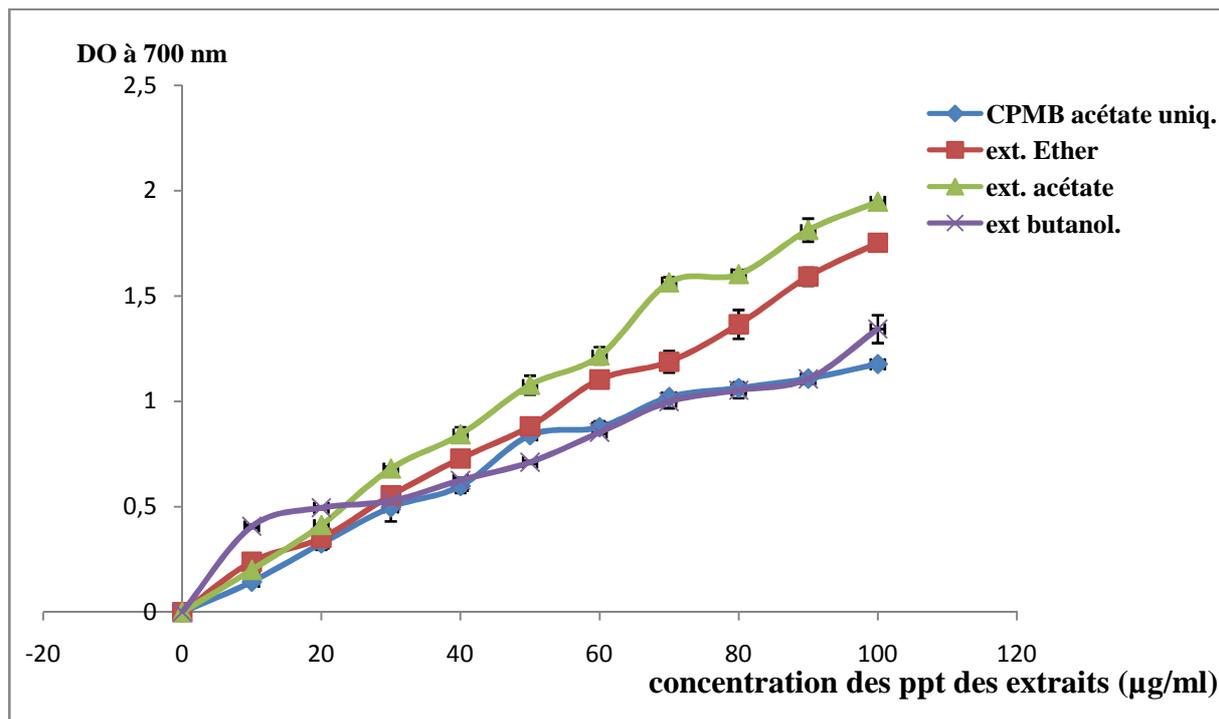


Figure 44 : Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques issus des margines brutes obtenus par différents solvants.

Pour comparer l'activité des différentes substances, on détermine le pouvoir réducteur $PR_{0,5AU}$ défini comme la quantité d'une substance en µg par ml du volume réactionnel qui donne une unité d'absorbance de 0,5 à 700 nm (ARDESTANI et YAZDANPARAST, 2007).

Les figures 45, 46 et 47 reprennent les résultats de l'évaluation de l'activité réductrice des extraits phénoliques obtenus avant et après hydrolyses acide et alcaline.

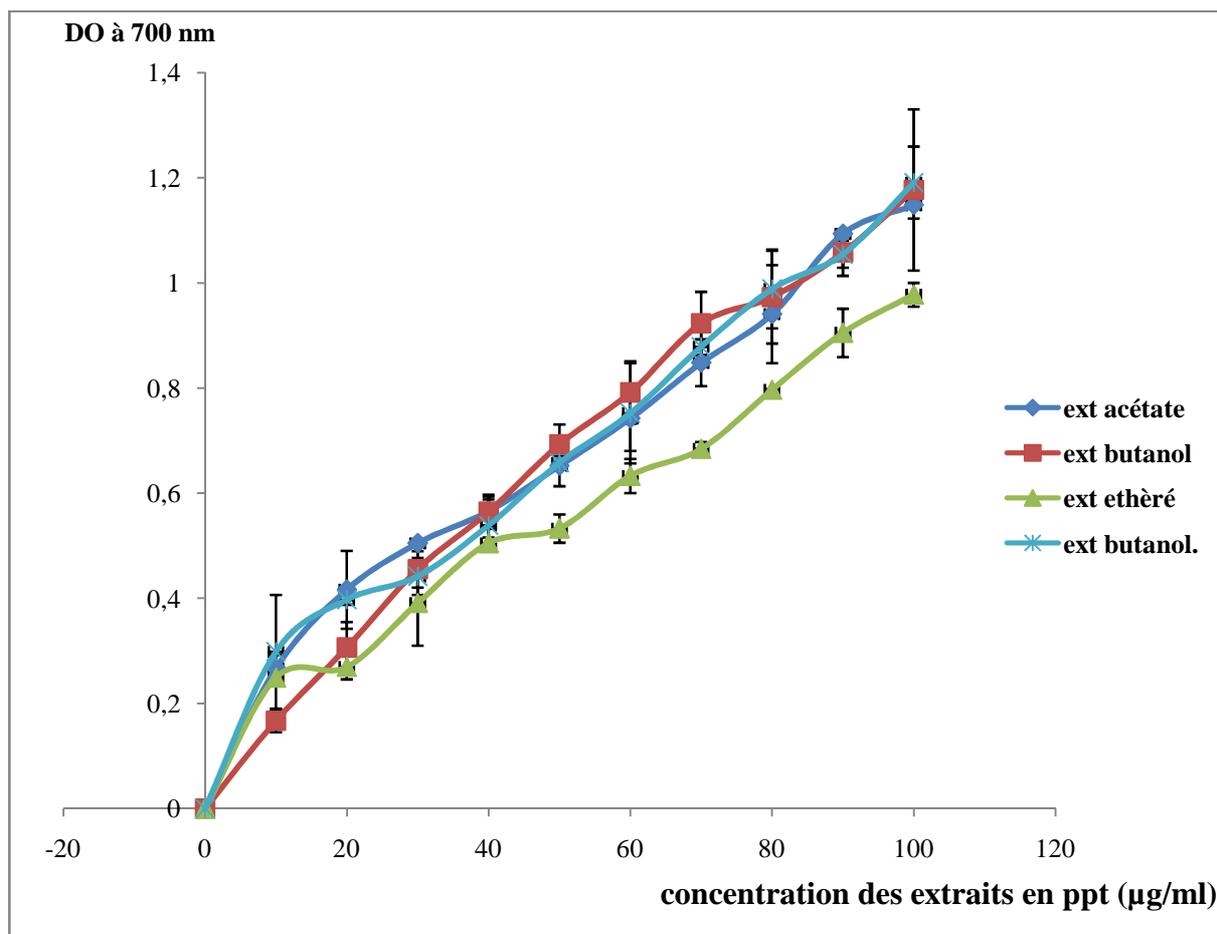


Figure 45: Pouvoir réducteur des extraits phénoliques issus d'une hydrolyse avec HCl 2N.

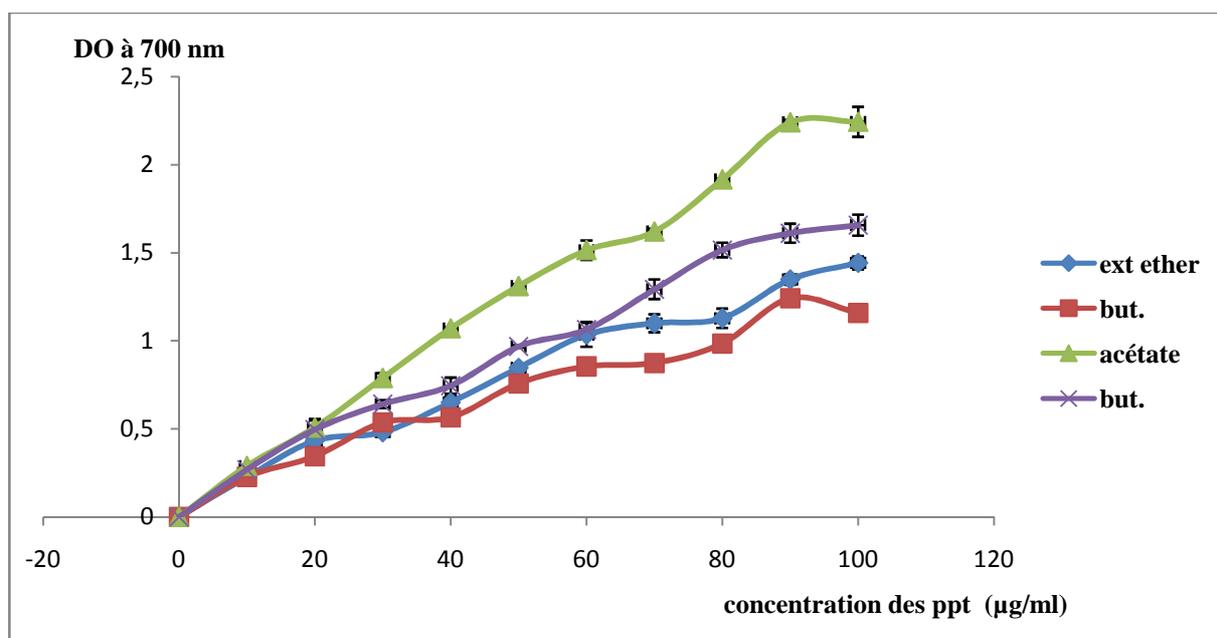


Figure 46 : Pouvoir réducteur sur ferrocyanure de potassium des quatre extraits issus de l'hydrolyse avec HCl 6N.

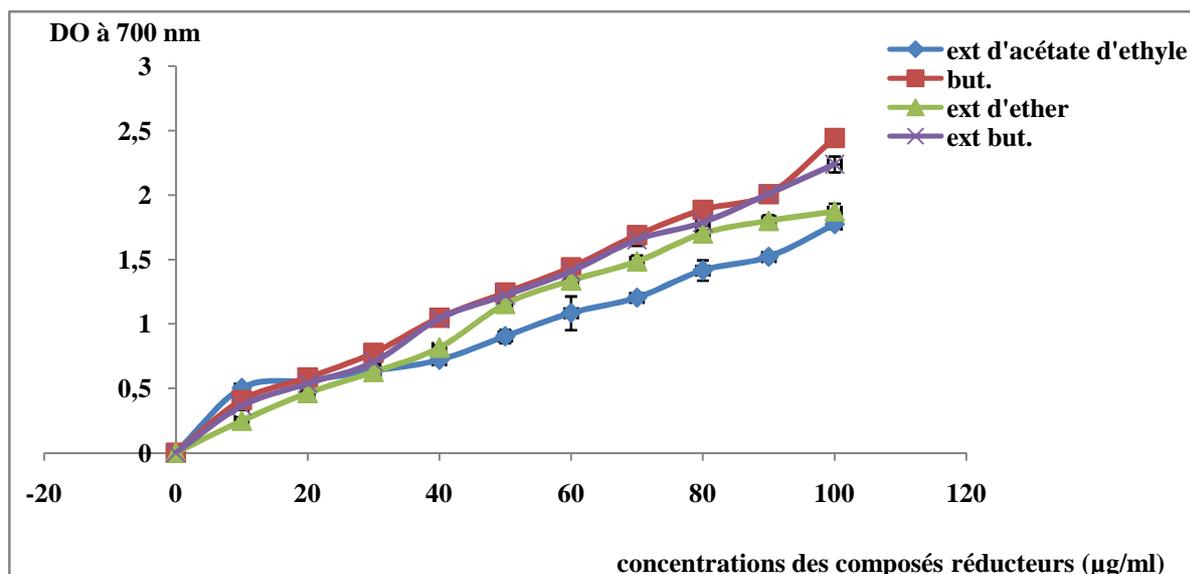


Figure 47 : Pouvoir réducteur sur ferrocyanure de potassium des extraits obtenus après hydrolyse alcaline suivie de l'hydrolyse acide.

De ces figures, nous ne pouvons pas être formels en excluant toute incertitude et comparer directement les courbes données par la cinétique des composés contenus dans les extraits. Pour cela, on a introduit le paramètre $PR_{0,5}$ qui permet de les comparer selon la concentration pour laquelle le produit de la réduction donne une absorbance de 0,5. Ce paramètre étant introduit pour comparer la rapidité et l'efficacité des composés à céder des électrons se montre indispensable pour une comparaison des capacités réductrices.

Tableau XXI : Concentrations des extraits obtenus avant et après déglycosylation donnant après réduction du ferrocyanure de potassium une densité optique de 0,5.

| Extrait | Concentrations donnant une DO=0,5 à 700 nm (µg/ml) |
|-----------|--|
| CPMB | 33,27 |
| Eth | 26,88 |
| Acét | 23,47 |
| But | 24,2 |
| Acét 2N | 34,33 |
| But 2N | 35,73 |
| Eth 2N | 45,25 |
| But'2N | 33 |
| Acét 6N | 28,38 |
| But 6N | 34,30 |
| Eth 6N | 17,72 |
| But' 6N | 22,19 |
| Acét ALCA | 18,43 |
| But ALCA | 16,52 |
| Eth ALCA | 21,10 |
| But' ALCA | 17,09 |

Ces concentrations nous renseignent sur l'efficacité des composés phénoliques à réduire le ferrocyanure de potassium. Elles sont inversement proportionnelles à l'activité anti-oxydante, la concentration la plus faible correspond à l'activité la plus importante. Il apparaît clairement que les extraits éthers obtenus avant et après les traitements d'hydrolyse contenant les composés les moins glycosylés voire même aglycones présentent des activités moins importantes que celles des composés extraits au *n*-butanol et à l'acétate d'éthyle. Cependant, l'extrait étheré (Eth 6N) obtenu après hydrolyse avec HCl 6N présente un $PR_{0,5}$ plus faible (17,72 µg/ml) que celui de l'extrait butanolique (22,19 µg/ml) et l'extrait d'acétate (Acét 6N) semble être plus efficace (28,38µg/ml) que l'extrait butanolique (34,30 µg/ml). On pourrait expliquer ces différences par la différence de la composition des extraits en composés phénoliques (DORMAN et HILTUNEN, 2010).

Une analyse statistique a été réalisée dans le but de concrétiser les différences existant entre les extraits et d'interpréter aussi bien biologiquement que statistiquement l'existence de ces différences.

La raison la plus plausible est le mécanisme d'action de HCl utilisé à différentes concentrations dans les deux méthodes utilisées (2N et 6N). Selon RIBEREAU-GAYON (1968), la durée du traitement semble aussi jouer un rôle dans la différence des produits de dégradation libérés.

Visiblement, les formes aglycones de l'extrait étheré (Eth 6N) sont plus actives que celles à plus haut degré de glycosylation (mono, di et tri-O-glycosylées) résistantes au traitement acide et extraites par des solvants plus polaires que l'éther (l'acétate d'éthyle et le n-butanol). Cette différence semble être due aux fonctions phénoliques à haut pouvoir réducteur engagées dans des liaisons glycosidiques et libérées après rupture de cette même liaison exerçant ainsi une meilleure activité (CRETU *et al*, 2013).

2.3.2. Pouvoir anti-oxydant par le test au DPPH

L'activité anti-oxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Ces radicaux libres tant décrits dans diverses pathologies. Dans le but de pallier le système de défense endogène, les recherches s'orientent dans la découverte de molécules antioxydantes. Ainsi pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons employé la méthode au DPPH. Ce radical libre présente une coloration très sombre. Lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la coloration de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (EBRAHIMZADEH *et al*, 2010).

L'activité anti oxydante des différents extraits (obtenus à partir des margines avant et après traitements chimiques) est évaluée en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm.

L'activité antioxydante de la rutine, un flavonoïde glycosylé, et celle de son homologue aglycone, la quercétine, a été évaluée. Une représentation graphique est dressée et est représentée dans la figure 48.

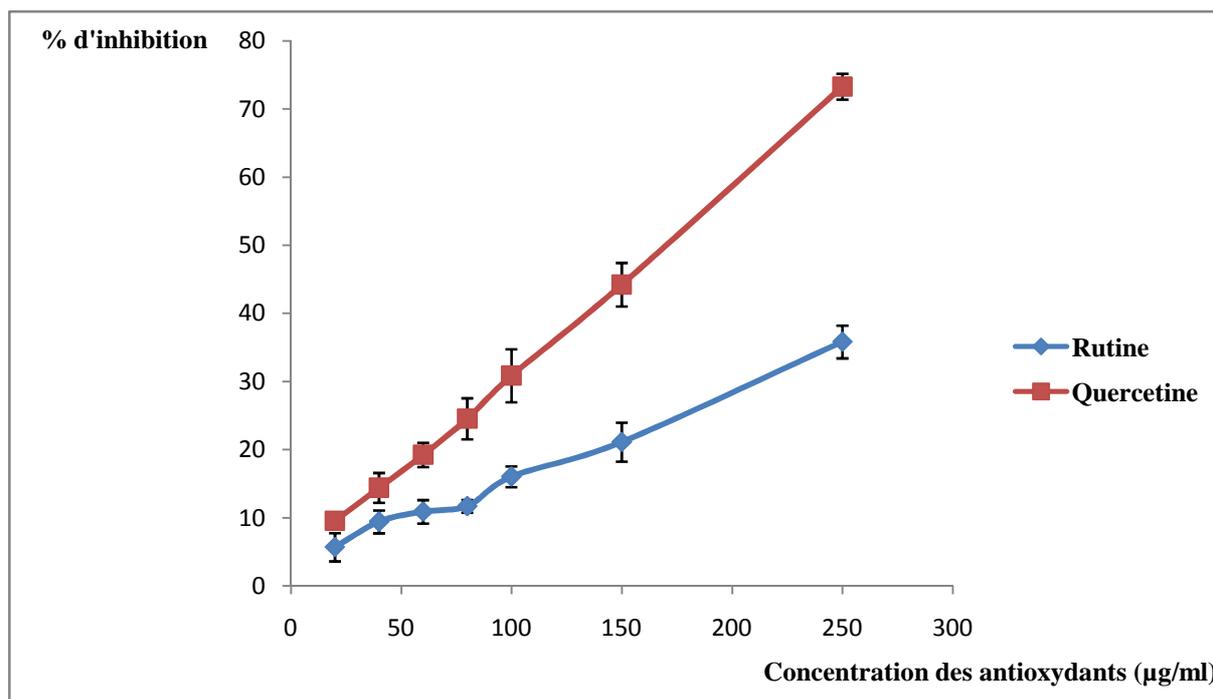


Figure 48 : L'activité antioxydante de la rutine et de la quercétine.

Cette représentation illustre bien la différence d'activité anti-radicalaire, entre la forme glycosylée et la forme aglycone. Pour pouvoir bien les comparer, des courbes de régression ont été établies pour calculer la concentration efficace pour réduire 50 % de DPPH (IC50) de chacune des deux formes (figure 49 et 50). Il est clairement établi que la quercétine qui est un aglycone possède un pouvoir anti-DPPH plus important que celui de la rutine qui est glycosylé. Les valeurs d'IC50 sont données dans le tableau XX.

Ceci pourrait prouver le rôle de la fonction hydroxyle ; lorsque celle-ci est libre, elle contribue à la potentialisation de l'effet biologique de la quercétine, tandis que lorsque cette même fonction est bloquée par le sucre (dans la structure de la rutine) l'activité diminue (SOKOL-LETOWSKA et *al*, 2007).

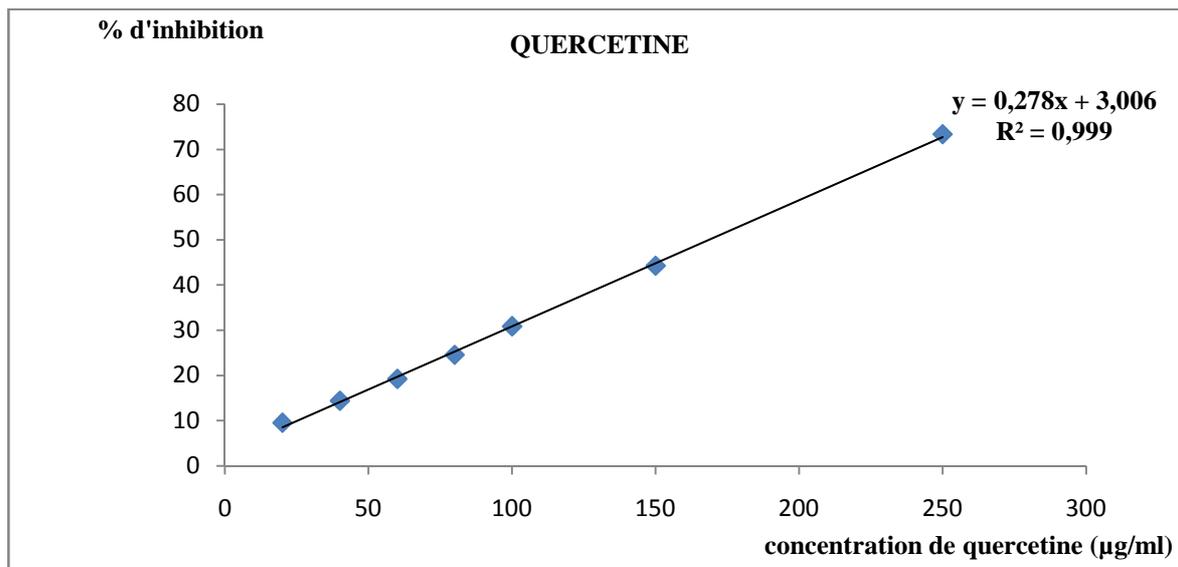


Figure 49 : Courbe de régression de l'activité antioxydante de la quercétine.

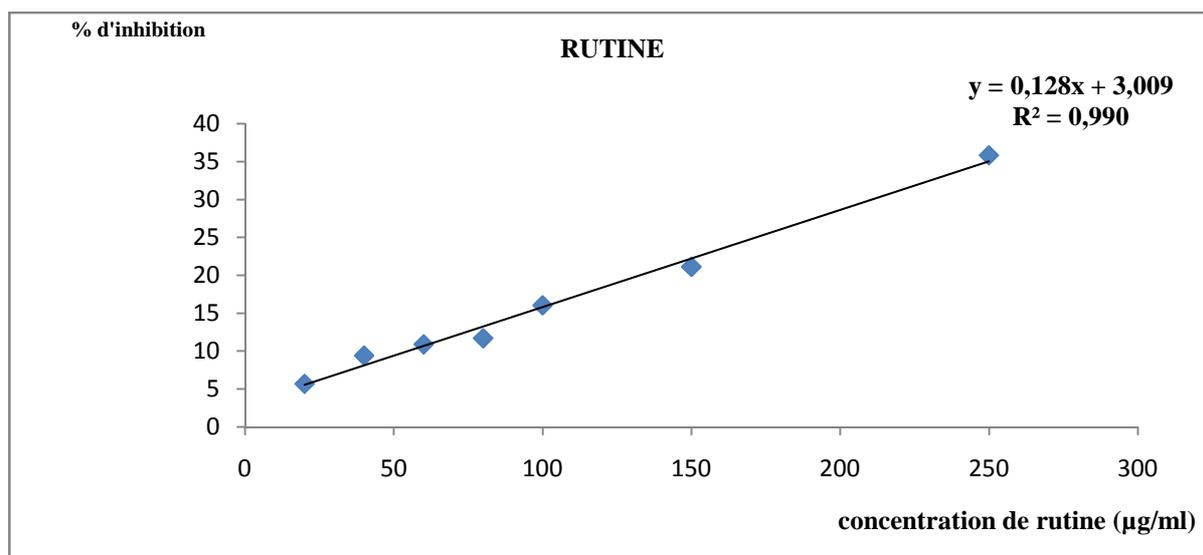


Figure 50 : Courbe de régression de l'activité antioxydante de la rutine.

Les courbes représentées en figures 51, 52, 53 et 54 correspondent aux activités des composés phénoliques extraits par différents solvants organiques à partir des margines avant et après traitements chimiques d'hydrolyse.

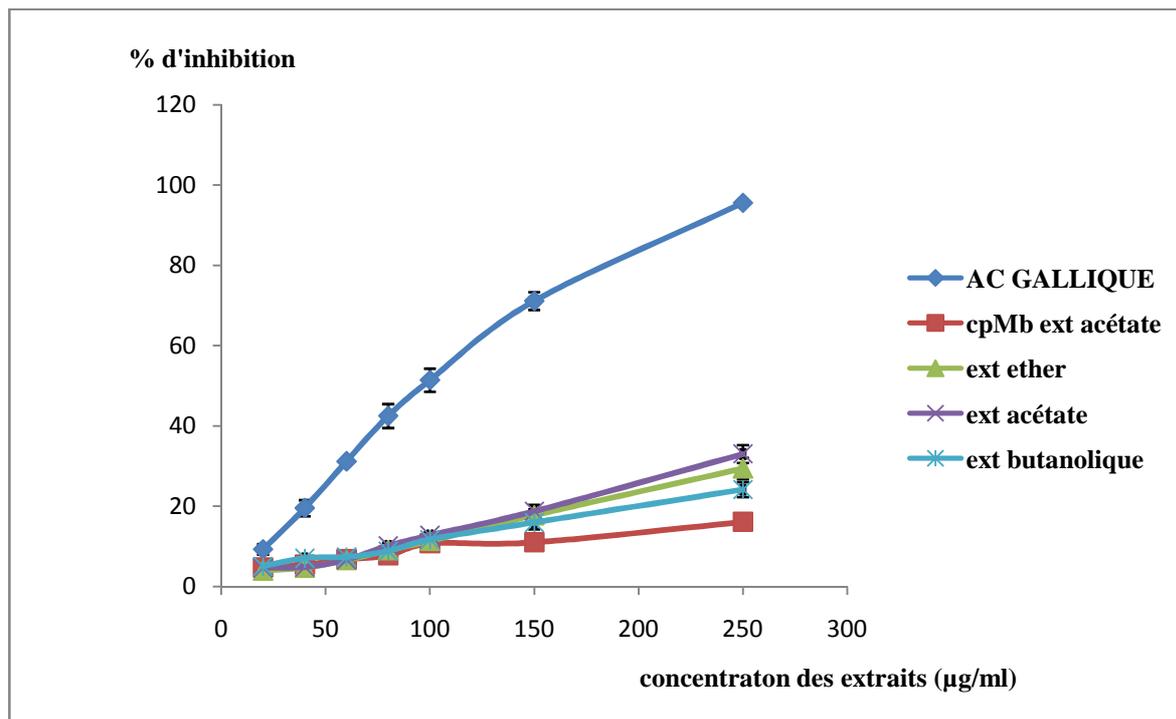


Figure 51 : Activité antioxydante des polyphénols extraits des margines brutes par différents solvants organiques.

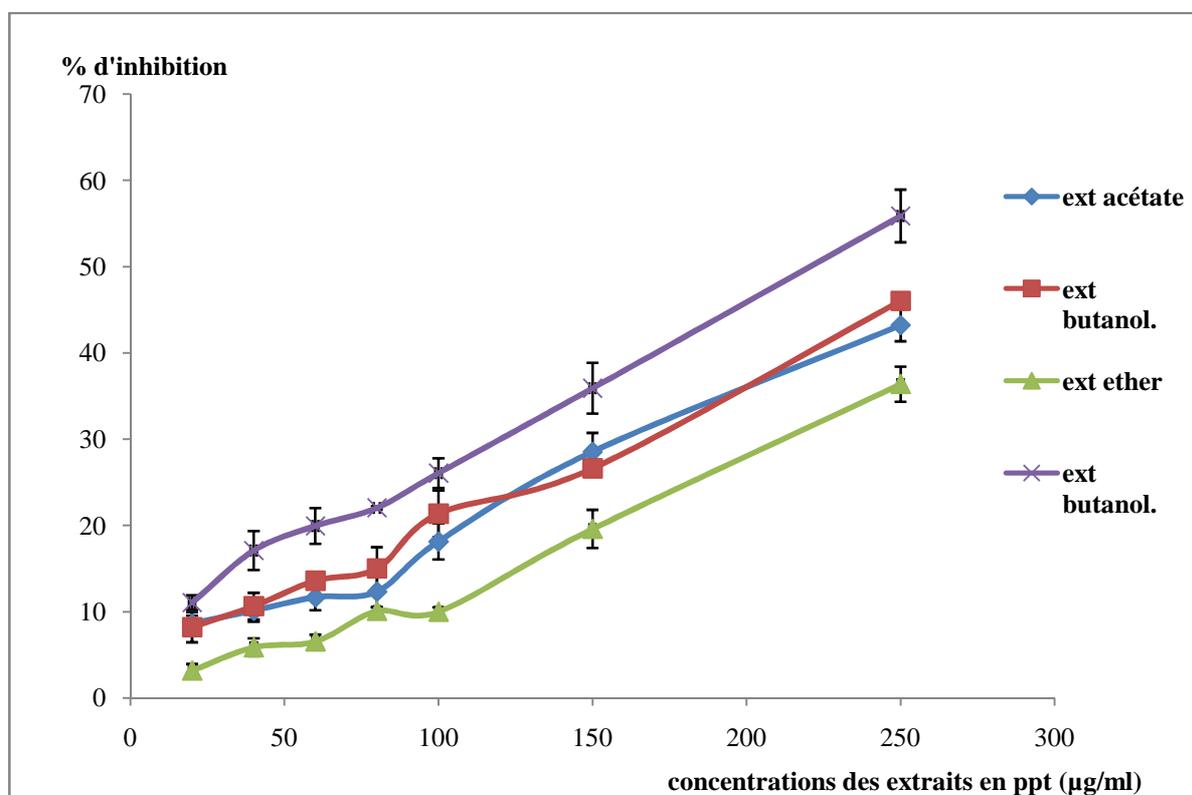


Figure 52 : Activité anti-DPPH des polyphénols des extraits méthanoliques obtenus suite à l'hydrolyse acide (HCl 2N).

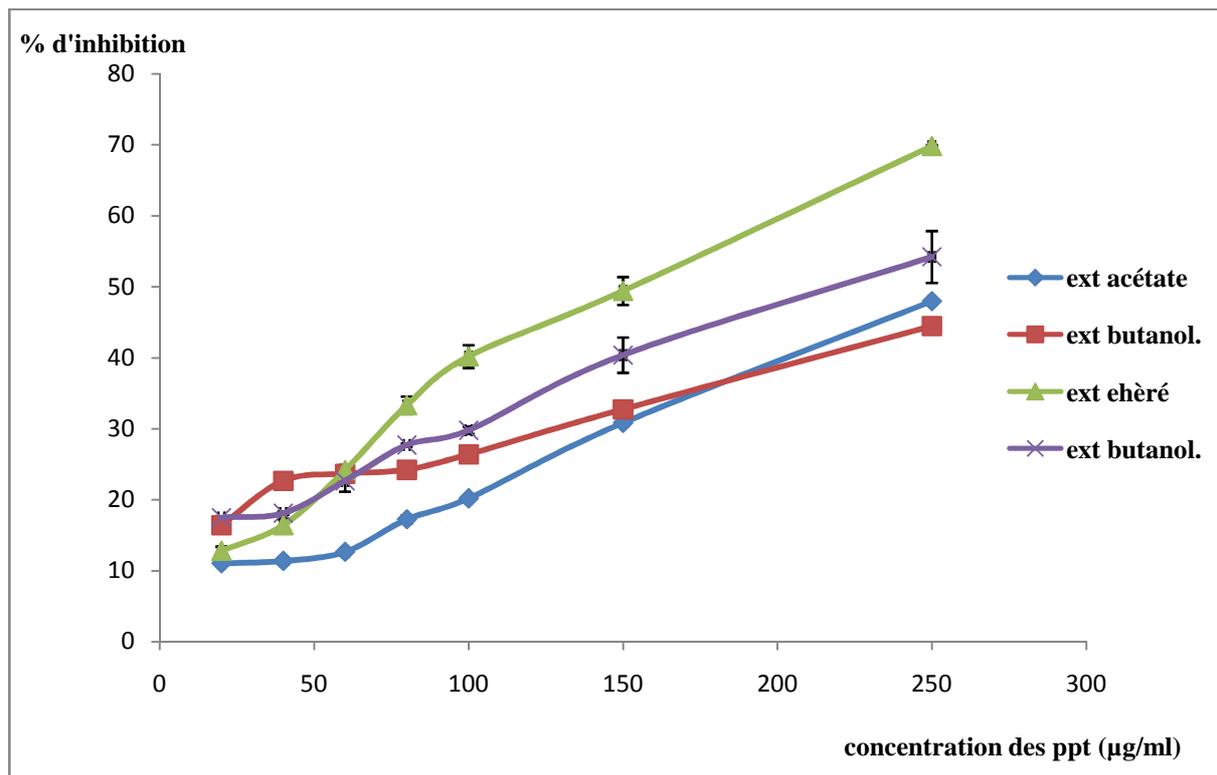


Figure 53 : Activité anti-DPPH des extraits phénoliques obtenus après hydrolyse avec HCl 6N.

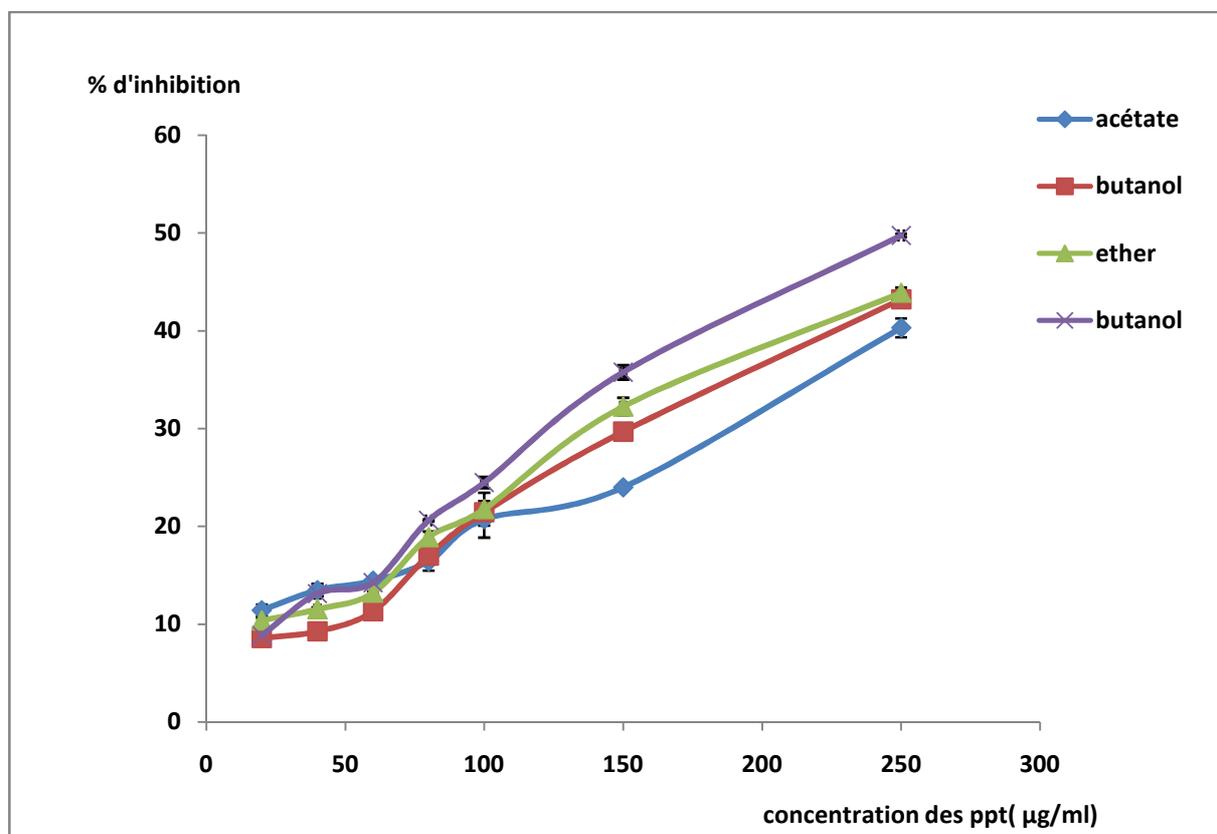


Figure 54 : Activité antioxydante des extraits phénoliques obtenus suite à l'hydrolyse alcaline suivie de l'hydrolyse acide.

Pour calculer l'IC50, on détermine l'équation de la droite de régression pour chaque courbe et on calcule pour une inhibition de 50 % la concentration correspondante.

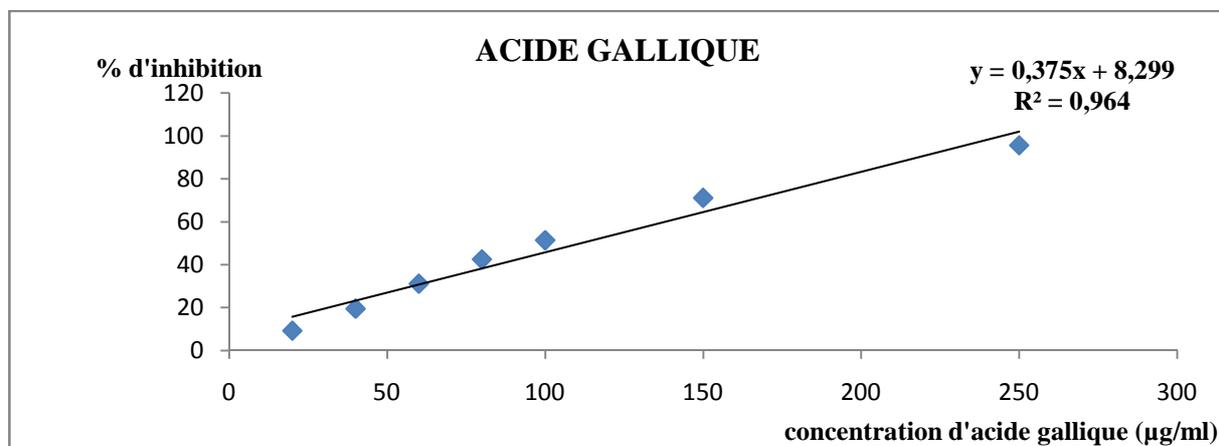


Figure 55 : Courbe de régression de l'activité antioxydante de l'acide gallique.

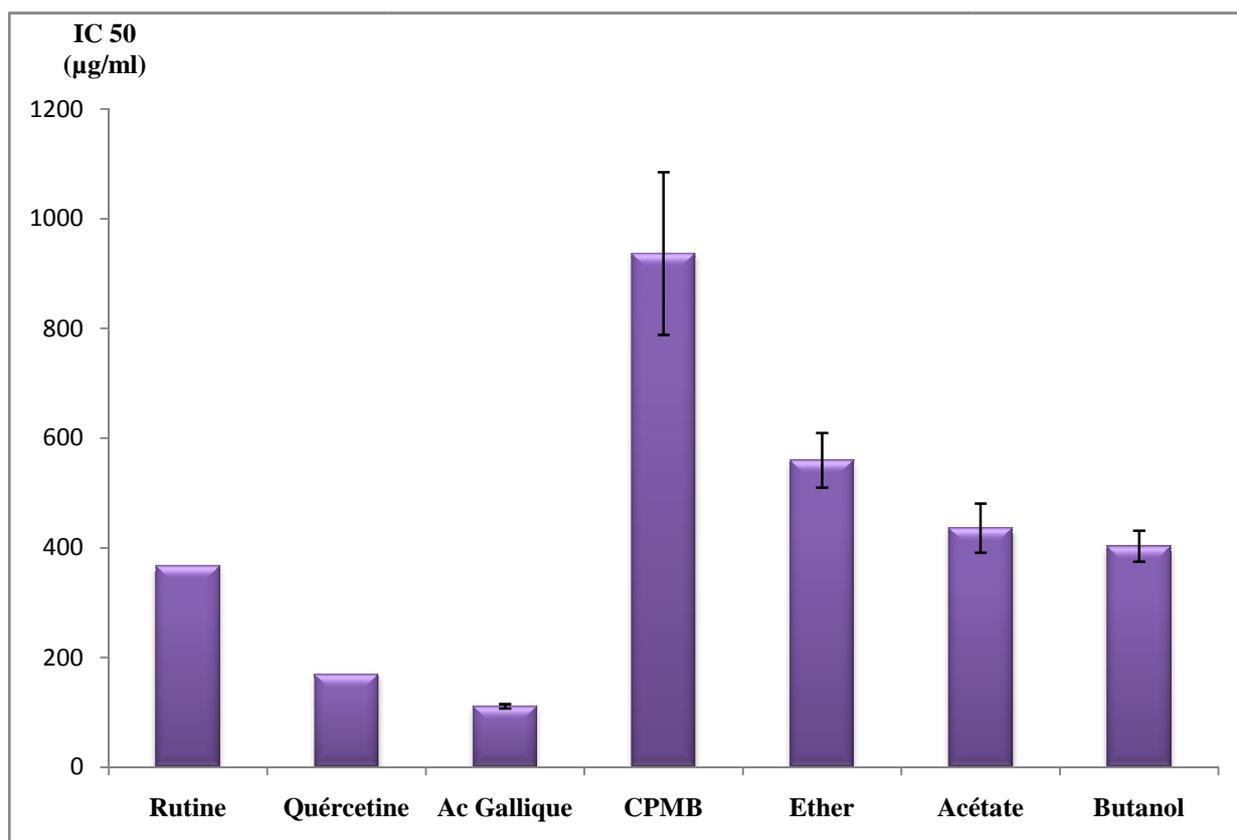


Figure 56 : Les valeurs d'IC50 des polyphénols extraits par différents solvants à partir des margines ainsi que celles des étalons.

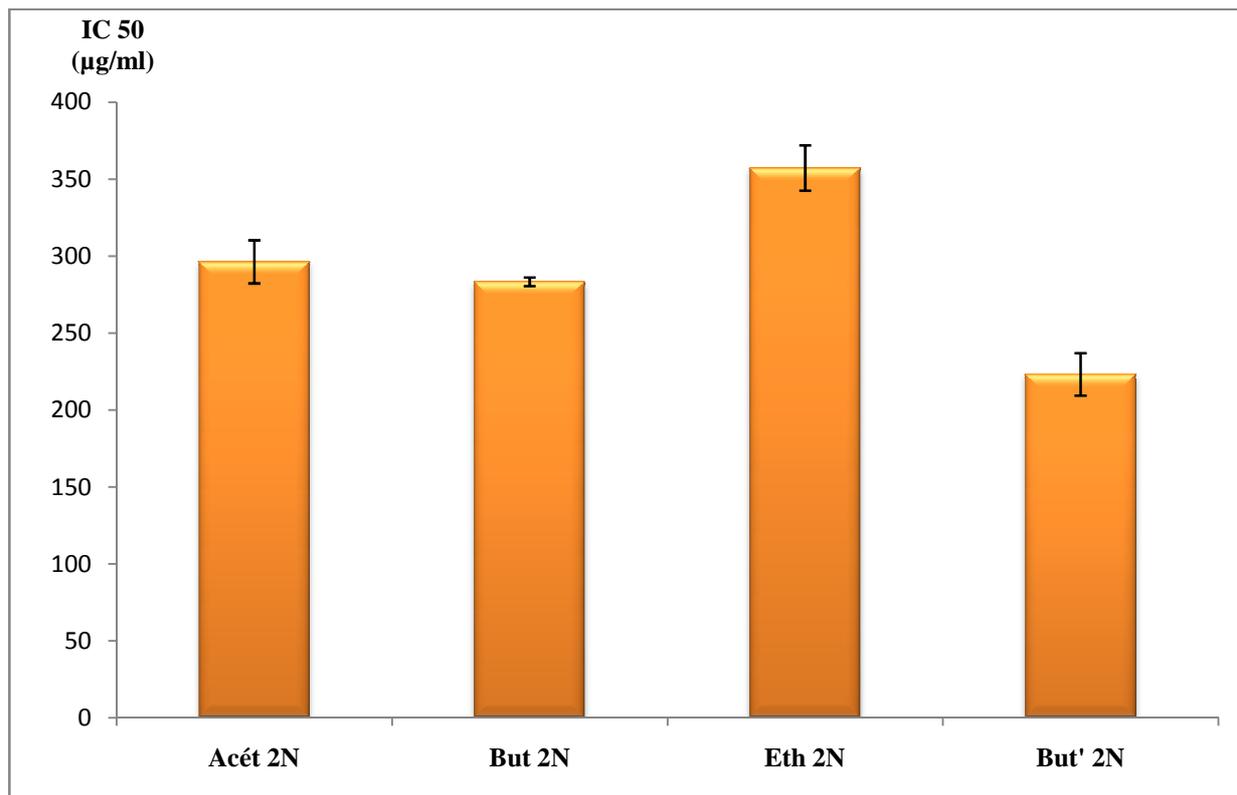


Figure 57 : Valeurs des IC₅₀ des polyphénols extraits après hydrolyse avec HCl 2N.

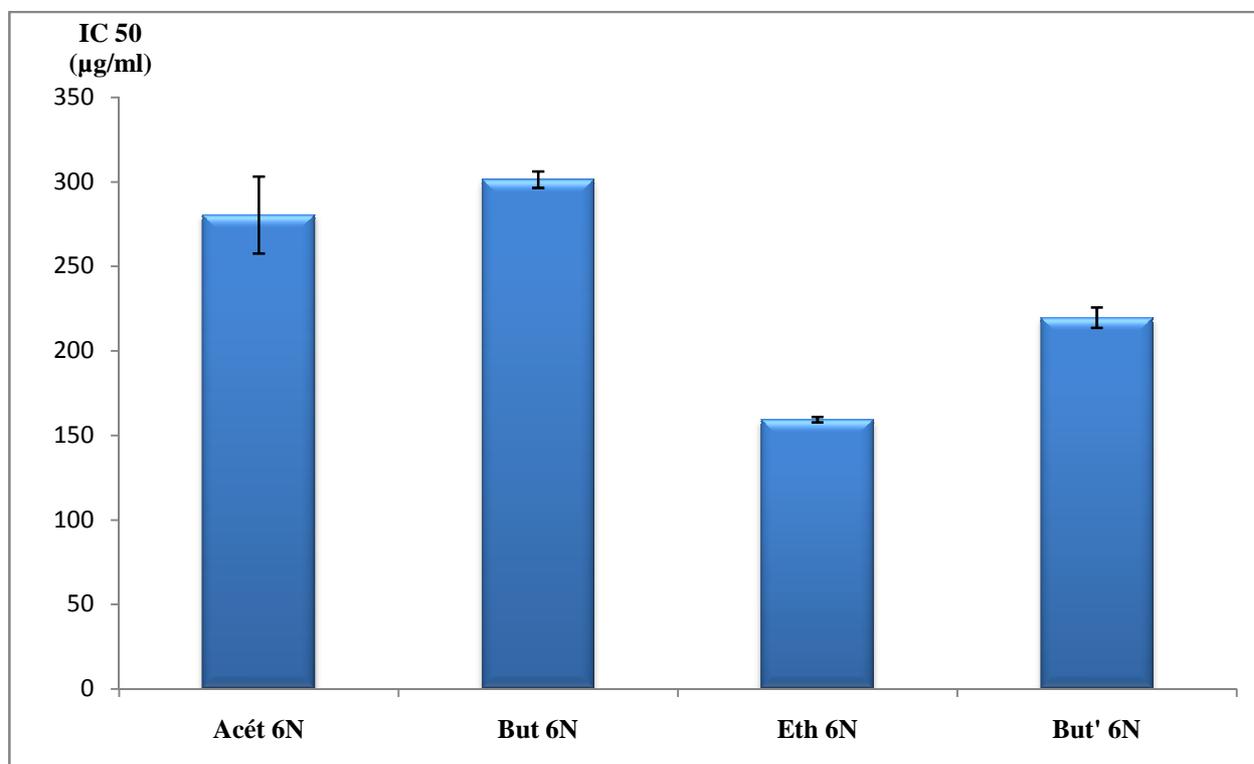


Figure 58 : Valeurs des IC₅₀ des polyphénols extraits par différents solvants après traitement avec HCl 6N.

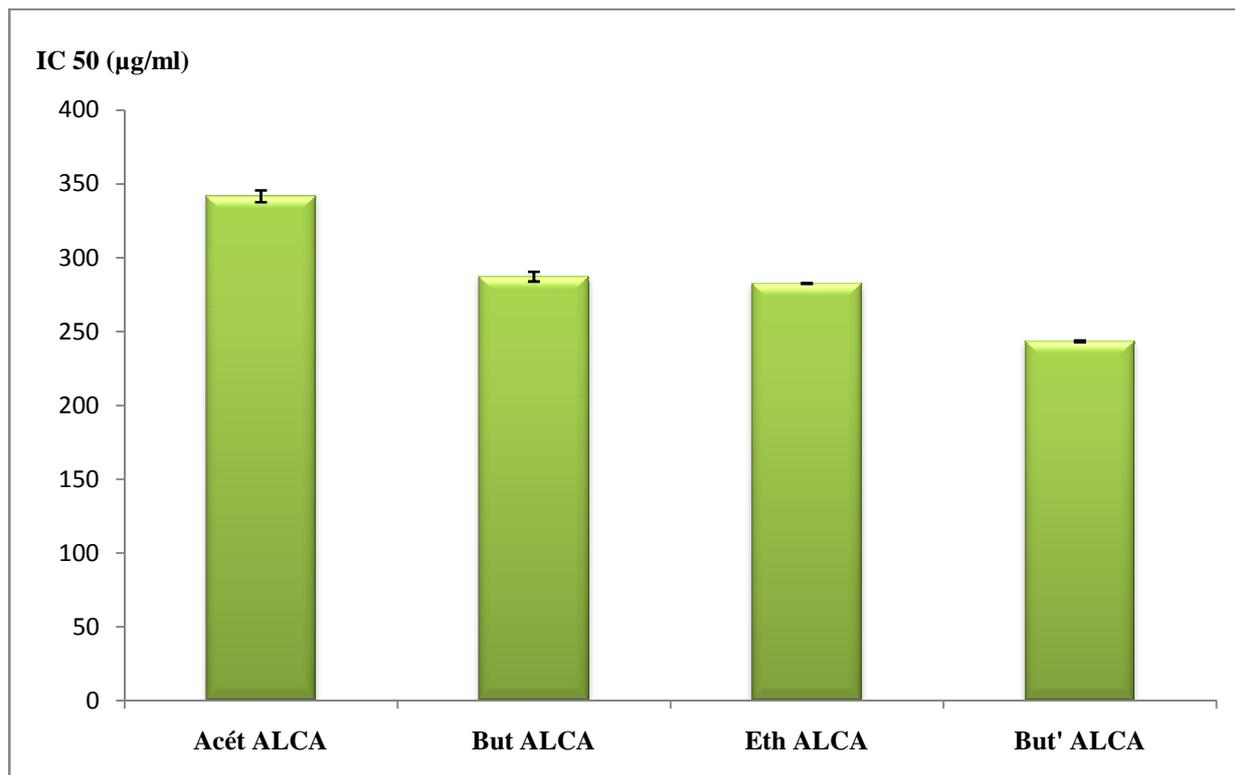


Figure 59 : Valeurs des IC50 des polyphénols extraits par différents solvants après traitement alcalin suivi d'une hydrolyse acide.

Les figures 56, 57, 58 et 59 représentent les concentrations des extraits phénoliques obtenus avant et après traitements de déglycosylation ainsi que celles des étalons réduisant la quantité de DPPH à 50% (IC50).

La différence de l'activité est mise en évidence en utilisant ce paramètre (IC50) qui est inversement proportionnel au potentiel d'anti-radicalaire d'un anti-oxydant, une valeur d'IC50 faible correspond à une activité élevée.

Ces figures montrent également que les étalons et les extraits possèdent des capacités de neutralisation importantes ; des différences de potentiel anti-oxydant entre les extraits subsistent. Ces variations peuvent être dues à la composition des extraits en molécules anti-oxydantes. L'acide gallique a montré (figure 59) une meilleure activité, due à la présence des groupements (OH) hautement réducteurs ce qui a été confirmé par de nombreux chercheurs, à titre d'exemple (RIBEREAU-GAYON, 1968 ; GULCIN, 2006).

La quercétine montre une meilleure activité par rapport à celle de son homologue glycosylé, la rutine, mettant ainsi en relief l'importance de certaines fonctions phénoliques à haut pouvoir réducteur qui, lorsqu'elles sont impliquées dans des liaisons glycosidiques en engageant ces mêmes fonctions, donnent une activité inférieure due au blocage des fonctions actives (EL HADJII *et al*, 2006).

La figure 56 nous renseigne aussi sur les potentiels à piéger les radicaux libres des extraits issus des margines brutes, qui ne sont pas aussi importants que celui de l'acide gallique. Au fait, un même anti-oxydant testé séparément à l'état pur donne une activité différente que lorsqu'il se retrouve dans une communauté (mélange) de molécules ayant des contributions différentes (phénomènes de synergie, d'antagonisme et de compétition) (EL HAJJI *et al.* 2006).

Le test antiDPPH des extraits obtenus à partir des margines par des solvants à polarités différentes a montré que l'extrait butanolique était plus actif que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait étheré. Cela prouve que les molécules les plus polaires ayant des formes glycanes dans leurs structures, piègent le radical DPPH plus rapidement que les autres formes moins polaires. Dans ce cas, il est constaté que les sucres contribuent à la potentialisation de l'effet anti-radicalaire et réducteur par l'intervention de leurs fonctions hydroxyles (OH) réductrices la même explication a également été fournie par (DORMAN et HILTUNEN, 2010 ; CRETU *et al.*, 2013).

Dans le tableau XXII, sont reprises en ordre croissant les concentrations inhibitrices efficaces pour réduire 50% de DPPH (IC50) des différents extraits obtenus à partir des margines avant et après déglycosylation.

Tableau XXII : Valeurs des IC50 des polyphénols extraits des margines avant et après déglycosylation.

| Fraction | IC 50 (µg/ml) | ARP (x10 ⁻³) |
|-----------|---------------|--------------------------|
| Eth 6N | 159,25± 1,53 | 63 |
| But' 6N | 219,57±6,03 | 45 |
| But' 2N | 223,24±13,78 | 45 |
| But' ALCA | 243,48±0,56 | 41 |
| Acét6N | 280,36±22,74 | 35 |
| But 2N | 283,32±2,79 | 35 |
| Eth ALCA | 282,67±0,23 | 35 |
| ButALCA | 287,26±3,29 | 35 |
| Acét 2N | 296,32±13,98 | 34 |
| But 6N | 301,27±4,87 | 33 |
| Acét ALCA | 341,70±4,03 | 29 |
| Eth 2N | 357,29±14,71 | 28 |
| Eth | 559,83±49,68 | 25 |
| Acét | 436,19±44,79 | 23 |
| But | 403,18±28,28 | 18 |
| CPMB | 936,7±148 | 1 |

Les figures 57, 58 et 59 ainsi que le tableau représenté ci-dessus montrent qu'il y a des différences au niveau de la composition des différents extraits. Ces derniers comprennent des molécules pouvant être différentes tant au niveau structural qu'au niveau « propriétés chimiques ». A titre d'exemple, les deux extraits éthers obtenus par hydrolyse en milieu HCl 2N et en utilisant HCl 6N présentent des profils chromatographiques différents témoignant d'une composition différente. De ce fait, ils présentent des capacités de neutralisation du DPPH différentes puisque l'extrait (Eth 6N) possède une capacité anti-oxydante ($ARP \cdot 10^{-3} = 63$) et l'extrait (Eth 2N) ($ARP \cdot 10^{-3} = 28$) soit deux fois plus efficace. Les aglycones libérés par la méthode de traitement acide des margines avec HCl 6N présenteraient dans leurs structures des groupements plus actifs que ceux présents dans les structures des aglycones des autres extraits éthers Eth 2N et Eth ALCA.

Les extraits butanoliques obtenus après l'extraction à l'éther diéthylique (But'6N) et (But' 2N) suite aux traitements utilisant HCl 2N et 6N semblent donner la même capacité anti-oxydante ($ARP \cdot 10^{-3} = 45$) laissant penser que les entités moléculaires contenues dans les deux extraits sont identiques, et que les polyphénols glycosylés ayant échappé aux traitements d'hydrolyse sont les mêmes, mais le traitement statistique des résultats révèle que l'extrait (But' 6N) est plus actif que les autres extraits butanoliques (annexe 13).

Il a été constaté, par les tests réalisés dans cette partie, que les extraits sont différents aussi bien qualitativement que quantitativement.

Le traitement statistique des résultats des pourcentages d'inhibition calculés pour chaque concentration des composés phénoliques extraits avant et après déglycosylation par l'analyse de la variance (ANOVA à deux facteurs), le premier est la concentration car le pouvoir anti-oxydant varie selon la concentration et le type de solvant utilisé.

Les différents extraits phénoliques sont alors analysés selon les valeurs de pourcentages d'inhibition qu'ils présentent en fonction des concentrations, trois répétitions d'évaluation de l'activité anti-DPPH ont été prises en compte.

Les résultats du test montrent qu'il y a formation des groupes homogènes classés dans le tableau en Annexe 13 (de A à K) selon un ordre décroissant de la moyenne la plus élevée attribuée à l'acide gallique pris comme référence, à la plus faible appartenant aux composés phénoliques totaux des margines brutes (CPMB). Au sein d'un même groupe homogène, les différences entre les extraits n'existent pas. Tandis qu'entre groupes homogènes, les différences sont très hautement significatives ($P=0,0 < 0,001$).

Le groupe (B) qui suit l'acide gallique (A) est constitué uniquement d'un seul extrait (Eth 6N) qui s'est avéré le plus puissant le comparant à d'autres extraits, prouvant ainsi que ce type d'hydrolyse libère des composés aglycones qu'on a pu extraire à l'éther et qui possèdent une activité anti-radicalaire assez importante présentant des différences significatives au seuil de 0,1% .

La variable mesurée (pouvoir anti-oxydant) varie donc d'un solvant à un autre, on remarque que la probabilité d'acceptation de l'hypothèse qu'il n'y aurait pas de différences entre l'activité des extraits phénoliques est de (0,0.), soit, une valeur inférieure à un pour mille ($P=0,001$), les différences entre les groupes de solvants sont donc très hautement significatives. Selon ce même tableau, on constate que la plupart des extraits butanoliques montrent une bonne activité. Ainsi, on pourrait également remarquer que l'extrait étheré (Eth ALCA) obtenu après hydrolyse alcaline suivie d'hydrolyse acide est plus efficace que l'extrait étheré (Eth 2N) obtenu suite à l'hydrolyse à l'HCl 2N. La différence entre l'activité des extraits est due à la différence de composition des échantillons testés.

Discussion générale :

RODI *et al.* (2002) ont rapportés qu'après extraction de l'huile d'olive, moins de 2% des composés phénoliques de fruit (annexe 14) se retrouvent dans celle-ci et plus de 98% passent dans les margines appelées aussi eaux de végétation, par conséquence, ce résidu peut être considéré comme une source importante de ces composés. La qualité et la quantité des polyphénols contenue dans les margines dépendent de plusieurs facteurs qui sont en général d'ordre géographique, variétal, saisonnier et le mode d'extraction.

Les polyphénols sont fréquemment rencontrés sous forme glycosylée. La présence d'un sucre modifie les propriétés de la molécule par rapport à son analogue non glycosylé en particulier sa solubilité et son hydrophobicité (BOUZID *et al.*, 2011). La liaison entre l'aglycone et l'ose se fait généralement par l'un des hydroxyles phénoliques, en particulier ceux en position 3 (pour les flavonols) ou en 7 (pour les flavones) et parfois en 6 ou 8 si ces positions sont hydroxylées. Les acides phénoliques quant à eux, lient les sucres par estérification de leurs fonctions acides. Les principaux monosaccharides entrant dans leur composition sont : le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique, le L-arabinose, le D-xylose, et occasionnellement le D-allose, l'apiose et le D-mannose. Les sucres les plus couramment rencontrés sont le D-glucose et le L-rhamnose (ALMELA *et al.*, 2006 ; MANCHEIX *et al.*, 2005).

Les taux de polyphénols, de flavonoïdes et de sucres totaux sont estimés en utilisant des courbes d'étalonnage respectivement à l'acide gallique ($R^2=0,999$), à la quercétine ($R^2=0,997$) et au D-glucose ($R^2=0,998$). D'une manière générale, les taux des composés dosés ont augmenté après déglycosylation, surtout par rapport à celui des polyphénols totaux qui s'avère prometteur puisque il témoigne de la libération de certaines entités qui auraient eu des liens glycosidiques avec des structures glycanes. A titre d'exemple, le taux de polyphénols est estimé à $3,64 \pm 0,58$ mg équivalent d'acide gallique EAG/g de matières sèches totales (MST) de l'extrait étheré obtenu sans traitement chimique des margines et s'élève à $35,70 \pm 0,231$ mg d'EAG/g MST après hydrolyse en milieu HCl 2N. L'éther diéthylique extrait les formes aglycones tandis que l'acétate d'éthyle est spécifique aux formes monoglycosylées et le *n*-butanol pour les tri-O-glycosides et les C-hétérosides, pour son caractère polaire (LIU *et al.*, 2014). 412 mg/g MST est la quantité de sucres totaux approximative représentant la fraction glucidique totale dans les margines délipidées (à l'hexane) estimée par la méthode de DUBOIS *et al.* (1956). Une petite partie seulement de cette quantité passe, lors de l'extraction à l'acétate d'éthyle des composés phénoliques, dans l'extrait phénolique (méthanolique) et est estimée à 15,47 mg/g de MS (soit 3,75 %). On pourrait suggérer que cette fraction représente la partie glycane liée aux polyphénols puisque l'acétate d'éthyle est spécifique aux polyphénols (ALLOUCHE *et al.*, 2004 ; LIU *et al.*, 2014).

L'analyse qualitative des extraits polyphénoliques issus des margines brutes et délipidées par la chromatographie sur couche mince a révélé que les deux extraits ont la même composition qualitative et contiennent un nombre considérable de constituants visibles sur les profils chromatographique Les profils chromatographiques prouvent qu'il y a eu bien

libération des polyphénols de liaisons glycosidiques antérieures puisque les extraits obtenus avant et après déglycosylation, présentent des différences au niveau du nombre de taches apparues des extraits butanoliques confirmant ainsi leur contenance en formes glycosylées, au visible déjà et sous UV. Les polyphénols des extraits éthers semblent migrer plus loin que ceux des autres extraits témoignant ainsi de leur caractère peu polaire par l'enlèvement de sucre par les traitements chimiques acide et/ou alcalin préalablement apportés. De plus, la couleur des spots (spots de couleur rouge, bleue, jaune...) confirme la différence entre les formes aglycones ou moins glycosylées libérées par les différents traitements, ceci ne pourrait être expliqué que par le fait des mécanismes d'action de chaque méthode utilisée qui lui est spécifique (on donne l'exemple de l'hydrolyse alcaline libérant les acides phénoliques qui apparaissent sous UV sous des aspects bien propres et des couleurs spécifiques (fluorescence) à la molécule).

Le test au DPPH• n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH• et ainsi d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques. L'évaluation de l'activité anti-radicalaire doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH• à 515-520 nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionné à l'antioxydant.

Les profils d'activité anti radicalaire obtenus révèlent que les extraits possèdent une activité anti radicalaire dose dépendante. LOZIENE *et al.* (2007) ainsi que DAMAK *et al.* (2008) ont rapporté que la concentration en polyphénols totaux est corrélée significativement avec la capacité antioxydante évaluée généralement par le test de DPPH.

Selon BENAVENTE-GARCIA *et al.* (2000), l'activité anti-oxydante de l'oleuropéine est principalement due à la partie hydroxytyrosol dans sa structure. L'autre facteur qui détermine le potentiel antioxydant des CP est la stabilité du radical aroxyl formé (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 2000). Les propriétés anti-oxydantes des O-diphénols sont associées à leur capacité à former des liaisons hydrogènes intermoléculaires entre le groupe hydroxyle et les radicaux phénoxyliques (VISIOLI et GALLI, 1998).

Les résultats que nous avons obtenus, concordent avec ces conclusions tirées par la littérature. D'après les résultats obtenus jusqu'à présent, l'AG a montré globalement la plus haute activité qui peut s'expliquer par le fait que son cycle aromatique porte trois groupes hydroxyles, l'activité anti-oxydante augmentant avec le degré d'hydroxylation (PULIDO *et al.*, 2000 ; ANTOLOVICH *et al.*, 2004). L'AT présente également une activité importante de part sa structure O-diphénolique. L'AT constitué de plusieurs molécules d'AG, montre une capacité réductrice et de piégeage de RL importantes mais le plus souvent légèrement plus faibles que celle de l'AG. Ces résultats ne s'appuient pas toujours que sur le fait de l'augmentation du degré d'hydroxylation.

D'après MOLYNEUX (2004) ; BOUZID *et al.* (2011) et GRESELE *et al.* (2011), plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier. De même pour DAMAK *et al.* (2008) qui ont suivi l'évolution de l'activité des polyphénols issus des olives à différents stades de maturation, ont rapporté que les valeurs des IC50 de ces mêmes extraits phénoliques diminuaient avec la maturation des olives, ceci a été expliqué par la dégradation de l'oleuropeine en hydroxytyrosol et en d'autres composés dérivés dépourvus de molécule de glucose (cas de l'oleacine) ceci a fait l'objet des études menées par CZERWINSKA *et al.* (2012) et IMPELLIZZERI *et al.* (2011 et 2012).

La structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres (MALHEIRO *et al.*, 2011). Des effets synergiques mais aussi antagonistes ont été observés dans des solutions modèles qui contiennent plusieurs composés fonctionnels à activité anti-radicalaire. Néanmoins, ces observations sont basées sur une simple estimation des activités des composés purs et des études plus poussées seraient à mener avec des extraits réels (POPOVICI *et al.*, 2009).

L'évaluation de l'activité anti-oxydante montre qu'il y a une différence entre les formes glycosylées et les formes moins glycosylées ou encore aglycones. En effet, les CPMB extraits à l'acétate d'éthyle montrent le plus faible pouvoir antioxydant (0,001). Lorsque l'extraction est faite sur le même échantillon de margines utilisant des solvants à polarité croissante il a été démontré que les polyphénols retrouvés dans les mêmes margines avaient des pouvoirs réducteurs et anti-radicalaires (ARP) différents puisque chaque ensemble de formes quasiment similaires se retrouve dans un solvant bien défini. Ainsi, les PP des extraits (But), (But2N) et (But'2N) possèdent des ARP significativement supérieurs (0,0018 ; 0,0035 et 0,0045) à ceux des PP des extraits (Eth), (Acét), (Eth 2N) et (Acét2N) avec une probabilité ($P < 0,001$), ce résultat concorde avec les travaux de CRETU *et al.* (2013).

Au contraire, les PP des extraits (But6N) et (But'6N) obtenus suite à l'hydrolyse par HCl 6N, ont des ARP respectifs de 0,0033 et 0,0045 comparativement aux PP des extraits (Acét 6N) et (Eth 6N) avec des ARP respectifs de 0,0037 et 0,0045 prouvant ainsi que les formes des PP libérées par cette méthode et extraites par le *n*-butanol sont différentes de celles extraites par le même solvant et ayant un pouvoir important. De plus, il a été démontré que l'activité antioxydante de l'extrait étheré obtenu après hydrolyse à l'HCl 6N est statistiquement supérieure à celle des extraits butanoliques ($p \leq 0.001$), eux-mêmes sont plus actifs que l'extrait d'acétate d'éthyle obtenu après le même traitement. Il existe probablement des différences qualitatives dans la nature des composés phénoliques des extraits obtenus après les différents traitements chimiques (qui entrent dans la composition des extraits) influençant le pouvoir antioxydant des extraits.

Il a été même constaté que l'activité de l'extrait étheré issu de l'hydrolyse à l'HCl 6N avait une activité statistiquement plus élevée (ARP : 0,0063) que celle de l'extrait étheré issu de l'hydrolyse à HCl 2N (ARP : 0,0028) ceci confirmerait davantage l'hypothèse de la différence de mécanisme d'action des réactions et des produits de dégradation.

De plus, le temps d'exposition de HCl aux molécules phénoliques est différent, faisant ainsi apparaître des différences au niveau de l'activité des extraits qui en découlent. Ceci pourrait être dû à la nature des composés libérés des réactions qui est certainement différente et aux mécanismes mêmes des réactions qui présenteraient des différences.

On pourrait également expliquer ces différences par la présence de certains groupements libérés par un type d'hydrolyse mais pas par un autre, accomplissant cette fonction anti-radicalaire. Dans ce contexte, LIU *et al.* (2014) ont rapporté que les biomolécules phénoliques extraites par l'acétate d'éthyle et par le *n*-butanol possédaient des groupements polaires (parties glycanes) qui leur permettent d'acquérir et de potentialiser certaines fonctions notamment (solubilité, activité scavenging...).

D'ailleurs JU et ses collaborateurs (2012) ont trouvé que l'extrait d'acétate d'éthyle était le plus actif il s'est avéré que ce même extrait contenait une quantité importante d'hydroxytyrosol ce qui fait augmenter l'activité scavenging (anti-radicalaire).

La comparaison entre l'activité des molécules phénoliques extraites par le *n*-butanol (solvant polaire) et celles extraites par les solvants moins polaires (acétate d'éthyle et éther) montre que les formes polaires possèdent une activité relativement meilleure, ce qui pourrait laisser supposer que les formes se trouvant dans l'extrait butanolique possèdent soit, plus de structures glucidiques liées; soit, des groupements hydroxyles (OH) ou autres... possédant un caractère polaire pouvant contribuer à la potentialisation du pouvoir à réduire les radicaux libres. Ceci a été également remarqué et conclu par LIU *et al.* (2014) suite à leur étude sur les extraits butanolique, étheré et d'acétate d'éthyle de composés phénoliques d'un autre matériel végétal ainsi que celle de DORMAN et HILTUNEN (2010) apportant ainsi la même conclusion.

Pourtant, les flavonoïdes glycosylés ont une activité antioxydante inférieure à celle des flavonoïdes non glycosylés. Par exemple la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine, son homologue aglycone (SOKOL-LETOWSKA *et al.*, 2007 ; BOUZID *et al.*, 2011 ; CRETU *et al.*, 2013).

Selon BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) et RICE-EVANS (1996), l'activité peut également différer d'un stéréoisomère à un autre, c'est-à-dire que lors de l'évaluation de l'activité de composés phénoliques dont les structures ne diffèrent que par l'orientation des fonctions phénols (OH) (position ortho, para ...), le pouvoir antioxydant s'avère être nettement différent d'une molécule à une autre. Une étude plus récente menée par CRETU et ses collaborateurs (2013) vient confirmer ces dires, en comparant l'activité de quelques étalons phénoliques (flavonoïdes) qui ne sont différents que par l'orientation des groupements

hydroxyles, la quercétine s'est montrée plus active (TEAC $4,72 \pm 0,10$) relativement au kaempférol (TEAC $1,34 \pm 0,08$).

Les interactions entre les espèces réactives et les antioxydants dépendent de plusieurs paramètres biologiques, physiques et chimiques tel que la structure, la taille, la solubilité et le potentiel oxydo-réducteur (pouvoir réducteur) (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995).

Généralement, un bon inhibiteur est un agent ayant une activité antioxydante qui varie proportionnellement avec sa concentration (ANTOLOVICH *et al*, 2004), ce qui est le cas de tous les extraits testés ainsi que les étalons pris comme références.

Dans leur étude, TEDESCO *et al*. (2001) ont montré l'effet protecteur des anthocyanines du vin rouge sur les érythrocytes humains traités au H_2O_2 , ils ont conclu que les dérivés O-glycosyles étaient responsables de la réduction considérable du niveau des ERO. De ce fait, la présence d'un tel sucre sur une fraction aglycone augmenterait la solubilité de la molécule, permettant de piéger efficacement les RL aussi bien à la surface de la membrane qu'à l'intérieur du globule rouge (NADOUR *et al*, 2012a).

D'après EBRAHIMZADEH *et al*. (2008), la cinétique des flavonoïdes repose essentiellement sur la position de la double liaison dans le cycle C ainsi que la position des groupements hydroxyles. D'après BRAND-WILLIAMS *et al*. (1995), la force de réactivité dépend du nombre d'hydrogène pouvant être cédé sur les groupements hydroxyle de la molécule antioxydante. En effet, la structure de la rutine montre la disponibilité de 2 hydrogènes, ce qui suppose qu'une mole de rutine peut piéger deux moles de DPPH. Cela explique la cinétique rapide observée (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995). Les polyphénols englobent un ensemble de molécules de structures différentes qui peuvent avoir plus ou moins deux hydrogènes disponibles et dont les cinétiques de réactions ne seraient pas les mêmes (KAVIARASAN *et al*, 2004). Ceci pourrait expliquer à la fois l'allure (cinétique) moyenne observée et la forte activité de ces derniers par effet de synergie par rapport à la rutine (HILDAGO *et al*, 2010 ; TAI *et al*, 2010). En dehors de l'hydrolyse des hétérosides, plusieurs transformations, dont il faut tenir compte, peuvent se produire pendant le chauffage en milieu acide. La plus importante est la transformation tout au moins partielle des leucoanthocyanidines (flavanediols-3,4) en anthocyanidines ; ceci est valable également pour les formes condensées qui constituent les tanins. Par conséquent les anthocyanidines, présentes après hydrolyse acide, peuvent provenir, soit de l'hydrolyse des anthocyanines, soit de la transformation des leucoanthocyanidines. Il est fréquent de voir apparaître une coloration rouge, par chauffage en milieu acide d'un tissu ne contenant pas d'anthocyanes.

A côté de la formation d'anthocyanidines, le chauffage en milieu acide des leucoanthocyanidines conduit également à des produits polymérisés. Les catéchines (flavanols-3) donnent aussi une telle transformation, mais sans apparition d'anthocyanidines. Ces produits de polymérisation se trouvent sur les chromatogrammes, sous forme de traînées mal définies partant de la ligne de départ (RIBEREAU –GAYON, 1968). L'apparition des

produits d'hydrolyse et de toutes ces transformations conduit à des variations dans l'activité biologique du milieu réactionnel (en la potentialisant ou au contraire en la diminuant).

Selon certains travaux, la capacité réductrice est augmentée par les orientations ortho et para des groupements hydroxyles du phénol (CHIMI *et al*, 1991 ; CHEN *et al*, 1996 ; MCDONALD *et al*, 2001 ; CHEN *et al*, 2007). Le nombre de substituants hydroxyles dans le noyau aromatique et la nature des substituants en position para ou ortho, sont des caractéristiques structurales importantes déterminant l'activité (CHIMI *et al*, 1991). Ces composés réagissent avec les RL et génèrent un nouveau radical stabilisé par l'effet de résonance du noyau aromatique (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995). Des études semblables sur les flavonoïdes ont montré que le degré de l'activité antioxydante est corrélé avec le nombre de groupes hydroxyles. Le nombre de groupes OH et leurs positions sur le noyau aromatique sont des paramètres importants pour les flavonoïdes et les phénols en général (RICE-EVANS, 1996 ; CAO *et al*, 1997). Quant à l'activité anti-oxydante des CPMB, elle peut être expliquée en grande partie par la richesse de cet extrait en CP ayant une structure o-diphénolique.



Conclusion

Conclusion

Nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques (CP) issus des margines d'olives de la variété *Chamlal* avant et après traitements chimiques d'hydrolyse des liaisons glycosidiques qui lieraient les parties glycanes aux polyphénols afin de cerner le rôle que pourrait jouer le sucre dans l'activité biologique.

La quantification et l'extraction des polyphénols à partir des margines avant traitements chimiques, ont permis de mettre en relief la présence de composés à structures différentes dans l'échantillon de départ.

L'emploi, lors de l'extraction des CP, des solvants organiques à polarité croissante montre que la quantité et la qualité des polyphénols contenus dans ces solvants étaient différentes. Le taux de CP extraits par l'éther, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol est de $(3,64 \pm 0,58)$, $(5,22 \pm 0,69)$ et $(12,60 \pm 0,26)$ mg EAG/g de MST, respectivement.

Les méthodes d'hydrolyse chimique destinées à rompre les liaisons pouvant unir un sucre à un polyphénol ont été mises au point. Les méthodes d'hydrolyse acide utilisant HCl 2N et 6N sont destinées à la rupture des liaisons acétals (-C-O-C-) et la méthode de l'hydrolyse alcaline est employée pour tenter de couper les combinaisons esters (-CO-O-C-) éventuelles.

La quantification des CP extraits par les trois solvants organiques précédemment cités à partir des margines après traitements acides et/ ou basique, montre clairement la libération des polyphénols des combinaisons antérieures puisque elle s'élève à $(35,70 \pm 0,23)$, $(45,6 \pm 0,79)$ et $(39,50 \pm 0,50)$ mg EAG/g de MST des extraits étheré, d'acétate d'éthyle et butanolique respectivement suite à l'hydrolyse en milieu HCl 2N ; et à $(10,415 \pm 3,23)$, $(25,66 \pm 0,225)$ et $(65,875 \pm 6,45)$ mg EAG/g de MST respectivement des extraits étheré, d'acétate d'éthyle et butanolique après traitement utilisant HCl 6N.

Le dosage des flavonoïdes et des sucres totaux est réalisé permettant ainsi de confirmer que les formes phénoliques les plus polaires se trouvent dans les extraits butanoliques, ces formes ne sont autres que les formes glycosylées des polyphénols.

L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince des extraits phénoliques obtenus avant et après traitements chimiques des margines met en évidence la présence de nouvelles entités moléculaires pouvant correspondre aux produits d'hydrolyse.

L'évaluation du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium ainsi que le potentiel anti-radicalaire par le test au DPPH a montré que les CP issus des margines brutes étaient doués d'une activité anti-oxydante. L'extrait butanolique s'est montré le plus actif. Ces mêmes tests ont été réalisés sur les extraits phénoliques obtenus après traitements des margines, et ont montré que l'extrait obtenu après traitement des margines en milieu HCl 2N contenant les formes les moins polaires (aglycones) est celui qui possédait une activité minimale. Au contraire, lors du traitement acide des margines utilisant HCl 6N, les formes

aglycones libérées avaient des capacités de neutralisation meilleures que celles des autres extraits contenant des formes glycosylées.

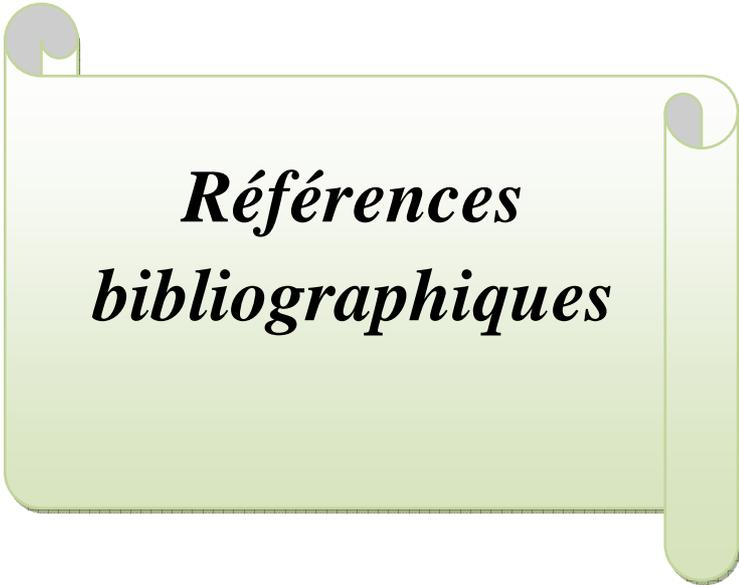
Nous retenons de notre étude que les méthodes mises au point pour la déglycosylation sont fiables à un certain degré et libèrent chacune des produits spécifiques selon le mécanisme d'action du réactif hydrolytique.

Certaines méthodes d'hydrolyse semblent libérer des aglycones qui présentent une meilleure activité par rapport à celle des formes glycosylées (cas de la méthode d'hydrolyse utilisant HCl 6N) ; d'autres (la méthode d'hydrolyse acide en milieu HCl 2N et la méthode d'hydrolyse alcaline suivie d'un traitement acide) au contraire, libèrent en plus des aglycones, des formes glycosylées ayant échappé à l'hydrolyse et présentant une meilleure activité. Il semblerait que les sucres dans certains cas contribueraient à la potentialisation de la capacité anti-oxydante lorsque leurs fonctions réductrices sont libres.

La caractérisation structurale, par spectroscopie et par résonance magnétique nucléaire des entités moléculaires issues des margines avant et après déglycosylation s'impose dans le but de valoriser les composés phénoliques des margines, considérées comme source importante d'antioxydants naturels et peut contribuer de cette manière à diminuer leur effet polluant sur l'environnement;

1. proposer des méthodes d'extraction et de préservation des extraits phénoliques ;
2. dans le cas d'un usage à des fins alimentaires, des études toxicologiques poussées devraient être entreprises dans la mesure où le label « produit naturel » n'est pas suffisant pour garantir la totale innocuité de ces composés car ces extraits sont obtenus par des solvants dont les résidus peuvent être toxiques.

Au vue de l'activité anti-oxydante importante de certaines formes des CP (aglycones et glycosylées), il serait intéressant d'envisager de les incorporer dans des produits aussi bien à visée alimentaire, pharmaceutique qu'en cosmétologie permettant ainsi d'augmenter leur conservation.



***Références
bibliographiques***

Liste des références bibliographiques

- **ABEROUMAND A. & DEOKULE S.S. (2008).** Comparison of phenolic compounds of some edible plants of iran and india. *Pakistan J. of Nutr.*, 7 (4): 582-585.
- **ACHAK A., OUAZZNI N., YAACOUBI A. et MANDI L., 2008.** Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essai de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. *Rev. des Scien. de l'Eau*, 21 : 53-57.
- **ACHAK M., OUAZZANI N. ET MANDI L. (2009).** Traitement des margines d'une huilerie moderne par infiltration-percolation sur un filtre à sable. *Rev. des scien. de l'eau*, 22 (3) : 421-433.
- **ADLERCREUTZ H. & MAZUR W. (1997).** Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.*, 29: 95-120.
- **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 sidi mohamed ben abdellah. Fes. 156p.
- **AISSAM H., ERRACHIDI F., MERZOUKI M., BENLEMLIH M. (2002).** Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase. *Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé*, 7 : 23-30.
- **AKAR T., TOSUN I., KAYNAK Z., OZKARA E., YENI O., SAHIN EN. and AKAR ST. (2009).** An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace. *J. Hazard. Mater.*, 166 :1217–1225.
- **AL-MALAH K., AZZAM M.O.J., ABU-LAIL N.I. (2000)** Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. *Sep. and Purif. Techno.*, 20 : 225-234.
- **ALMELA L.A., SANCHEZ-MUNOZ A., FERNÁNDEZ-LOPEZ B., MARIA J. and RABE V. (2006).** Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material *J. of Chromatog. A.*, 1120 : 221–229.
- **AMIOT, M.J., M. TACCHINI, S.Y. AUBERT (1995).** Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1132-1137.
- **ANDERSEN O.M. and MARKHAM K.R. (2006).** FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis. Washington.
- **ANNAKI A., CHAOUCH M., RAFIQ M. (1999).** Influence de la durée du stockage des olives sur l'évolution de la composition des margines. *L'eau. L'indust. Les nuis.*, 218 : 24-28.
- **ANONYME. (2014).** La production végétale dans les pays partenaires méditerranéens continue d'augmenter. *Eurostat.*, 3 : 138.

- **ANTOLOVICH M., DANNY R., BEDGOOD JR., ANDREA G., DANIEL J., PAUL D., PRENZLE R. and ROBARDS K.(2004).** LC-MS Investigation of Oxidation Products of Phenolic Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 962-971.
- **APAK R., GÜÇLÜ K., DEMIRATA B., ÖZYÜREK M., ÇELİK S.E., BEKTASOĞLUB., BERKER K.I. and ÖZYURT D. (2007).** Comparative evaluation of various totalantioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. *Mol.*, 12: 1496-1547.
- **ARDESTANI A. and YAZDANPARAST R. (2007).** Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts. *Food Chem.*, 104 : 21–29.
- **ARIENZO M. and CAPASSO R. (2000).** Analysis of metal cations and inorganic anions in olive oil mill waste waters by atomic absorption spectroscopy and ion chromatography. Detection of metals bound mainly to the organic polymeric fraction. *J Agric Food Chem.*, 48 (4): 1405-1410.
- **AZABOU S., NAJJAR W., GARGOUBI A., GHORBEL A. and SAYADI S. (2007).** Catalytic wet peroxide photo-oxidation of phenolic olive oil mill wastewater contaminants: Part II. Degradation and detoxification of low-molecular mass phenolic compounds in model and real effluent. *Applied Catalysis B: Environmental.*, 77: 166-174.
- **BAHORUN T, GRESSIER B., TROTIN F., BRUNET C., DINE T., LUYCKX M., VASSEUR J., CAZIN M., CAZIN J.C., and PINKAS M. (1996).** Oxygenspecies scavenging activity of phenolic extracts from hawtorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimlforsch/Drug Res.*, 46(11): 1086-1089.
- **BALASUNDRAM N., SUNDRAM K. and SAMMAN S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential use. *Food Chem.*, 99: 191–203.
- **BALICE V. and CERA O. (1984).** Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. *Grasas y Aceites.*, 25: 178-180.
- **BALICE V., BOARI G., CERA O. and ABBATICCHIO P. (1982).** Indagine analitica sulle acque di vegetazione. *Nota 1., Inquinamento.*, 7 : 49-53.
- **BALICE V., CARRIERI C. and CARRIERI G. (1997).** Trattamento chimico-fisico seguito dal biologico delle acque di vegetazione delle olive. *Ricerca.*, 2 : 50-53.
- **BAMBALOV G., ISRAILIDES C. and TANCHEV S. (1989).** Alcohol Fermentation in olive Oil Extraction Effluents. *Biol. Wastes.*, 27: 71-75.
- **BEECHER G.R. (2003).** Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet Overview of Dietary; Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake1. *Nutr. Rev.*, 3: 3248-3254.
- **BEN AHMED C., BEN ROUINA B. and BOUKHRIS M. (2007).** Effects of water deficit on olive trees cv. *Chemlali* under field conditions in arid region in Tunisia. *Sci. Hortic.*, 113: 267–277.
- **BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., LORENTE J., ORTUNO A. and DEL RIO J.A. (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea*

europaea L. leaves. *Food Chem.*, 68 : 457-462.

- **BENDINI A., CERRETANI L, CARRASCO-PANCORBO A., ANA MARIA GÓMEZ-CARAVACA A.M., SEGURA-CARRETERO A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ 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. *Mol.*, 12 : 1679-1719.
- **BENSEMMANE A. (2009).** Le trait d'union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural. 1er forum méditerranéen de l'oléiculture, 1111- 4762.
- **BENYAHIA N. and ZEIN K. (2003).** Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. 2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solution. Lausanne, Suisse.
- **BERSET C. et CUEVELIER M.-E. (1996).** Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant = Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Scien. des alim.*, 16 (3) : 219-245.
- **BERTIN L., MAJONE M., DI GIOIA D. and AVA F. (2001)** Anaerobic fixed-phase biofilm reactor system for the degradation of the low-molecular weight aromatic compounds occurring in the effluents of anaerobic digestors treating olive mill wastewaters. *J. Biotechnol.*, 87 (2): 161-77.
- **BONDIA-PONS I., AURA A.-M., VUORELA S., KOLEHMAINEN M., MYKKANEN H., and POUTANEN K. (2009).** Rye phenolics in nutrition and health. *J. of Cereal Science.*, 3: 1–14.
- **BORJA R., BANKS C.J. and ALBA J. (1995).** A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture. *Environ. Sci. Health A.*, 30: 607-626.
- **BORJA R., MARTIN M.A., DURAN BARRANTES M.M. (1992)** Kinetic study of biomethanization of olive mill wastewater previously subjected to aerobic treatment with *Geotrichum candidum*. *Grasas. Y. Aceites.*, 43: 82-86.
- **BOSKOU G., SALTA F.N., CHRYSOSTOMOU S., MYLONA A., CHIOU A. and ANDRIKOPOULOS N.K. (2006).** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chem.*, 94: 558–564.
- **BOUAZIZ M. & SAYADI S. (2005).** Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107: 497–504.
- **BOUAZIZ M., R. J. GRAYER, M. S. J. SIMMONDS, M. DAMAK, S. SAYADI (2005).** Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar *Chemlali* growing in Tunisia. *J Agric Food Chem.*, 53, 236–241.
- **BOUZID W., M. YAHIA1, M. ABDEDDAIM, M.C. ABERKANE et A. AYACHI (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *l'aubepine monogyne*. *Leban. Scien. J.*, 12: 1-8.

- **BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E. and BERSET C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28: 25–30.
- **BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie Plantes Médicinales. Techniques et Documentation, 3ème Ed, Lavoisier, Paris. 1120 p.
- **BRUNETON, J. (1993).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier, Paris.
- **BULDINI P.L., MEVOLI A. and QUIRINI A. (2000)** On-line microdialysis-ion chromatographic determination of inorganic anions in olive-oil mill wastewater. *J. Chromatogr A.*, 882 (1-2): 321-328.
- **BUTINAR B. (2006).** Antioxidants in virgin olive oils produced from two olive cultivars of slovene istria. *Annales, Ser. Hist. Nat.*, 16(2): 201–208.
- **CAO G., SOFIC E. and PRIOR RL. (1997).** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, 22: 749–760.
- **CAPASSO R. (1997).** The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Top. Phytochem., Res. Trends.*, 1: 145-156.
- **CAPASSO R., DE MARTINO A. and ARIENZO M. (2002a)** Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (10) : 2846-2855.
- **CAPASSO R., DE MARTINO A. and CRISTINZIO G. (2002b).** Production, characterization, and effects on tomato of humic acid-like polymerin metal derivatives from olive oil mill waste waters. *J Agric Food Chem.*, 50 (14), 4018-24.
- **CARNAT A., CARNAT A.P. and FRAISSE D. (1999).**The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia.* 70: 44-49.
- **CARUSO, D. (2000).** Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS. Lett.*, 468 : 159–160.
- **CASA R., D'ANNIBALE A., PIERUCCHETTI F., STAZI S.R., GIOVANNOZZI SERMANNI G., LO CASCIO B. (2003)** Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosph.*, 50 (8) : 959-66.
- **CASSIDY, A., HANLEY B. and LAMUELA-RAVENTOS R.M. (2000).** "Isoflavones, lignans and stilbenes: origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.*, 348 : 1230-1238.
- **CHA Y.Y., KIM S.K., AHN C.B. and JE J.Y. (2011).** Preparation, characterization and antioxydan properties of gallic acid-grafted chitosans. *Carbohydrate polymers.*, 83: 1617-1622.
- **CHANG S.K., LI C., HIANG S. and CHANG M.C. (1995)** Intraspecific protoplast fusion of *Candida tropicalis* for enhancing phenol degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43 : 534-538.

- **CHEN H-Y., LIN Y-C. and HSIEH C-L. (2007).** Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chem.*, 104: 1418–1424.
- **CHEN Z.Y., CHAN P.T., HO K.Y., FUNG K.P. and WANG J. (1996).** Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem. Phys. Lipids*, 79: 157-163.
- **CHEW Y-L., GOH J-K. and LIM Y-Y. (2009).** Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem.*, 116 : 13–18.
- **CHIMI H., CILLARD J., CILLARD P. and RAHMANI M. (1991). Cité par BOUAZIZ M., CHAMKHA M. and SAYADI S. (2004).** Comparative Study on Phenolic Content and Antioxidant Activity during Maturation of the Olive Cultivar Chemlali from Tunisia. *J. Agric. Food Chem*, 52: 5476-5481.
- **CHIOFALO B., LIOTTA L. ZUMBO A., and CHIOFALO V. (2004).** Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition. *Small Rum. Res.*, 55: 169–176.
- **CICHELLI A. et SOLINAS M. (1984)** I composti fenolici delle olive e dell'olio di oliva. *Riv.Merceol.*, 23 : 55-69.
- **CLIFFORD M.N. (2000).** Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 8: 1063-1072.
- **COWAN, M.M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Res.*, 12 (4) : 564- 582.
- **COWARD, L., M. SMITH, M. KIRK .(1998).** Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1486S-1491.
- **CRETU E, KARONEN M., SALMINEN J.P., MIRCEA C., TRIFAN A., CHARALAMBO C., CONSTANTINOU A.I. and ANCA MIRON A. (2013).** In Vitro Study on the Antioxidant Activity of a Polyphenol-Rich Extract from Pinus brutia Bark and Its Fractions. *J. of med. Food.*, 16 (11) : 1–8.
- **CRIADO M.N., MORELLO J.R., MOTILVA M.J. and ROMERO M.P. (2004).** Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the arbequina variety in Spain. *JAACS.*, 81 : 633–640.
- **CROZIER A., CLIFFORD M.N. and ASHIHARA H. (2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.
- **CROZIER, A., I.B. JAGANATH AND M.N. CLIFFORD (2009).** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.*, 26: 1001-1043.
- **CZERWINSKA M., KISS A.K., and NARUSZEWICZ M. (2012).** A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chem.*, 131: 940–947.

- **DAMAK N., BOUAZIZ M., AYADI M., SAYADI S. and DAMAK M. (2008).** Effect of the Maturation Process on the Phenolic Fractions, Fatty Acids, and Antioxidant Activity of the Chétoui Olive Fruit Cultivar *J. Agric. Food Chem.*, 56 : 1560–1566.
- **D'ANNIBALE A., CASA R., PIERUCCETTI F., RICCI M. and MARABOTTINI R. (2004).** *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosph.*, 54: 887-894.
- **D'ANNIBALE A., STAZI S.R., VINCIGUERRA V., GIOVANNOZZI and SERMANNI G. (2000)** Oxiraneimmobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.*, 77 (2-3): 265-73.
- **D'ARCHIVIO M., FILESI C. and DI BENEDETTO R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, 43: 348-361.
- **DE MARCO E., MARIA S., ANTONELLO P. and RAFFAELE S. (2007).** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem.*, 104: 858–867.
- **DE MARCO ELENA., MARIA SAVARESE., ANTONELLO PADUANO., DE MARTINO A., IORIO M., PRENZLER P.D., RYAN D., OBIED H.K. and ARIENZO M. (2013).** Adsorption of phenols from olive oil waste waters on layered double hydroxide, hydroxyaluminium–iron-co-precipitate and hydroxyaluminium–iron–montmorillonite complex. *App. Clay Scien.*, 80-81: 154-161.
- **DELLA GRECA M., PREVITERA L., TEMESSI F., and CARRELLI A. (2004).** Lowmolecular- weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochem. Analys.*, 15 : 184–188.
- **DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F. and MICHAUD P. (2012).** Olive mill wastes : Biochemical characterizations and valorisation strategies. *Process Biochemistry.*, 48 :1532-1552.
- **DI SERIO M. G., LANZA B., MUCCIARELLA M. R., RUSSI F., IANNUCCI E., MARFISI P. and MADEO A. (2008).** Effects of olive mill wastewater spreading on the physico-chemical and microbiological characteristics of soil. *Inter. Biodeter. & Biodegr.*, 62: 403-407.
- **DIABATE S , KONAN K.E., ALLOU D, Ouolo A. COULIBALY O.A.3 and DE FRANQUEVILLE H. (2009).** Performance de deux techniques d'extraction des phénols racinaires pour l'évaluation du marquage de la tolérance à la fusariose des clones de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Sci. Nat.*, 6 (2) : 117-123.
- **DI-GIOVACCHINO L. (1996).** L'influence des systèmes d'extraction, sur la qualité de l'huile d'olive, *Olivea.*, 63, 52-63.
- **DI-GIOVACCHINO L., MASCOLO A. and SEGHITTI L. (1988)** Sulle caratteristiche delle acque di vegetazione delle olive. *La Rivista delle Sotanze Grasse.* 65.
- **DORMAN HJ and HILTUNEN R. (2010).** *Ocimum basilicum* L.: phenolic

profile and antioxidant-related activity. *Nat. Prod. Commun.*, 5(1): 65-72.

- **DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J., REBERS P. and SMITH F. (1956)** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- **EBRAHIMZADEH M. A., NABAVI S. F., NABAVI S. M., MAHMOUDI M., ESLAMI B. and DEHPOUR A. A. (2010)**. Biological and pharmacological effects of *Delphinium elbursense*. *Afr. J. of Biotechnol.*, 9 (34) : 5542-5549.
- **EBRAHIMZADEH M.A., POURMORAD F. and HAFEZI S. (2008)**. Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. *Turk. J. Biol.*, 32, 1-7.
- **EDENHARDER, R. and GRÜNHAGE, D. (2003)**. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.*, 540: 1–18.
- **EL HAJJI H., NKHILI E., TOMAO V. and DANGLES O. (2006)**. Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Res.*, 40(3): 303–320.
- **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. Université de Marrakech. 148p.
- **EL HAJJOUJI H., AIT BADDI G., YAACOUBI A., HAMDI H., WINTERTON P., REVEL J.C. and HAFIDI M. (2008)**. Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology.*, 99 : 5505-5510.
- **EL HAJJOUJI H., FAKHARELINE N., BADDI G.A., WINTERTON P., BAILLY J.R., REVEL J.C. ET HAFIDI M. (2007)**. Treatment of olive mill waste water by aerobic biodegradation: an analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet–visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource Technology.* 98: 3513-3520.
- **EL-ABBASSI A., KHAYET M. and HAFIDI A. (2011)**. Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater. *Watr. Res.*, 45: 4522–4530.
- **ERGÜL F.E., SARGIN S., ONGEN G. ET SUKAN F.V., 2009**. Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *Inter. Biodeter. & Biodegr.*, 63: 1-6.
- **EROGLU E., EROGLU I., GÜNDÜZ U. and YÜCEL M. (2008)**. Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. *Bioresource Technology.*, 99: 6799-6808.
- **FADIL K., CHAHLAOUI A., OUAHBI A., ZAID A. and BORJA R. (2003)**. Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *Inter. Biodeter. & biodegr.*, 51, 37-41.
- **FENICE M., GIOVANNOZZI SERMANI G., FEDERICI F. and D'ANNIBALE A. (2003)**. Submerged and solid-state production of laccase and

Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *J. Biotechnol.*, 100 (1), 77-85.

- **FEZZNI B. and BEN CHEIKHARTICLE R. (2009).** Extention of the biodegradation odel N0.1 (ADM1) to include phenolic compounds biodegradation process for the simulation of anaerobic co-digestion of olive mill wastes at thermophilic temperature. *J. of Hazard. Mater.*, 162 :1563-1570.
- **FIESTAS ROS DE URSINOS, J.A. and BORJA R. (1992).** Use and treatment of olive mill wastewater : Current situation and prospects in Spain. *Grasas. Y. Aceites.*, 2 : 101-106.
- **FIOL M., ADERMANN S., NEUGART S., ROHN S., MUGGE C., SCHREINER M., KRUMBEIN A. and KROH L. (2012).** Highly glycosylated and acylated flavonols isolated from kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) — Structure–antioxidant activity relationship. *Food Res. Inter.*, 47(1) : 80-89.
- **FIorentino A., Gentili A., ISIDORI M., MONACO P., NARDELLI A., PARRELLA A. and TEMUSSI F. (2003).** Environmental effects caused by olive mill Waste waters : toxicity comparison of low-molecular-weight phenol Components. *J. of Agri. and Food Chem.*, 51 : 1005–1009.
- **FKI I., ALLOUCHE N. ET 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 Chem.*, 93: 197-204.
- **GALANAKIS C. M., TORNBERG E. and GEKAS V. (2010).** A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT - Food Sci. and Techn.*, 43 : 1009-1017.
- **GARCIA GARCIA I, JIMENEZ PENA PR, BONILLA VENCESLADA JL, MARTIN MARTIN A, MARTIN SANTOSMA, RAMOS GOMEZ E.(2000)** Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process. Biochem.*, 35 (8) : 751-758.
- **GARCIA-CASTELLO E., CASSANO A., CRISCUOLI A., CONIDI C. and DRIOLI E. (2010).** Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *Watr. Research.*, 44 : 3883-3892.
- **GARRIDO HOYOS S.E., MARTINEZNIETO L., CAMACHORUBIO F. and RAMOSCORMENZANA A. (2002).** Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*. *Pro.Biochem.*, 37 : 1169-1176.
- **GERHAUSER C. (2008).** Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med.*, 74: 1608-1624.
- **GHEDIRA K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérap.*, 4 : 162-169.
- **GODOY H.T. and SCHERER R. (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazylmethod. *Food Chem.*, 112 : 654-658.
- **GOMEZ-RICO A., FREGAPANE G. and SALVADOR M.D. (2008).** Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their

corresponding virgin olive oils. *Food Res. Int.*, 41 : 433–440.

- **GRAHAM, H.N. (1992).** Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 21: 334-350.
- **GRESELE P., CERLETTI C., GUGLIELMINI G., PIGNATELLI P., DE GAETANO G. and VIOLI F. (2011).** Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. of Nutr. Biochem.*, 22 : 201–211.
- **GUIGNARD J.L. (1996).** Abrégé de biochimie végétale, Ed. *Masson*, Paris, 160 p.
- **GULÇIN I (2006).** Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.*, 217 : 213–220.
- **GUYOT, S., N. MARNET, D. LARABA (1998).** Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (malus domestica Var. Kermerrien). *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1698-1705.
- **HABAUZIT V. and HORCAJADA M.N. (2008).** Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochem Rev.*, 7 : 313–344.
- **HACHICHA R., HACHICHA S., TRABELSI I., STEVE WOODWARD B. and MECHICHI T. (2009).** Evolution of the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: Maturity assessment of the end product. *Chemosph.*, 75 : 1382–1386.
- **HALLIWELL B. (1994).** Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr. Rev.*, 52 : 253-265.
- **HAMDI M. (1992).** Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 37 : 155.
- **HAMDI M. and ELLOUZ P. (1993)** Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluized bed processes. *Environ. Technol.*, 14 : 183-188.
- **HAMZA M., KHOUFI S. and SAYADI S. (2012).** Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater. *Food Chem.*, 131: 1430–1436.
- **HARBORNE J. B. (1989).** General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). *Methods in plant biochemistry: London: Academic Press.* Volume Plant Phenolics (1–28).
- **HARBORNE J.B. (1990).** Constraints on the evolution of biochemical Pathways. *Biol. J. of the Linnean Societ.*, 39: 135-151.
- **HAVSTEEN B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.*, 96: 67– 202.
- **HE Z. and XIA W. (2007).** Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC–DAD–ESI–MS. *Food Chem.*, 105 : 1307–1311.
- **HENNEBELLE T., SAHPAZ S. et BAILLEUL F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérap. Springer-Verlag*, 1 : 3-6.

- **HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., SKALTSOUNIS, A.L. and BAILLEUL, F. (2007).** Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 35: 624-626.
- **HUANG A-C., WILDE A., EBMEYER J., SKOUROUMOUNIS G., and TAYLOR D-K. (2013).** Examination of the Phenolic Profile and Antioxidant Activity of the Leaves of the Australian Native Plant *Smilax glycyphylla*. *J. Nat. Prod.*, 76(10) :1930-6.
- **IMPELLIZZERI D., ESPOSITO E., MAZZON E., PATERNITI I., PAOLA R., BRAMANTI P., MORITTU V.M., PROCOPIO A., BRITTI D. and CUZZOCREA S. (2011).** The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *Clinical. Nutr.*, 30: 533-540.
- **IMPELLIZZERI D., ESPOSITO E., MAZZON E., PATERNITI I., ROSANNA DI PAOLA R., PLACIDO BRAMANTI P., MORITTU V.M., PROCOPIO A., PERRI E., BRITTI D., and CUZZOCREA S. (2012).** The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochem. Pharmacol.*, 83 : 1413–1426.
- **JAIL A., BOUKHOUBZA F., NEJMEDDINE A., SAYADI S., HASSANI L. 2010.** Co-treatment of olive-mill and urban wastewaters by experimental stabilization ponds. *J. of Hazardous Mater.*, 176 : 893–900.
- **JU H-Y, CHEN S.C., WUA K-J, KUO H-C, HSEU Y-C, CHING H. and WUA C-R. (2012).** Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Food & Chemical Toxicol.*, 50 : 492–502.
- **KARAPINAR M. and WORGAN M.J.T. (1983).** Bioprotein production from the waste products of olive oil extraction. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 33, 185-188.
- **KAVIARASAN S., VIJAYALAKSHMI K. and ANURADHA C.V. (2004).** Polyphenolrich extract of fenugreek seeds protect erythrocytes from oxidative damage. *Plant Food Hum. Nutr.*, 59 : 143–147.
- **KISSI M., MOUNTADAR M., ASSOBEI O., GARGIULO E., PALMIERI G., GIARDINA P., SANNIA G. (2001)** Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 57 (1-2) : 221-226.
- **KLIBANOV A.M., TU T.M., SCOTT K.P. (1983)** Peroxidase catalysed removal of phenols from coal-conversion wastewater's. *Scien.*, 22, 259-261.
- **Knaggs, A.R. (2003).** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Product. Reports*, 20 : 119–36.
- **KRAUSE, M. and R. GALENSA (1992).** "Bestimmung von Naringenin und Naringenin-Chalkon in Tomatenschalen mit RP-HPLC nach Festphasenextraktion." *Lebensm Unters Forsch* **194**: 29-32.
- **KSOURI, R., MEGDICHE, W., DEBEZ, A., FALLEH, H., GRIGNON, C., ABDELLY. C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant

activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, 45: 244-249.

- **KÜHNAU, J. (1976)**. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.*, 24: 117-191.
- **LAFAY S. and GIL-IZQUIERDO A. (2008)**. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev.*, 7 : 301–311.
- **LAKHTAR H. (2009)**. Thèse Doctorat de l'Université Paul Cézanne. Aix Marseille III, France. Lavoisier, 1120p.
- **LAKHTAR H., ZAOUIA N., SALIH G., TANTAOUI-ELARAKI A., LAMRANI K., CHEHEB M., HASSOUNI H., ISMAILI-ALAOUI M., VERHE F., GAIME-PERRAUD I., AUGUR C. et ROUSSOS S. (2006)**. Diversité des champignons filamenteux isolés dans les maâsra au Maroc. International Congress on Bioprocesses in Food Industries (ICBF-2006).
- **LAMUELA-RAVENTOS, R.M., ROMERO-PEREZ A.I, and WATERHOUSE A.L. (1995)**. Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in spanish red vitis vinifera wines. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 281-283.
- **LEGER C.L., KADIRI-HASSANI N. and DESCOMPS B. (2000)** Decreased superoxide anion production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (10) : 5061-5067.
- **LEONG LP. And SHUI G. (2002)**. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.*, 76: 69-75.
- **LI K., DIAO Y., ZHANG H., WANG S., ZHANG Z., YU B., HUANG S. and YANG H. (2011)**. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. *BMC Complement Altern. Med.*, 11(86) : 1472-1482.
- **LI H.B., CHENG K.W., WONG C.C., FAN K.W., CHEN F. and TIAN Y. (2007)**. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chem.*, 102: 771-776.
- **LIU F, LIAOS, ZOU Y and XIAO G (2014)**. Antioxidant activity of *Phellinus igniarius* extracts. *The FASEB Journal*. 28(1) : 830-32.
- **LOŽIENE K., VENSKUTONIS P., AUSRA S., and JUOZAS L A.R. (2007)**. scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem.*, 103 : 546–559.
- **LU Y. and L.Y. FOO (1997)**. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chem.*, 59: 187-194.
- **LUGASI A., HÓVÁRI J., SÁGI K.V. and BÍRÓ L. (2003)**. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis.*, 47: 119-125.
- **MACHEIX J.J., FLEURIET A. and P. SARNI-MANCHADO (2006)**. Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris.

- **MACHEIX J-J., FLEURIET A. et JAY –ALLMEND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux .collection biologie. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.
- **MALHEIRO R., SOUSA A., CASAL S., BENTO A. and PEREIRA J.A. (2011).**Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chem. Toxicology.*, 49 : 450–457.
- **MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C. and JIMENEZ L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79 : 727–47.
- **MANSOURI N., SATRANI B., GHANMI M., EL GHADRAOUI L., GUEDIRA A. et AAFI A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *juniperus communis* du maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 80 : 791 – 805.
- **MARKHAM KR. (1982).** Technics of flavonoids identification. *Academic Press* (London); Chap.1 et 2: 1-113.
- **MARTIN A., BORJA R., GARCIA I., and FIESTAS J.A. (1991)** Kinetics of methane production from olive mill wastewater. *Process. Biochem.*, 26 : 101-107.
- **MARTINEZ N.L., RAMOS-CORMENZANA A., GARCIA PAREJA M.P., GARRIDO HOYOS S.E. (1992).** Biodegradacion de compuestos fenolic del alpechin con *Aspergillus terrus*, *Grasas. Y. Aceites.*, 43 (2) : 75-81.
- **MARTIN-GARCIA A.I., MOUMEN A., YANEZ RUIZ D.R. and MOLINA ALCAIDE E. (2003).** Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Sci. & Technol.* 107: 61-74.
- **MARTIN-GARCIA A.I., MOUMEN A., YANEZ-RUIZ D.R. and MOLINA-ALCAIDE E. (2003).** Chmical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olivecake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107 : 61–74.
- **MAYER A.M. and HAREL E. (1979).** "Polyphenol oxidases in plants." *Phytochemistry* 18: 193-215.
- **MAZZA G. and MINIATI E. (1993).** "Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains." Boca Raton. CRC press. 362 p
- **MCDONALD S., PRENZLER P.D., ANTOLOVICH M. and ROBARDS K. (2001).** Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chem.*, 73 : 73-84.
- **MEIR S., KANNER J., AKIRI B. and HADAS S.P. (1995).** Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defence systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 43 : 1813–1815.
- **MIDDELHOVEN W.J. (1993)** Catabolism of benzene compounds by Ascomycetous and Basidiomycetous yeasts and yeast like fungi. A. Literature Review and experiment approach. *Antome van Leewenhoek. Inter. J. of gen. and molecular microbiol.*, 63 : 125-144.

- **MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C. and THEOHARIDES, T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.*, 52: 673-839.
- **MOLYNEUX P. (2004).** The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2) : 211-219.
- **MOMPON, B., LEMAIRE, B., MENGAL, P., SURBLED, M. (1998).** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87).
- **MORELLO J-R., ROMERO M-P. and MOTILVA M-J. (2004).** Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from arbequina, farga, and morrut cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 6002-6009.
- **MORRISON N., T. A., PRESSEY, R. and KAYS, S. J. (1993).** Changes in α - and β -amylase during storage of sweet potato lines with varying starch hydrolysis. *J. of the American Societ. of Horticult. Scien.*, 118 : 236-242.
- **NACZK M. and SHAHIDI F. (2004a).** Extraction and analysis of phenolics in food. *J. of Chromatograp. A.*, 1054: 95–111.
- **NACZK M. and SHAHIDI F. (2004b).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of naturally occurring in vegetable wastes. Curr. Top. Phytochem., Res. Trends*, 1: 145-156.
- **NADOUR M., MICHAUD P. and MOULTI-MATI F. (2012).** Antioxidant activities of polyphenols extracted from olive (*olea europaea*) of chamlal variety. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167:1802–1810.
- **NADOUR M., MOULTI-MATI F., MICHAUD P. and LAROCHE C. (2012b).** Composition, structure, and valorisation of fibres from olive fruit and by-products. *Agro. Food Industry.*, 23(6) : 1340-1343.
- **NEFZAOUI A. (1991).** Valorisation des sous-produits de l'olivier. *Optiom Méditerranéennes - Série Séminaires*. 16 : 101-108.
- **NEFZAOUI A. (1987)** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'olivier. Tunis.
- **NIAOUNAKIS M. and HALVDAKIS C. P. (2004).** Olive mill waste management- Literature Review and patent Survey. Typothito-George Dardanos, Athens, Greece.
- **NIJVELDT R. J., NOOD E., HOORN D. E., BOELEN P.G., NORREN K. and LEEUWEN, P. (2001).** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am.J. Clin Nutr.*, 74: 418–425.
- **NODA C., HE J., TAKANO T., TANAKA C., KONDO T., TOHYAMA K., YAMAMURA H., and TOHYAMA Y.(2007).** Induction of apoptosis by epigallocatechin-3-gallate in human lymphoblastoid B cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 362(4) : 951-957.
- **OBIED H., ALLEN M., BEDGOOD D., PRENZLER P., ROBARDS K. and STOCKMANN R. (2005).** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. of agrical. Food Chem.*, 53: 823-837.

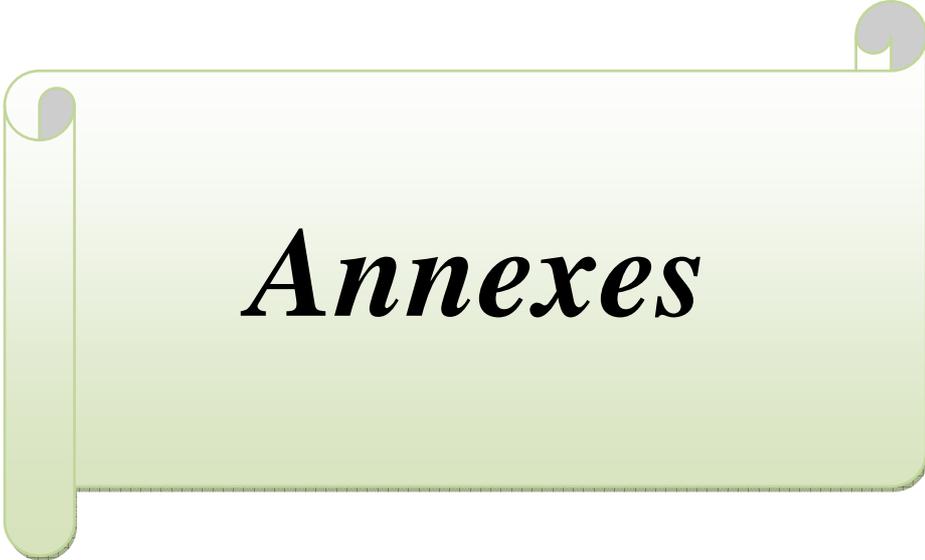
- **OBIED H.K., BEDGOOD JR. D.R., PRENZLER P.D. and ROBARDS K. (2007).** Bioscreening of australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chem. Tox.*, 45: 1238-1248.
- **OMAR, S.H. (2010).** Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scien. & Pharmaco.*, 78 (2) : 133–154.
- **OUKILI O., CHAOUCH M., RAFIQ M., HADJI M., HAMDY M. and BENLEMLIH M. (2001).** Bleaching of olive mill wastewater by clay in the presence of hydrogen peroxyde. *Ann. Chim. Sci. Mat.*, 26: 45-53.
- **OYAIZU, M. (1986).** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307–315.
- **PAREDES C., CEGARRA J., ROIG A., SANCHEZ-MONEDERO, M. A., and BERNAL, M. P. (1999).** Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Biores. Technology.*, 67 : 111–115.
- **PAREDES M.J., MONTEOLIVA-SANCHEZ M., PEREZ J., RAMOS-CORMENZANA A., MARTINEZ J. (1986).** Effect of waste waters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. *Chemosph.*, 16: 1557-1564. Patras, Grèce.
- **PIETTA P.-G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 : 1035–1042.
- **POPOVICI C., SAYKOVA I. et TYLKOWSKI B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel.* , 4 : 25-39.
- **POZO C., MARTINEZ-TOLEDO M.V., RODELAS B., GONZALEZ-LOPEZ J. (2002)** Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *J. of Biotechnology*, 97: 125-131.
- **PRAKASH D., UPADHYAY G., BRAHMA N. and SINGH H.B.(2007).** Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food chemistry*, 104 : 783-790.
- **PRICE, S.F., P.J. BREEN and VALLADAO M. (1995).** Cluster sun exposure and quercetin in pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 187-194.
- **PULIDO R., BRAVO L., and SAURA-CALIXTO F. (2000).** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.*, 48 (8) : 3396-402.
- **QU L., XIN H., SU Y., ZHENG G. and LING C. (2012).** Combined application of macroporous resin and high speed counter-current chromatography for preparative separation of three flavonoid triglycosides from the leaves of *Actinidia valvata* Dunn. *J. Sep Sci.*, 35 (7) : 883-92.
- **RADOMIR V. MALBAŠA, EVA S. LONČAR and KOLAROV L. (2004).** TLC analysis of some phenolic compounds in kombucha beverage. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 35, 1-280.

- **RAMOS-CORMENZANA A., JIREZ-JIMENEZ B. and GARCIA-PAREJA M.P. (1996).** Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (*alpechin*) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Inter. Biodeter. & Biodegr.*, 38: 283-290.
- **RAMOS-CORMENZANA A., MONTEOLIVA-SANCHEZ M. and LOPEZ M. J. (1995).** Bioremediation of Alpechin. *Inten. Biodeter. & Biodegr.*, 14 : 249-268.
- **RANALLI A. (1991a).** The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae.*, 37 : 30-39.
- **RANALLI A. (1991b).** The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae.*, 38 : 19-34.
- **RIBEREAU-GAYON P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, pp 254.
- **RICE-EVANS (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 20 : 933-956.
- **RIOV J. and GOTTLIEB H.E. (2006).** Metabolism of auxin in pine tissues: Indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia. Plantarum.*, 50 : 347-352.
- **ROBARDS K. (2003).** Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. of Chromatography A*, 1000: 657–691.
- **ROBARDS K.A., PAUL D., PRENZLER A., GREG TUCKER B., PRASAN SWATSITANG B. and WILLIAM G. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66: 401-436.
- **ROBLES C., GREFF S., PASQUALANI V., GARZINO S., BOUSQUET-MELOU A., FERNANDEZ C., KORBOULEWSKY N. and BONIN G. (2003).** Phenols and Flavonoids in Aleppo Pine Needles as Bioindicators of Air Pollution. *J. Environ. Qual.* 32:2265–2271.
- **RODRIGO R., MIRANDA A. and VERGARA L. (2011).** Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*. 412: 410–424.
- **ROMERO-PEREZ, A.I., R.M. LAMUELA-RAVENTOS, A.L. WATERHOUSE (1996).** Levels of cis and trans-resveratrol and their glucosides in white and rose vitis vinifera wines from Spain. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 2124-2128.
- **RYAN D. and ROBARDS K. (1998).** Phenolic compounds in olives. *Analyst.*, 123, 31R–44R.
- **RYAN D., ROBARDS K. and LAVEE S. (1999).** Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. (A)*, 832 : 87–96.
- **SALVEMINI F. (1985)** Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercemente le acque di vegetazione delle olive. *Riv. Delle Sostanze Grasse*, 112 : 559-564.
- **SANCHEZ-MORENO C., LARRAURI JOSE A . and SAURA-CALIXTO F. A. (1998).** Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. of the Sci. of Food and Agriculture.*, 76(2) : 270-276.

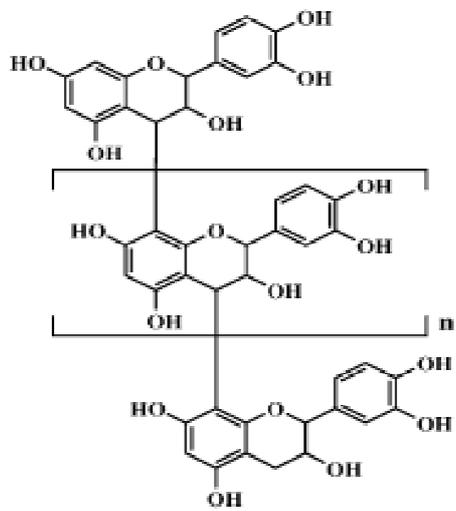
- **SANTOS-BUELGA, C. and A. SCALBERT (2000).** "Proanthocyanidins and tannin-like compounds : nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health." *J Sci Food Agric.*, 80: 1094-1117.
- **SARNI-MANCHADO P. et CHEYNIER V. (2006).** Les Polyphénols en Agroalimentaire. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. 398p.
- **SCALBERT, A., MANACH C. and MORAND C. (2005).** "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." *Crit Rev Food Sci Nutr.* 45: 287-306.
- **SENANI N. et MOULTI-MATI F. (2012).** Etude du pouvoir antifongique des extraits phénoliques issus des margines de la variété *Chamlal (Olea europea)* sur deux souches *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. *Tunis.J.Med. Plants Nat. Prod.*, 8 (1) : 44-48.
- **SERAPHIM P., MARIA G.P., STYLIANOS F., MICHAEL K. and GEORGE A. (2008).** Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology.*, 99 : 2419–2428.
- **SINGLETON V.L. and AROSSI J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technol. & Viticultur.*, 16 : 144-153.
- **SOKOL-LETOWSKA, A., OSZMIANSKI, J. and WOJDYLO, A. (2007).** Antioxydant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chem.*, 103: 853-859.
- **STEEGMANS R. and FRAGEMAN H. (1992).** Optimierung der anaeroben Verfahrenstechnik zur Reinigung von Organisch Hochverschmutzt Abwässern aus der Olivenolgewinnung Ostwaltz-Schuzule-Stiftung. Forschungsbericht AZ 101/81.
- **TANCHEV S., JONCHEVA N., GENOV N. and CODOUNIS M. (1980).** Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna*, 4: 5-13.
- **TAO L. and LAMBERT J.D. (2014).** Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer. *Polyphenols in Human Health & Disease.*, 2 : 1191-1198.
- **TASIOULA-MARGARI M. and OKOGERI O. (2001).** Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chem.*, 74 : 377–383.
- **THOMPSON, L.U., P. ROBB, M. SERRAINO (1991).** "Mammalian lignan production from various foods." *Nutr. Cancer.*, 16: 43-52.
- **TOMAS-BARBERAN, F.A. and CLIFFORD M.N. (2000).** "Dietary hydroxybenzoic acid derivatives: nature, occurrence and dietary burden." *J Sci Food Agric.*, 80: 1024-1032.
- **TREASE G.E. and EVANS W.C (1987).** A text book of Pharmacognosy. Tindal, Oxford: ELBS/Bailliere.
- **TSAGARIKI E., HARRIS N., LAZARIDES. and KONSTANTINOS B. P. (2007).** Olive mill waste water treatment. *Springerlink*, 133-157.

- **TSIOULPAS A., DIMOU D., ICONOMOU D. and AGGELIS G.(2002).** Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, 84: 251-257.
- **VAZEQUEZ R.A. (1978).** Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile. *Revue française des corps gras*, 25(1) : 21-26.
- **VAZEQUEZ R.A., MAESTRO D.R. and GRACIANI C.E. (1974)** Compentes fenolicos de la aceituna.II. Poliphenoles del alpechin. *Grasas y Aceites*, 25, 341-345.
- **VINHA A.F., FERRERES F., SILVA B.M., VALENTAO P., GONCALVES A., PEREIRA J.A., OLIVEIRA M.B., SEABRA R.M. and ANDRADE P.B. (2005).** Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.*, 89:561–568.
- **VISIOLI F. and GALLI C. (1998).** The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev.*, 56 : 142–147.
- **VISIOLI F., ROMANI A., MOLINACCI N., ZARINE S., CONTE D., VINCIERI F. and GALLI C. (1999).** "Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters.,*J. Agric. Food Chem.*, 47 : 3397-3401.
- **WAGNER H., BLADF S. and ZGAINSKI E.M. (1984)** plant drug analysis. Translated by Scott Th.A.*Springer-Verlag*.
- **YAAKOUBI A, CHAHLAOUI A, ELYACHIOUI M. et CHAOUCH A(2010).** Traitement des margines à ph neutre et en conditions d'aérobie par la microflore du sol avant épandage. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 149 : 43-56.
- **YAAKOUBI A., CHAHLAOUI A., RAHMANI M., ELYACHIOUI M. et OULHOTE Y. 2009.** Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agrosolutions*, 20 : 1.
- **YALCUK A., BALDAN PAKDIL N. and YAPRAK TURAN S. (2010).** Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands . *Desalination*, 262: 209–214.
- **YAO J., WANG J.Y. and LIU L. (2010).** "Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis." *Arch Med Res* 41: 288-294.
- **YAO L.H., JIANG Y.M., SHI J., TOMAS-BARBERAN F.A., DATTA N., SINGANUSONG R. and CHEN S.S. (2004).** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.*, 59: 113-122.
- **YOUSFI H., TAHRI EL H., EL AMRANI A., et SERGHINI-CAID H. YOUSFI K., CERT R.M., JOSE M. and GARCIA J.M. (2006).** Changes in quality and phenolic compounds of virgin olive oils during objectively described fruit maturation. *Eur.Food Res. Technol.*, 223, 117–124.
- **ZAHARI A., TAZI A. and AZZI M. (2014).** Optimisation des conditions de traitement des margines par un superoxydant K3FexMnyO8 [Optimization of treatment conditions of Olive Oil Mill Wastewater by superoxidant K3FexMnyO8]. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5 (2): 484-489.

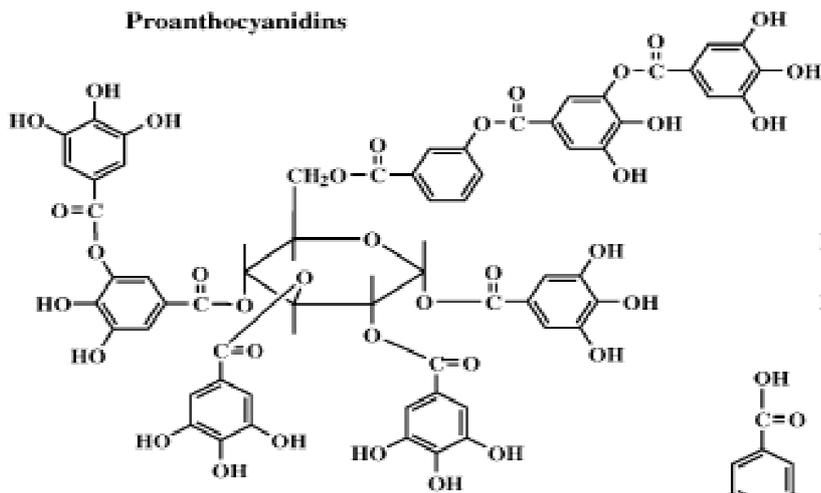
- **ZBAKH A. and EL ABBASSI A. (2012).** Potential use of olive mill wastewater in the preparation electrochemical treatment of olive mill wastewater: treatment extent and effluent phenolic compounds monitoring using some uncommon analytical tools. *J. of function. Foods.*, 4: 53 –65.



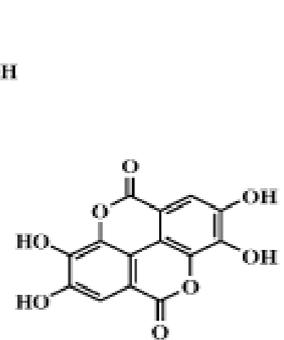
Annexes



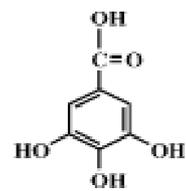
Proanthocyanidins



Hydrolyzable Tannins

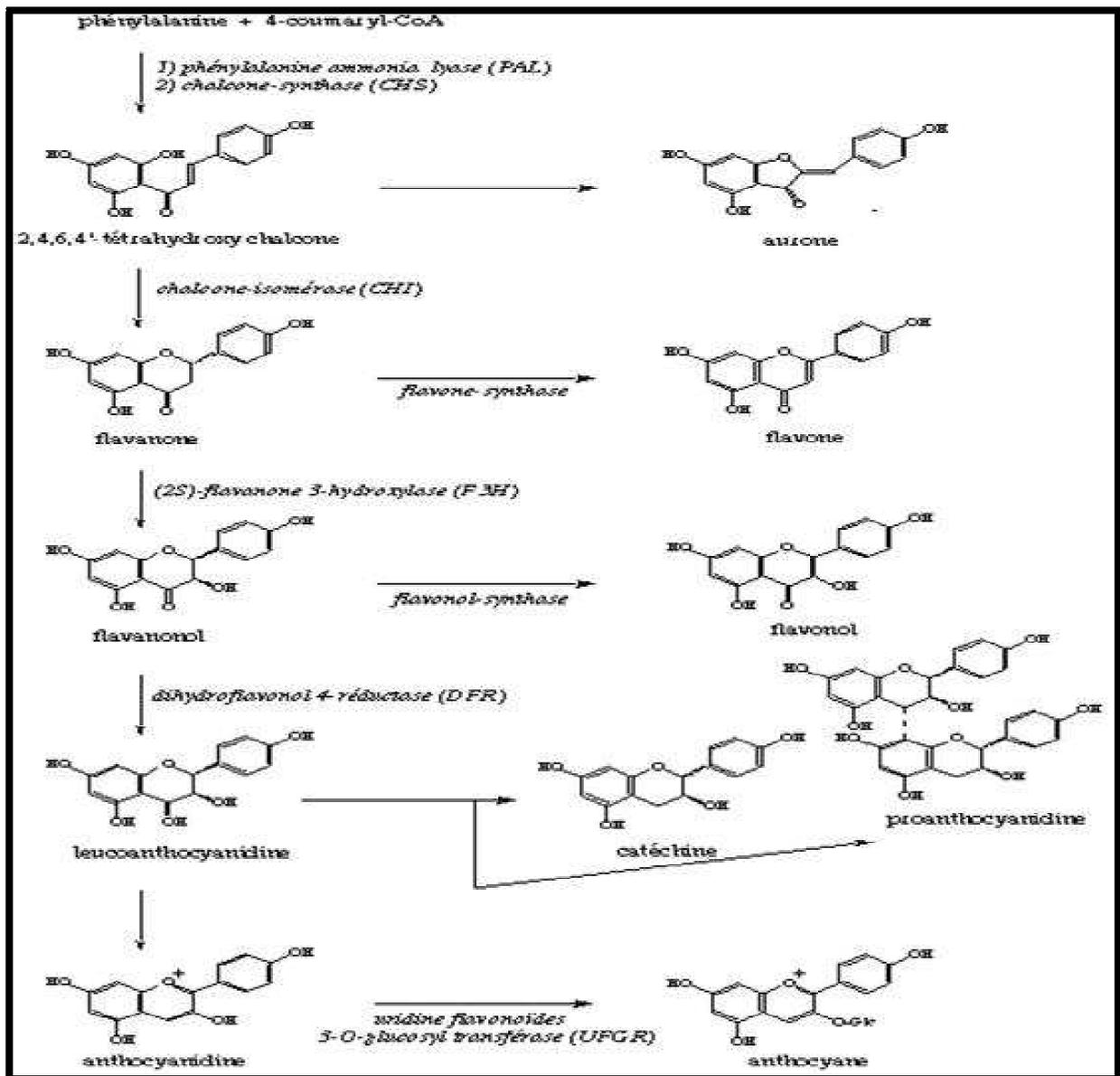


Ellagic acid

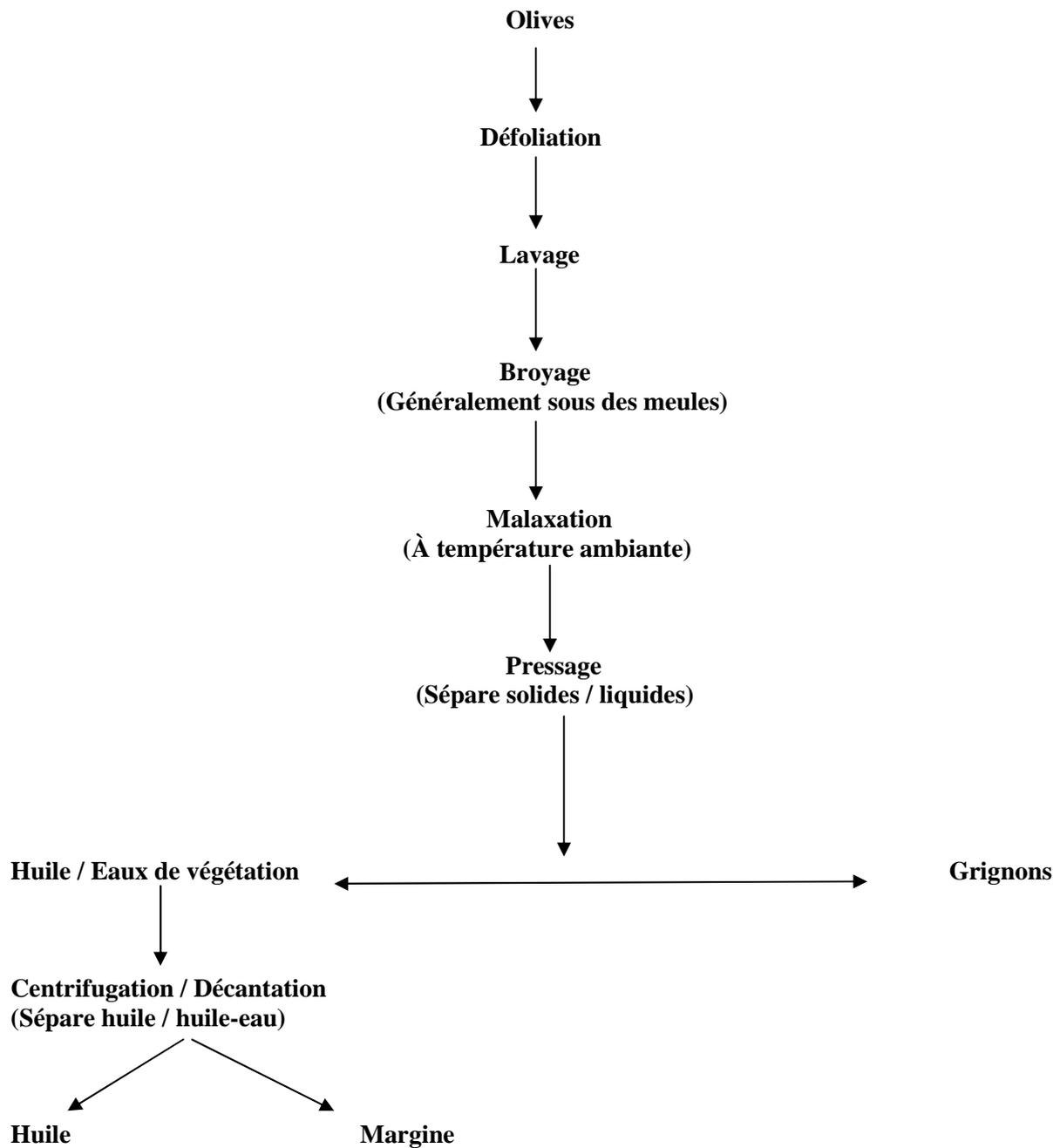


Gallic Acid

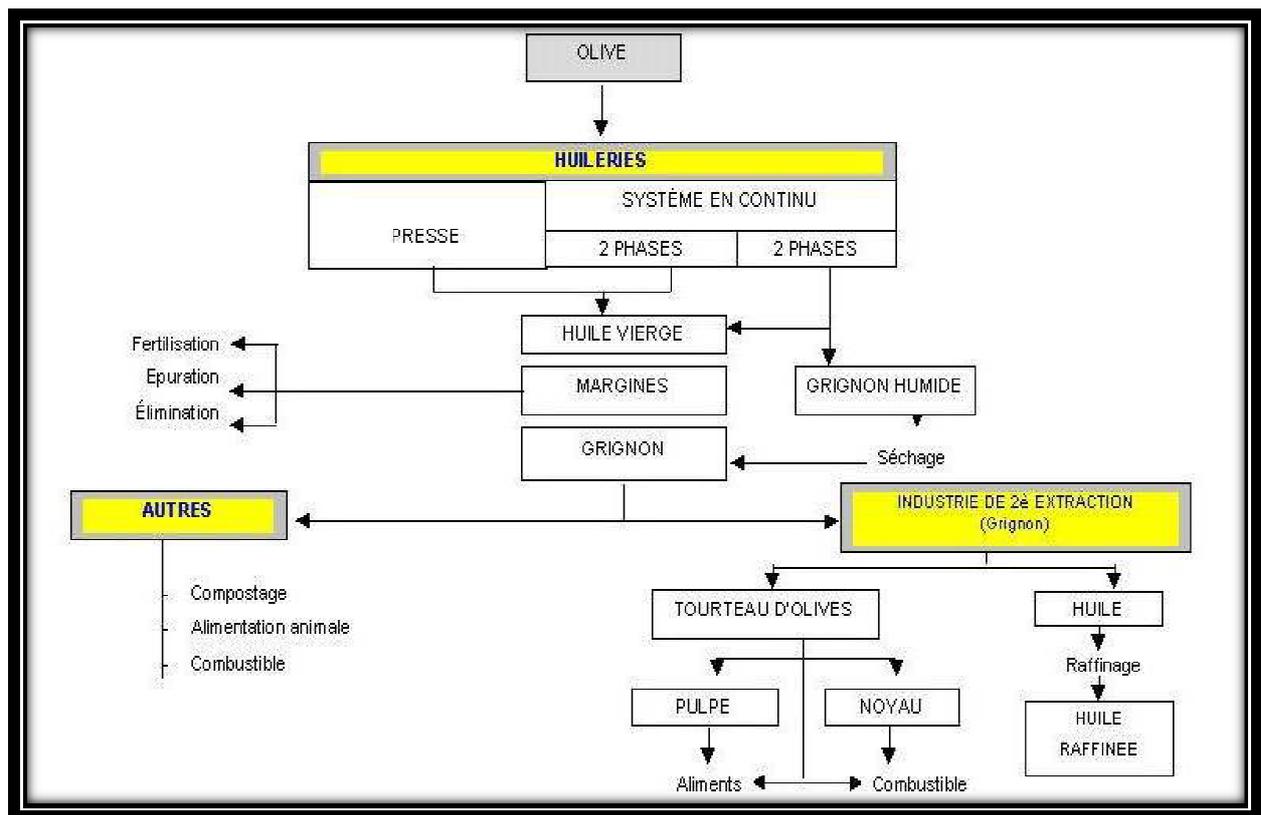
Annexe 01: Structures chimiques des tanins.



Annexe 02 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (BRUNETON, 1999).



Annexe 03 : Extraction de l'huile d'olive par le système de presse traditionnel.



Annexe 04 : Procédés d'obtention d'huile d'olive (Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre, 2000).

Annexe 05 : Composition minérale des margines (SALVEMINI, 1985).

| Elément | Concentration (mg.l ⁻¹) |
|--|-------------------------------------|
| Orthophosphates (PO₄ 3-) | 800,6 |
| Chlorures (Cl-) | 270,2 |
| Sulfate (SO₄ 2-) | 16,68 |
| Sodium (Na⁺) | 5370,9 |
| Potassium (K⁺) | 15295,5 |
| Calcium (Ca²⁺) | 1167,6 |
| Magnésium (Mg²⁺) | 410,3 |
| Fer (Fe) | 103,4 |
| Aluminium (Al) | 8,34 |
| Chrome (Cr-) | 0,66 |
| Nickel (N) | 3,36 |
| Cobalt (Co) | 1,33 |
| Manganèse (Mn) | 1,66 |
| Cadmium (Cd) | 0,83 |
| Oxyde de silicium (SiO₂) | 41,7 |
| Zinc (Zn) | 10,0 |

Annexe 06: Composition phénolique des margines étudiées par D'ANNIBALE *et al.* (2000).

| Composé phénolique | Teneur (mg) |
|--------------------------------------|-------------|
| Acide 3-hydroxybenzoïque | 28 |
| Acide 4-hydroxybenzoïque | 71 |
| Acide 3-hydroxyphénylpropionique | 70 |
| Acide 4-hydroxyphénylpropionique | 23 |
| Acide 4-hydroxyphénylacétique | 23,4 |
| 4-hydroxyphényléthanol | 173 |
| Catéchol | 234 |
| Acide 3,4-dihydroxyphényléthanol | 438 |
| Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique | 92 |
| Acide 2,3-dihydroxyphénylacétique | 16,4 |
| Acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique | 11,7 |
| Acide 3,4-dihydroxycinnamique | 35,2 |

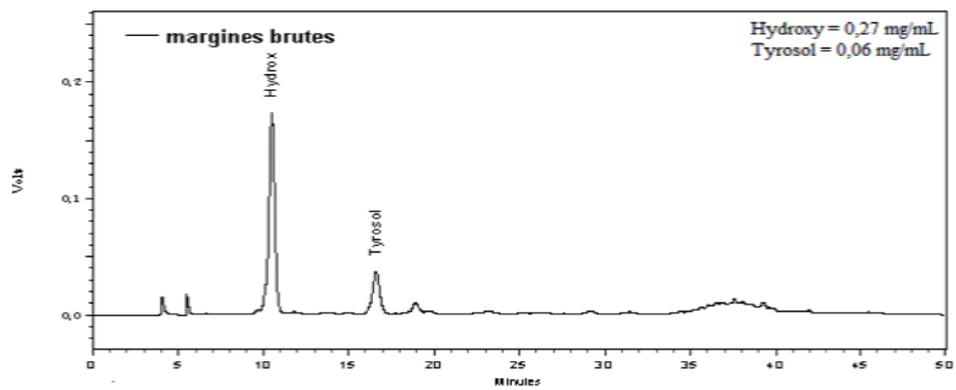
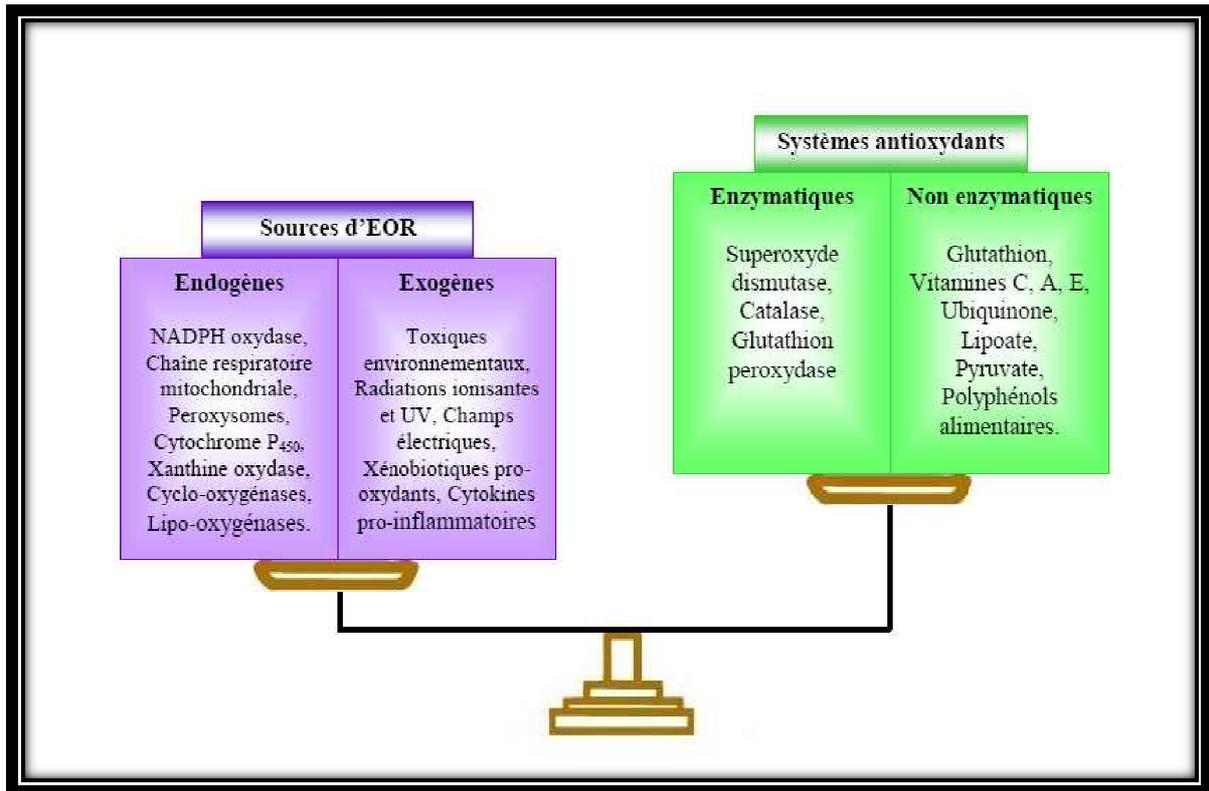
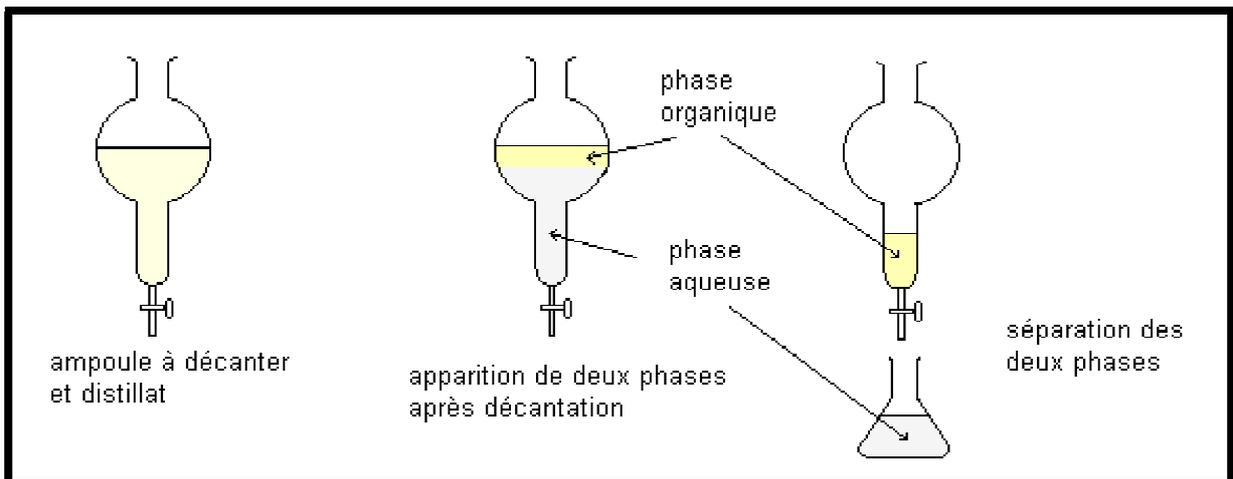


Figure 1. Chromatogramme HPLC de l'extrait phénolique des margines brutes
Figure 1. HPLC chromatograms of the phenols from raw olive mill effluent

**Annexe 07 : Profil chromatographique de l'extrait phénolique des margines brutes
(ACHAK *et al*, 2009).**



Annexe 08 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant.



Annexe 09 : Extraction liquide-liquide (par solvants organiques).

Annexe 10 : Préparation des solutions

- **Préparation de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 7%**

Dissoudre 7g dans un volume de 100ml d'eau distillée.

- **Préparation de la solution mère d'acide gallique de concentration (200 $\mu\text{g/ml}$)**

Une quantité de 5mg (pesée à l'aide d'une balance de précision) est dissoute dans 25 ml d'eau distillée.

- **Dilutions à partir de la solution mère :** pour avoir des solutions diluées à partir d'une solution mère, appliquer la règle ($C_1 V_1 = C_2 V_2$).

C_2 : concentration de la solution diluée que l'on veut préparer (par exemple $C_2 = 100 \mu\text{g/ml}$)

V_2 : le volume connu de la solution diluée (par exemple $V_2 = 1000 \mu\text{l}$).

C_1 : Concentration de la solution mère ($C_1 = 200 \mu\text{g/ml}$).

V_1 : le volume inconnu de la solution mère qu'il faut prélever et ajuster à $1000 \mu\text{l}$ avec l'eau distillée pour avoir une concentration finale de $100 \mu\text{g/ml}$.

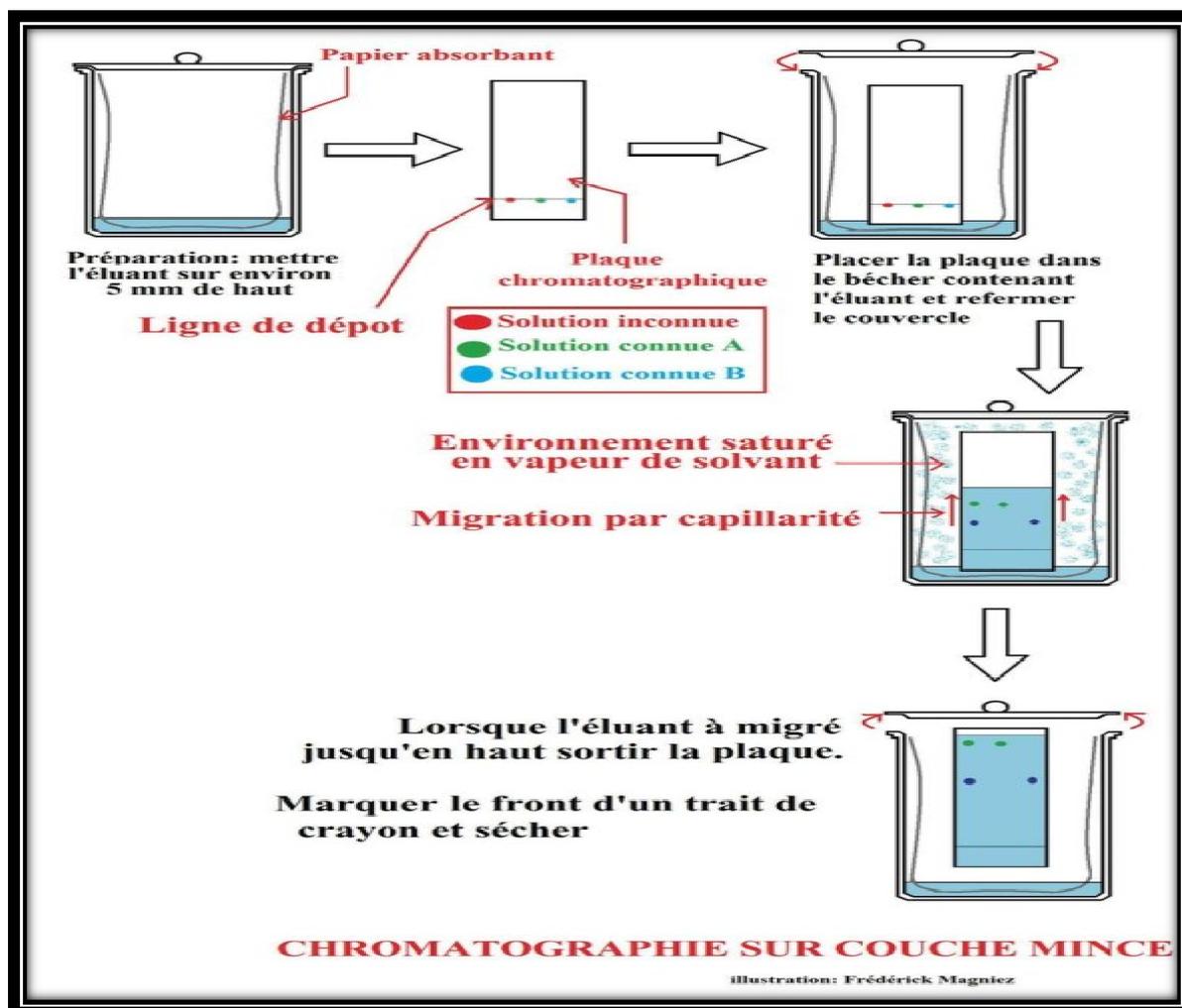
Application : $V_1 = C_2 V_2 / C_1$

$$V_1 = 100.1000 / 200 = 500 \mu\text{l}.$$

- **Préparation d'une solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) 2% dans le méthanol :** Dissoudre 2g de AlCl_3 dans 100ml de méthanol.

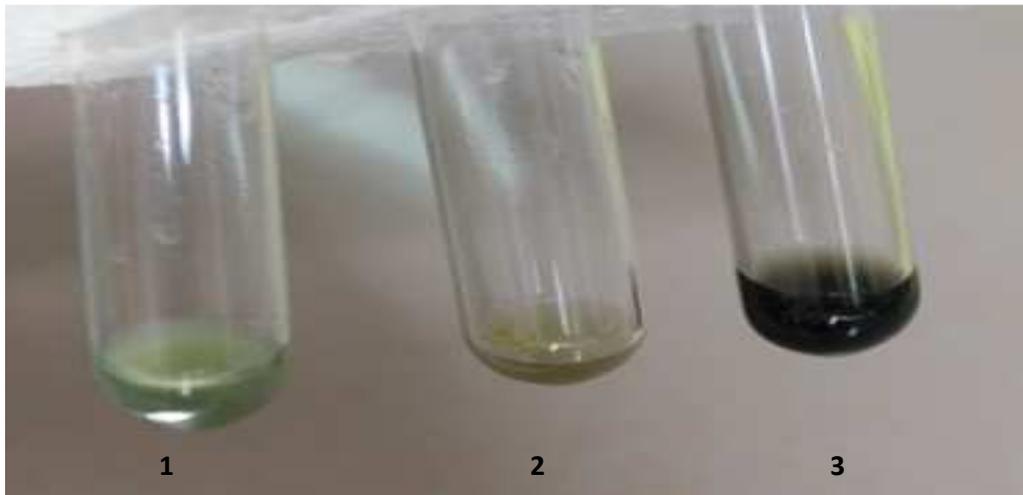
- **Préparation d'une solution de Fe Cl_3 1% :** 1g de FeCl_3 → Dans 100ml d'eau distillée.

- **Solution de ferrocyanure de potassium 1% :** dissoudre 1g de ferrocyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), dans 100ml d'eau distillée.

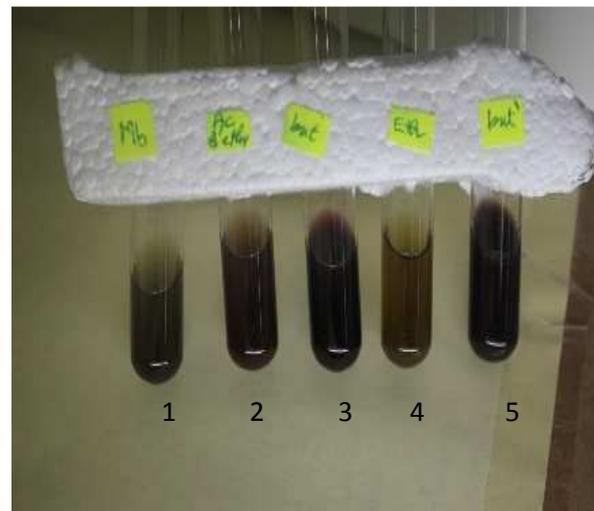
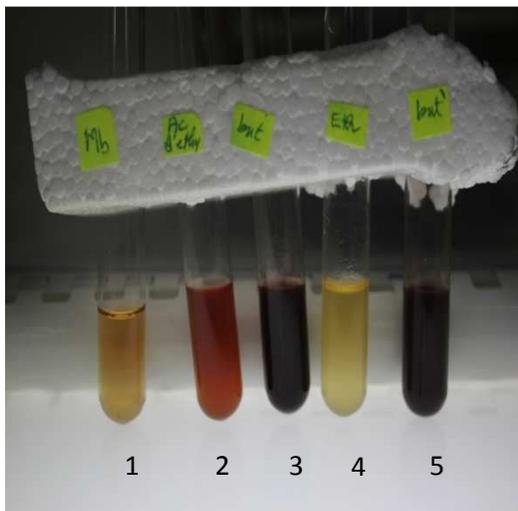


Annexe 11 : Chromatographie sur couche mince.

Annexe 12 : Résultats de la mise en évidence de la présence des tanins dans les extraits méthanoliques obtenus avant et après déglycosylation.



A. Extraits méthanoliques obtenus suite à l'extraction par les trois solvants à polarités croissantes (1.extrait étheré.2. extrait d'acétate d'éthyle.3. extrait butanolique).



B. Extraits méthanoliques obtenus après hydrolyse au milieu HCl 2N.

A gauche : avant traitement au FeCl_3 .

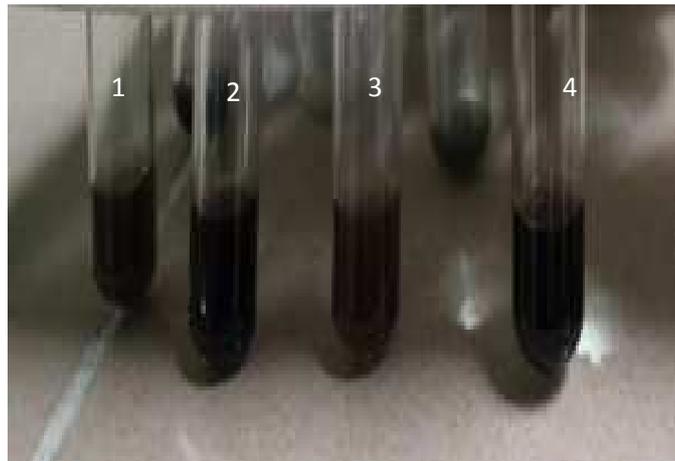
A droite : après traitement au FeCl_3 .

1. Extrait phénolique d'acétate d'éthyle obtenu à partir des margines brutes (CPMB).
- 2.Acét2N.3.But 2N.4.Eth 2N.5. But' 2N.



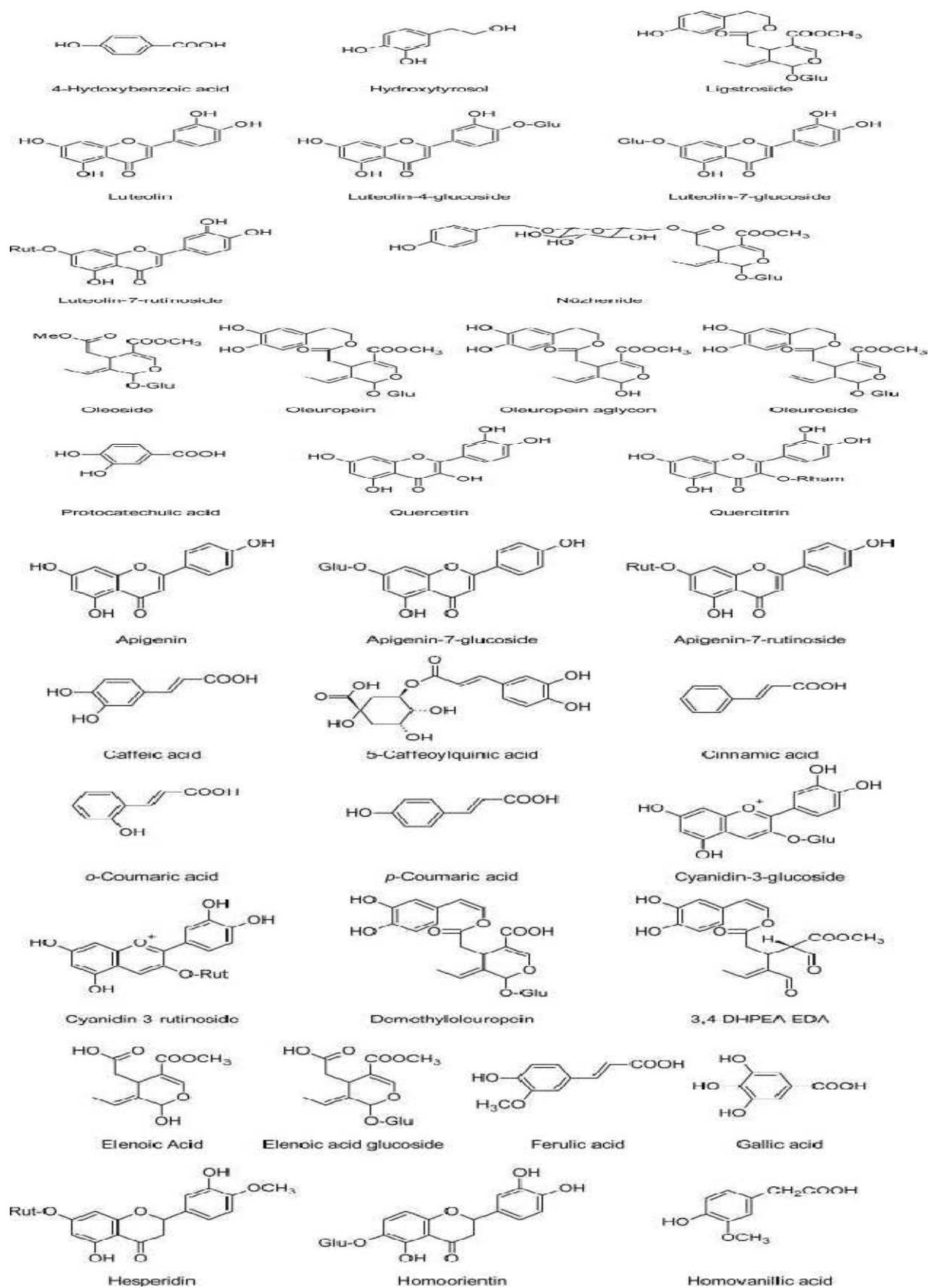
C. Extraits obtenus à partir des margines traitées avec HCl 6N.

1.Acét 6N.2.But6N.3.Eth6N.4.But'6N.



D. Extraits obtenus à partir des margines ayant subi un traitement au NaOH suivi d'un autre à l'HCl.

1.Acét ALCA.2.But ALCA.3. Eth ALCA.4.But' ALCA.



Annexe 14 : Structures chimiques des polyphénols identifiés dans les fruits, les feuilles et les huiles d'olive classées par ordre alphabétique (OMAR, 2010).