

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie
Mémoire de fin d'études



En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique
en Sciences de la Nature et de la Vie
Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Étude comparative de quelques caractéristiques physico-chimiques et activités biologiques d'échantillons de margines collectés dans diverses régions de la Kabylie

Présenté par : M^{elle} AMAROUCHE Thileli & M^{elle} BOUMKHILA Hamida

Devant le jury :

Président : Mr BOUACEM K.

Maître de Conférences (B) UMMTO

Promotrice : M^{elle} DERMECHE S.

Maître -assistante classe A UMMTO

Examinatrice : M^{me} AFIF-CHAOUCHE T.

Maître de Conférences (B) UMMTO

Date de soutenance :22/09/2019

2018-2019



Merci

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remercions ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'études.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre promotrice, M^{elle} Dermeche Samia. Nous la remercions de nous avoir encadré, orienté, aidé, et conseillé.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Nous n'oublions pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail,

A mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien inconditionnel, à la fois moral et économique et leurs prières, tout au long de mes études et par conséquent la réalisation de ce mémoire.

Vos prières et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

Je le dédie aussi,

A ma très chère petite, unique, adorable sœur RYM

A mes chers frères, RAYANE et SOHIB, pour leur appui, leur encouragement permanent, et leur soutien moral.

Ainsi qu'à toute ma famille pour son soutien tout au long de mon parcours universitaire, Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Hamida



Dédicace

Je tiens à dédier le fruit de se modeste travail comme un geste de gratitude

à :

*Mes très chers parents, qui m'ont encouragé durant toute mes années
d'étude.*

A ma sœur adorée Lisa

A mon cher frère Akşel

A ma belle-famille sans exception

Ainsi qu'à toute ma famille

A mon cher fiancé

A toi Hamida ,ainsi que toute ta famille

A vous

Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouvelles substances ayant des propriétés biologiques à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques de dix extraits de margines.

Dans ce contexte, nous avons procédé en premier lieu à l'extraction des polyphénols par utilisation d'un solvant (acétate d'éthyle), puis à une caractérisation physico-chimique des margines et à la quantification des polyphénols totaux par le réactif de Folin-ciocalteu. En deuxième lieu, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits par trois méthodes: piégeage de radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2-azini-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) et le pouvoir réducteur FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), qui a révélé que la majorité des extraits renferment des propriétés antiradicalaires intéressantes qui se manifestent avec des valeurs faibles des IC50, dues à leurs capacités de céder des électrons pour réduire le radical DPPH, ainsi qu'à l'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Les tests antibactériens sont réalisés sur différents types de souches de référence (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *B. cereus* ATCC 14579, et deux souches SARM : *S. aureus* LGA 251 et *S. aureus* MU 50). Les résultats révèlent que les extraits exercent un effet antibactérien en particulier vis-à-vis des bactéries Gram positif. Les quatre extraits possèdent un large spectre d'activité vis-à-vis des bactéries testées. Ces résultats suggèrent une valorisation des sous-produits oléicoles, lesquels représente une source non négligeable en CP. Leur utilisation comme moyens de lutte contre les bactéries pathogènes résistantes et d'altération des aliments s'avère prometteuse dans le domaine médical et le secteur agro-alimentaire.

Mots clés :

Polyphénols ; activité antibactérienne ; activité antioxydante ; margine.

Abstract

In the context of the research of new substances with biological properties from natural sources, we have been interested in this work to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of the phenolic compounds of ten extracts.

In this context, we proceeded first to the extraction of the polyphenols by using a solvent (ethyl acetate), then to a physicochemical characterization of the margins and to the quantification of the total polyphenols by the Folin reagent-ciocalteu. Secondly, we were interested in the evaluation of the antioxidant activity of the extracts by three methods: free radical trapping DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2- azini-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) and the reducing power FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) which revealed that the majority of extracts contain interesting antiradical properties that manifest themselves with low IC50 values, due to their ability to donate electrons to reduce the DPPH radical, as well as to the evaluation of antibacterial activity by the diffusion method on agar medium.

Antibacterial assays were performed on different types of reference strains (*S. aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 700603, *B. cereus* ATCC 14579, , and two SARM strains: *S. aureus* LGA 251 and *S. aureus* MU 50). The results reveal that the extracts exert an antibacterial effect, in particular with respect to gram positive bacteria.

Four extracts have a broad spectrum of activity against the bacteria tested.

These results suggest a valuation of olive oil by-products, which represents a significant source of CP. Their use as a means of fighting resistant and food-resistant bacteria is promising in the medical field and the agri-food sector.

Keywords:

Polyphenols; antibacterial activity; antioxidant activity; margins.

Liste des abréviations

ABTS : 2,2- azini-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate

AG : Acide gallique

B. cereus : *Bacillus cereus*

CP : composés phénoliques

CPT : composés phénoliques totaux

DMSO : diméthyl sulfoxyde

DO : densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

E : extrait

E. coli : *Escherichia coli*

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

G : Gram

H% : humidité

HO : huile d'olive

IC₅₀ : Concentration équivalente à 50% de DPPH inhibés ou ABTS inhibé.

Kp : *Klebsiella pneumoniae*

MBC: Minimum Bactericidal Concentration.

mg EAG/g de MS : milligramme d'équivalent gramme/gramme de matière sèche

MS : matière sèche

n : nombre de répétition

ND : non déterminé

pH : potentiel d'hydrogène

PPT : polyphénols totaux

R : Coefficient de corrélation linéaire

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

TC: teneur en cendre

Liste des figures

Figure 1 : Arbre de l'olivier	5
Figure 2 : Schéma représentant les systèmes d'extraction de l'huile d'olive	8
Figure 3 : Procédé moderne de l'extraction de l'huile d'olive	8
Figure 4 : Procédé traditionnel de l'extraction de l'huile d'olive	8
Figure 5 : Les structures chimiques des différents acides phénoliques	16
Figure 6 : Structure de l'acide gallique (A), d'un exemple de tannins hydrolysables (B) et de l'acide ellagique (C)	17
Figure 7 : Exemple de structure d'un tannin condensé.....	18
Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes	18
Figure 9 : Structure du DPPH · et sa réduction par l'antioxydant RH	31
Figure 10 : Processus de réduction du radical ABTS ^{•+} en présence d'un antioxydant.....	32
Figure 11 : Diagramme représentant la teneur en polyphénols totaux de dix extraits.....	35
Figure 12 : Teneur en eau et en matière sèche des margines	37
Figure 13 : Teneur en cendres et en matière minérale.....	38
Figure 14 : Diagramme représentant le PR _{0,5} en fonction des différents extraits	39
Figure 15 : Diagramme représentant l'IC ₅₀ des différents extraits	41
Figure 16 : Diagramme représentant les IC ₅₀ des différents extraits	42
Figure 17 : Diamètres des zones d'ihibition en (mm) résultant des souches testés	43

Liste des tableaux

Tableau I: La systématique de l' <i>Olea europea L</i>	4
Tableau II: Les caractéristiques physicochimiques des margines selon différents auteurs	13
Tableau III: Composition minérale des margines	13
Tableau IV: Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples	19
Tableau V: Présentation du matériel végétal.....	24
Tableau VI: Les souches bactériennes utilisées dans notre étude microbiologique	25
Tableau VII: L'appareillage utilisés lors de travail expérimental	25
Tableau VIII: Le petit matériel utilisé lors de travail expérimental	25
Tableau IX: Les produits chimiques utilisés	26
Tableau X: Valeurs de pH de chacun des extraits.....	38
Tableau XI: Diamètres de zones d'inhibition en mm exercées par les extraits phénoliques étudiés sur les différentes souches utilisées.....	44

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Première partie : Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur l'olivier e l'huile d'olive et sous-produits oléicoles	
1.1. Historique	3
1.2. Aire de répartition.....	3
1.3. Taxionomie et systématique.....	4
1 .4. Description botanique	4
1.5. Description de principales variétés d'olives en Algérie	5
1.6. Répartition géographique de la production d'olive.....	6
1.7. Production de l'huile d'olive en Algérie	6
1.8. Production.....	6
1.9. Facteurs influençant sur la production de l'HO.....	6
1.9.1. Facteurs climatiques.....	7
1.9.2. Facteurs géographiques	7
1.9.3. Facteurs pédologiques.....	7
1.10. Systèmes d'extraction d'HO :	7
1.10.1. Système discontinu de presse (ou classique)	7
1.10.2. Procédé continu à trois phases.....	7
1.10.3. Système continu à deux phases	7
1.11. Etapes d'extraction :	9
1.11.1. Lavage, broyage et malaxage	9
1.11.2. Pressurage	9
1.11.3. Décantation ou centrifugation	9
1.11.4. Stockage	9
1.12.L'huile d'olive et la santé humaine	9

Sous-produits	10
1. Grignons d'olive	10
2. Margine	11
2.1. Définition	11
2.2. Origines des margines	11
2.3. Caractéristiques physicochimiques	12
2.4. Caractéristiques microbiologiques	14
2.5. Valorisation des margines	14
3. Toxicité des margines.....	14

Chapitre II : Les polyphénols

2.1. Généralités	16
2.2. Principales classes des polyphénols	16
2.2.1. Les acides phénoliques	16
2.2.2. Les tanins.....	17
2.2.3. Les flavonoïdes	18
2.3. Activités biologiques des polyphénols	19
2.3.1. Activité antioxydant.....	19
➤ Les radicaux libres	20
➤ Antioxydants	20
2.3.2. Activité antimicrobienne	21
➤ Les principales substances antimicrobiennes	22

Deuxième partie : partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

3.1. Matériel	24
3.1.1. Matériel biologique	24
3.1.2. Appareillage	25
3.1.3. Consommable	25
3.1.4. Produits chimiques et milieux de culture	26
3.2. Méthodes	26
3.2.1. Extraction des polyphénols	26
3.2.2. Dosage de CPT par la méthode de colorométrie.....	27
3.2.3. Caractéristiques physicochimiques des margines	28
3.2.4. Tests de l'activité antioxydant	30
❖ Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	30

❖ Test DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	31
❖ Test ABTS (acide 2, 2'- azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonique)	32
3.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	33
Chapitre IV : Résultats et discussions	
4.1. Extraction.....	35
4.2. Teneur en PPT.....	35
4.3. Teneur en eau	36
4.4. Teneur en cendres	37
4.5. Teneur en pH.....	38
4.6. Activité antioxydante	39
4.6.1. Test de FRAP.....	39
4.6.2. Test de DPPH.....	40
4.6.3. Test d'ABTS	41
4.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	43
Conclusion	46
Références bibliographiques	



Introduction générale

L'huile d'olive est un produit très important dans le régime méditerranéen, elle est préconisée par de nombreux diététiciens, elle a acquis par ailleurs une place essentielle dans la recherche de ses propriétés médicinales et cosmétiques.

L'industrie oléicole est une activité économique importante, répandue principalement dans les pays méditerranéens qui tiennent environ 95% de la production mondiale.

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 (margine) et l'autre solide (grignon) (Nefzaoui, 1991). Les margines sont considérées comme l'un des effluents les plus nocifs produits par les industries agro-alimentaires (Cardinali *et al*, 2010) en raison de leur charge polluante et de leur toxicité pour l'ensemble de l'écosystème (plantes, microorganismes et organismes aquatiques et aériens) due à leur pH acide et leur richesse en matière organique, en particulier en polyphénols (El-Abbassi *et al*, 2012b ; Dermeche *et al*, 2013). De ce fait, le rejet de ces effluents dans les rivières et les égouts sans aucun traitement préalable pose de sérieux problèmes pour le système aquatique (Sayadi *et al*, 2000). 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 (Kissi *et al*, 2001 ; Garrido Hoyos *et al*, 2002 ; Pozo *et al*, 2002 ; Fenice *et al*, 2003). Cependant, les procédés développés jusqu'à présent restent très limités et leur coût très élevé (Hamdi, 1993a ; Hamdi, 1993c).

La production d'olive et sa transformation en huile ont un impact socio-économique en Algérie, classée parmi les pays producteurs après l'Union Européenne. Il est donc impératif pour notre pays du point de vue économique de garantir des conditions optimales pour obtenir des huiles de haute qualité.

Les polyphénols, une grande classe de produits chimiques qui se trouvent dans les plantes, ont beaucoup attiré l'attention au cours des dernières décennies en raison de leurs propriétés et de l'espoir qu'elles présenteront des effets bénéfiques sur la santé, en tant qu'apport alimentaire ou complément. Des composés phénoliques constituent l'un des plus vastes groupes de produits chimiques dans le règne végétal. Il est estimé que plus de 8000 composés ont été isolés et décrits.

Ils peuvent être subdivisés en trois sous-classes principales, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les stilbénoloïdes.

Le présent travail consiste à donner un intérêt des margines et dans ce contexte s'inscrit cette étude qui vise les objectifs suivants :


- La caractérisation physicochimique des margines (cendres, pH.) ;
- La caractérisation quantitative du contenu en polyphénols totaux des margines ;
- L'évaluation de l'effet antioxydant des extraits par le test DPPH, test de FRAP et le test d'ABTS ;

- L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des margines vis-à-vis quelques souches bactériennes.

Le contenu de ce mémoire est présenté en trois parties :

- la première partie est une partie théorique consacré à l'étude bibliographique décrivant les généralités sur l'olivier ainsi, les margines de façon détaillée. En plus un passage global sur les polyphénols.
- La seconde concerne la présentation de matériel d'étude et les méthodes utilisées dans ce travail.
- La dernière partie englobe les résultats obtenus et discussions.

Enfin, dans la conclusion générale, nous tentons de mettre en avant les points importants apportés par notre travail, ainsi que nos perspectives.



*Synthèse
bibliographique*

CHAPITRE I

*Généralités sur l'olivier et sous-
produits oléicoles*

1.1. Historique

L'olivier est un arbre qui a accompagné le développement de la civilisation méditerranéenne, traité avec égards et respect, il a de tout temps été au centre des préoccupations de la civilisation agraire de ces régions, fournissant nourriture, lumière, cosmétique et médicaments (Polese, 2007).

Il est considéré comme un symbole de vie de savoir de fidélité de victoire et de puissance autrefois, l'arbre a conservé sa force symbolique et le rameau d'olivier est devenu symbole de la paix et de la victoire partout dans le monde. Il figure actuellement sur le drapeau de l'ONU (Ventoso, 2013).

L'olivier existe avant même la naissance de l'écriture (IV^e millénaire avant JC), dont ses feuilles sont utilisées par les anciens égyptiens dans le processus de momification des membres de la famille royale.

1.2. Aire de répartition

L'olivier occupe une place très importante dans l'arboriculture fruitière méditerranéenne. Actuellement, considéré comme élément majeur de l'économie agricole dans certains pays généralement, et dans notre pays spécialement.

L'huile d'olive est utilisée en consommation directe, dans les domaines de la médecine et de la cosmétologie en vue de ses vertus nutritives et curatives.

- **En Algérie**

L'olivier de son nom scientifique *Olea Europaea*, occupe une superficie de 165000 ha de plantation en rapport soit 36^e la superficie arboricole. Les rendements sont de l'ordre de 08 quintaux /ha, il s'avère qu'ils sont parmi les plus faibles des pays oléicoles et cela est dû au vieillissement des sujets, et du non remplacement des anciennes verges par de nouveaux, ainsi que la culture est restée selon les méthodes ancestrales (Sekour, 2012).

- **Dans le monde**

L'olivier est considéré comme une espèce caractéristique de la région méditerranéenne car l'implantation des oliveraies en Europe méditerranéenne est limitée au Nord au 45^e degré de latitude, limite imposée par les froids hivernaux et les fréquences gelées printanières, c'est-à-dire qu'il ne dépasse pas le cap du Sud de la France, de la Yougoslavie, ainsi que certaines superficies des territoires de la Grèce, Portugal, et d'autres pays de la rive Nord de la méditerranée (Loussert et Brousse, 1978).

Dans la rive Sud de la méditerranée en Afrique du Nord, l'olivier n'est pratiquement plus cultivé au-delà du 30^e degré de latitude, limite imposée par les rigueurs du climat présaharien vers le Sud. (Loussert et Brousse, 1978).

Globalement, l'aire de répartition de l'olivier forme une bande étroite et relativement régulière le long des rivages Nord et Est de la Méditerranée, qui s'y interrompt au niveau de l'Égypte couvre la région septentrionale de la Tunisie et de l'Algérie, s'était enfin, largement au Maroc et dans la péninsule ibérique en débordant sur partie de leur façade atlantique atteignant l'Archipel des îles Canaries (Loussert et Brousse, 1978).

1.3. Taxionomie et systématique

Selon Ghedira (2010), *Olea europaea subsp sylvestris* appartient à la famille des oléacées. L'espèce *Olea europaea* a été nommée par Linné en raison de son aire géographique. Le genre *Olea* comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. On distingue deux sous-espèces, l'olivier sauvage ou l'oléastre (*Olea europaea sylvestris*) et l'olivier cultivé ou commun (*Olea europaea sativa*) (Spichiger *et al*, 2002 ; Dupont *et al*, 2007).

Tableau I : La systématique de l'*Olea europea* L. (Ghedira, 2010)

Règne	Plantae
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Dialypetales</i>
Sous-classe	<i>Lamiales</i>
Ordre	<i>Oleaceae</i>
Famille	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europaea</i> L
Sous-espèce	<i>O. europea subsp. Sylvestris</i>

1.4. Description botanique

L'olivier fait partie de la famille des oléacées, il était et il est toujours principalement cultivé pour ses olives bien qu'il a intégré le statut d'arbre d'ornement. C'est un arbre moyennement trapu (moyenne de 2m) qui peut pour certain sujet atteindre les 15 mètres de hauteur (Wagner, 1999).

L'olivier peut vivre plus de 1000 ans, son tronc tourmenté et noueux porte à sa base de nombreux rejets dans sa condition mi-sauvage. Le bois d'olivier est brun clair veiné de marbrures sombres, il est apprécié par les ébénistes et les sculpteurs.

Les feuilles de l'olivier ne tombent jamais, (durée de vie, trois ans) leur situation sur le rameau est dite "opposée", le pétiole est court. La face supérieure des feuilles est luisante vert foncé, tandis que la face inférieure présente un aspect argenté dû à la pruine, ses fleurs blanches forment des grappes courtes.

Le fruit, l'olive, est une drupe avec une pulpe charnue riche en matière grasse. D'abord vert, il devient noir à maturité complète, vers octobre novembre. Il est constitué de trois parties : Epicarpe, Mésocarpe (pulpe), Endocarpe (paroi de noyau) dont une section transversale couplée à la composition physique et chimique rapportées. Le noyau (amandon) est très dur, osseux, contient une graine, rarement deux. Les fleurs blanches, à corolle en tube portant quatre lobes ovales, sont groupés en grappes dressées et apparaissent à l'aisselle des feuilles vers mai-juin.



Figure 1. Arbre de l'olivier.

1.5. Description de principales variétés d'oliviers en Algérie

Variétés d'oliviers à l'huile

Les principales variétés d'olives cultivées en Algérie sont :

- **Chemlal de Kabylie** qui occupe 40% du verger oléicole Algérien et qui se trouve principalement en Kabylie. C'est l'une des plus estimées pour la fabrication de l'huile, le fruit est moyen de masse 2,5g ;
- **Azeradj ou Adjerez** qui occupe plus de 20% du verger oléicole Algérien, se trouve aussi en Kabylie plus précisément à Bejaïa (Akbou et Seddouk). Cette olive à deux fins pèse environ 5 grammes. Elle est très estimée pour la conservation en vert, mais moins recommandable pour l'huilerie ;

- **Aberkane**, laquelle est une autre olive de conserve qui s'emploie à pleine maturité dans la région de Seddouk mais peut également procurer des résultats satisfaisants en huilerie ;
- **Limli**, celle-ci occupe 8% du verger oléicole Algérien répandu aussi à Bejaïa avec un rendement en huile de 20-24%, donne un fruit de 2g pour la fabrication de l'huile.

1.6. Répartition géographique de la production d'olive

La production d'huile d'olive est fortement répandue dans le bassin méditerranéen qui regroupe 99% des plantations et fournit 98% de la production mondiale. La communauté européenne essentiellement l'Espagne, l'Italie et la Grèce avec 50% des superficies fournit à elle seule les trois quarts de cette production, viennent ensuite la Tunisie (18% superficie, 9% de production) et la Turquie (10% et 5%) (Sekour, 2012).

1.7. Production de l'huile d'olive en Algérie

L'Algérie fait partie des pays méditerranéens dont le climat est un des plus propices à la culture de l'olivier. L'huile d'olive algérienne est l'une des meilleures du monde, elle est beaucoup plus utilisée par les consommateurs en cuisine, en thérapie médicale et en tout produit de beauté. La surface oléicole en Algérie est répartie en 3 régions : le centre avec 54,3% de la superficie totale, l'Est avec 28,3% et l'Ouest avec 17% (Sekour, 2012).

1.8. Production

Selon Conseil Oléicole International, la production de l'Algérie en huile d'olive s'est établie à 80 000 tonnes durant la campagne 2017/2018, avec une hausse de 27%. Durant la campagne 2016/2017, la récolte du pays s'est située à 63 000 tonnes, enregistrant ainsi une baisse de 23% par rapport à la récolte précédente. Toutefois, comparativement aux pays voisins ou ceux du bassin méditerranéen, l'Algérie occupe toujours la dernière place dans le classement général.

1.9. Facteurs influençant sur la production de l'HO

La qualité de l'huile d'olive est influencée par plusieurs facteurs climatiques, géographiques, pédologiques et génétiques ; ainsi que par le mode d'extraction, les pratiques culturales et les conditions de stockage. Cette qualité dépend en premier lieu des olives dont elle provient et par la suite des différentes étapes qui s'étendent de la production à la cueillette des olives et de la fabrication et la conservation de l'huile.

1.9.1. Facteurs climatiques

Le climat a une influence importante sur la maturité, donc sur la composition chimique de l'huile d'olive. Des travaux de recherche réalisés par Aparicio ont prouvé que les structures cycliques de l'huile d'olive sont affectées par le climat. La lumière et la température affectent la concentration en acide gras de l'huile d'olive. La composition en acides gras insaturés et principalement en acide linoléique augmente avec la diminution de la température.

1.9.2. Facteurs géographiques

Les olives cultivées dans différentes zones géographiques présentent des caractéristiques différentes. La qualité de l'huile d'olive est affectée par l'altitude. Cette dernière affecte la composition de l'huile d'olive en acides gras, principalement l'acide oléique. Les olives cultivées à haute altitude donnent des huiles riches en acide gras monoinsaturés, bien que les olives cultivées à faible altitude donnent des huiles riches en acides gras saturés donc plus stable.

1.9.3. Facteurs pédologiques

L'influence du sol sur la qualité de l'huile d'olive est un phénomène assez complexe. Plusieurs facteurs tels que la nature du sol, le pH et la composition chimique se mettent en jeu et peuvent influencer la qualité d'une huile. En général, les terres grasses produisent comparativement des huiles moins aromatiques que les terres maigres avec des arbres moins productifs. De plus, les huiles provenant des sols calcaires ont une acidité plus basse que celles des sols argileux.

1.10. Systèmes d'extraction d'HO

Trois systèmes d'extraction sont à présent utilisés (Figure2) :

1.10.1. Système discontinu de presse (ou classique)

Les systèmes à presses sont des systèmes classiques. Ils commencent par un broyage des olives suivi du malaxage et du pressage (El hajjouji, 2007). Ce système permet la récupération de trois phases : deux liquides, l'huile et l'eau de végétation (margine) et une phase solide : grignon.

1.10.2. Procédé continu à trois phases : Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec de l'eau chaude et malaxées pour former la pâte d'olive qui est ensuite diluée (El hajjouji, 2007).

1.10.3. Système continu à deux phases : Cette technologie a débuté en 1992 et elle permet une séparation de la pâte en deux phases (huile et grignon). La totalité de la margine est mélangée avec les grignons. Ce procédé est qualifié d'écologique puisqu'il élimine la quantité de margine à rejeter (S'Habou, 2004).

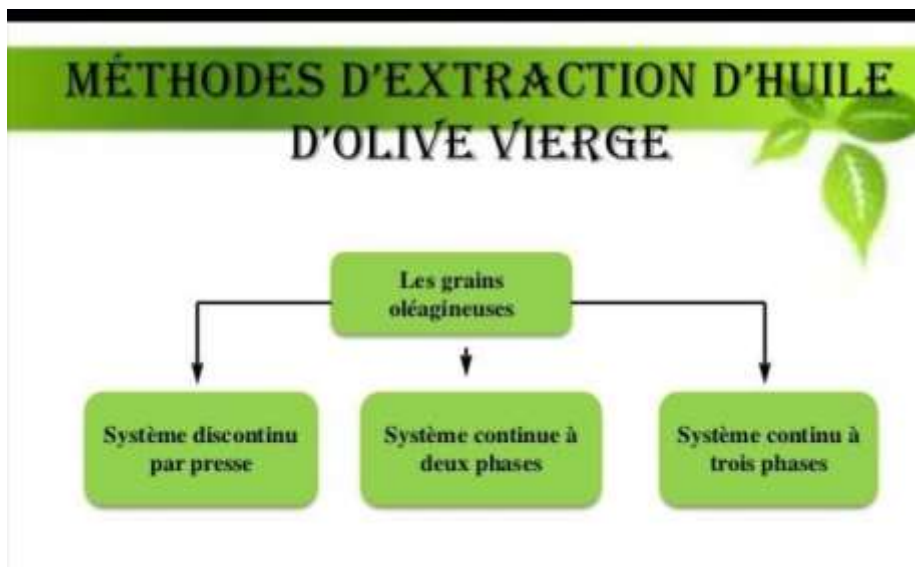


Figure2 : Schéma représentant les systèmes d'extraction de l'huile d'olive

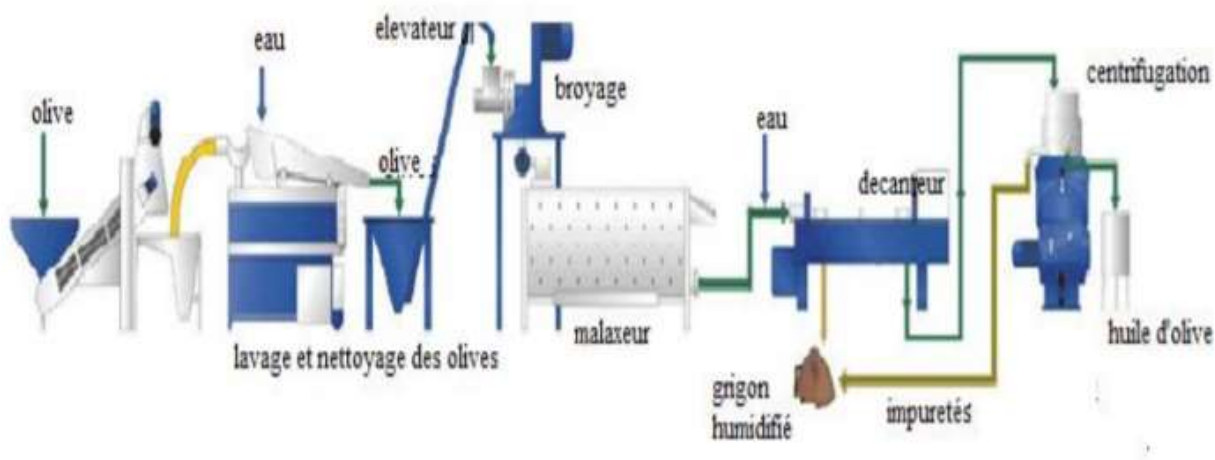


Figure3 : Procédé moderne de l'extraction de l'huile d'olive

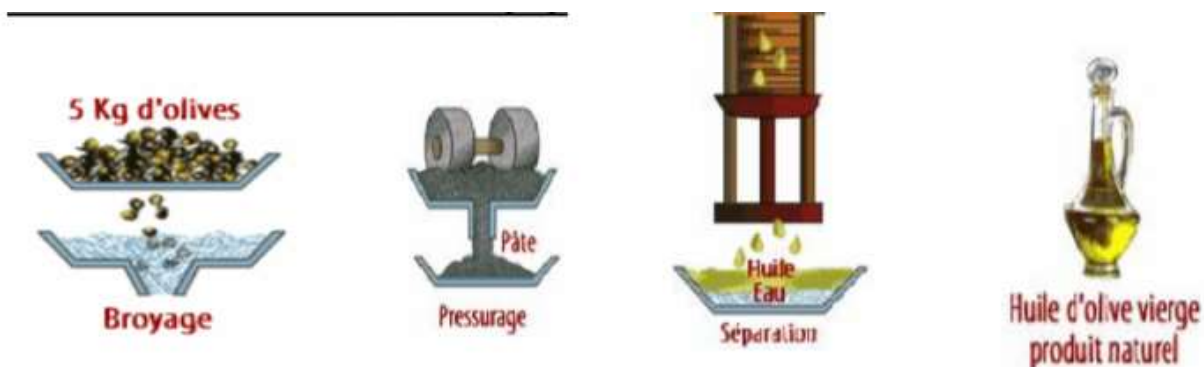


Figure4 : Procédé traditionnel de l'extraction de l'huile d'olive

1.11. Etapes d'extraction

L'huile d'olive est un produit naturel parce que sa préparation est d'une simplicité exemplaire : lavage, broyage, pressurage, décantation, stockage. Autrement dit, on prend l'olive, on la presse et on en recueille le jus. L'olive doit être pressée de préférence le jour de la cueillette pour éviter toute fermentation.

1.11.1 Lavage, broyage et malaxage :

Triées préalablement pour éliminer les brindilles et les feuilles, les olives sont lavées à l'eau froide. La fabrication d'huile consiste tout d'abord à broyer les olives. Cette étape est très importante car la qualité de l'huile en dépend. En effet, si le procédé n'est pas réalisé dans de bonnes conditions, il risque d'y avoir une détérioration de l'huile et une perte de certains composés, car le noyau de l'olive contient un antioxydant, véritable conservateur naturel. La pâte onctueuse qui est obtenue est malaxée et devient très homogène.

1.11.2. Pressurage

La pression hydraulique à froid reste le système d'extraction le plus répandu. La pâte est répartie en quantités de 2 à 5 kilos sur des plateaux ronds, les filtres doivent être à la fois très résistants et laisser passer le liquide. Les filtres recouverts d'une couche de pâte sont empilés par vingt-cinq ou trente pour être pressés. Ils retiennent la partie solide de la pâte et laissent s'écouler l'élément liquide composé d'un mélange d'huile et d'eaux nommées margine.

1.11. 3. Décantation ou centrifugation

Par décantation naturelle, l'huile est recueillie à la surface des margines ; ou bien à l'aide d'une centrifugation qui est une méthode plus rapide et plus efficace.

L'huile obtenue est l'huile d'olive vierge.

1.11.4. Stockage

L'huile d'olive est immédiatement stockée dans des cuves en inox afin d'éviter l'oxydation. Une fois embouteillée, l'huile d'olive doit être conservée à l'abri de la chaleur et de la lumière et consommée de préférence dans les deux ans.

1.12. Huile d'olive et la santé humaine

Depuis plus de 30ans, de nombreuses études ont montré que les bienfaits du régime méditerranéen ont été consacrés au rôle de l'acide oléique et l'apport d'huile dans la prévention des maladies, de plus, l'huile d'Olive tire son intérêt au plan nutritionnel, de sa composition en acides gras essentiels, et de ses composants mineurs, (Vitamine E...).

Prévention du cancer : une étude effectuée par une équipe de chercheurs de l'université de l'Etat de New York a prouvé qu'un lipide, le bêta sitostérol composant l'huile d'olive, aide à empêcher la formation des cellules tumorales au niveau de la prostate. Elle a démontré et conclu que le sitostérol renforce le système de communication interne de la cellule qui donne l'ordre aux cellules de se diviser.

Aide au développement des os : les vitamines E ; A ; D et K contenus dans l'huile d'olive sont particulièrement importantes au développement des os chez l'adulte et l'enfant, elles aident au développement des os à travers la fixation des calciférols.

Prévention du vieillissement : étant donné que les vitamines contenues dans l'huile d'Olive ont un effet de renouvellement sur les cellules, elles sont utilisées aussi dans le traitement des plus âgés.

Contribution au développement de l'enfant : l'huile d'olive offre une nourriture très saine pour les nouveaux nés, une déficience en acide linoléique conduit à l'émergence d'un retard dans le développement dans la petite enfance et des troubles variés de la peau. L'huile d'olive possède un composé polyinsaturé équilibré à un niveau à celui du lait humain.

Pour les organes internes : quelle que soit consommée chaude ou froide, l'huile d'olive protège l'estomac contre les maladies gastriques (gastrite, entérite) en réduisant les acides gastriques. En plus de cela, en activant la bile, elle la rend parfaite. Elle régule le début de la vésicule dans la bile.

L'huile d'olive et diabète : elle est riche en acides gras micro-insaturés qui peuvent être considérés comme une bonne alternative pour le traitement du patient diabète sucré, donc pour améliorer le profil lipidique des diabétiques, l'huile d'olive semble exercer une action favorable également sur le contrôle de la glycémie. (Sekour B, 2012).

Sous-produits

1. Grignons d'olives

C'est un sous-produit du processus d'extraction de l'huile d'olive, issu de la première pression ou centrifugation (Nefzaoui, 1987). C'est un résidu solide composé des peaux, des résidus de la pulpe et des fragments des noyaux. Il est composé par une fraction riche en lignine provenant des fragments de noyaux, et l'autre renfermant principalement des glucides, comme la cellulose et l'hémicellulose et, dans une moindre mesure, des protéines et de l'huile résiduelle qui dépend de la technique d'extraction (Nefzaoui, 1984). Selon Sansoucy (1984), les grignons se divisent en trois types, selon le procédé d'extraction subit :

- **Le grignon brut** : C'est le résidu de l'extraction de l'huile d'olive entière. Ses teneurs

relativement élevés en eau et en l'huile favorisent son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre (Nefzaoui, 1987).

- **Le grignon épuisé** : C'est le résidu obtenu après déshuilage du grignon brut par solvant, l'hexane généralement (Nefzaoui, 1987).
- **Le grignon partiellement dénoyauté** : Il résulte de la séparation partielle des débris de noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation. Il dit "gras" si son l'huile n'est pas extraite par solvant et "dégraisses" ou "épuiées" si son l'huile est extraite par solvant.

2. Margine

2.1. Définition

Les déchets liquides dénommés "margines" (aqua reflue en Italie, alpechin en Espagne, katsigaros en Grèce, zebar dans les pays arabe) (Kapellakis *et al*, 2008) obtenus lors de l'extraction de l'huile d'olive, constituent un important facteur de pollution du fait qu'ils renferment une fraction organique importante (des protéines, lipides, glucides et polyphénols) et aussi par leur acidité moyennement élevée et leur concentration élevée de matière solide totale (Camurati *et al*, 1984). Elles se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre à noir due 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), nauséabond, d'aspect trouble et une odeur spécifique d'huile d'olive (Ranalli *et al*, 1991). Son goût est amer. La qualité et la quantité des margines dépendent de l'opération d'extraction d'huile d'olive, elles sont aussi influencées par la variété d'olive, la saison de cueillette, le taux de maturation des fruits et les conditions climatiques (Fiorentino *et al*, 2003).

2.2. L'origine des margines

Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation (Di-Giovacchino *et al*, 1988 ; Hamdi *et al*, 1992). 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). Les différentes techniques d'extraction d'huile d'olive aboutissent à la formation des margines en quantités variables, allant de 400 à 500 L/tonne d'olives pour les unités traditionnelles et une tonne de margines /tonne d'olives pour les unités modernes (Achak *et al*, 2009).

2.3. Caractéristiques physicochimiques

La composition des margines est très variable et dépend de la variété d'olive, de la maturité du fruit, du volume d'eau ajoutée et du processus d'extraction (presse ou centrifugeuse) (Ben Sassi *et al*, 2006). La composition pondérale typique des margines est la suivante : 83–94% d'eau, 4–16% de composés organiques et 0,4–2,5% de sels minéraux (Davies *et al*, 2004).

La fraction organique contient, entre autres composants, 2-15% de composés phénoliques divisés en composés de bas poids moléculaire (tyrosol, hydroxytyrosol, acide p-coumarique, acide férulique, acide syringique, acide protocatéchique, etc.) et composés de poids moléculaire élevé (tanins); anthocyanes, etc.) ainsi que les polymères catéchol-mélaniniques (Obied *et al*, 2007).

Il se caractérise par une couleur sombre (causée par la polymérisation de la lignine avec des composés phénoliques), une acidité accrue (pH d'environ 5) et une conductivité électrique élevée. Le dernier paramètre varie en fonction de la teneur en sel des margines, qui dépend des pratiques utilisées pour la conservation des fruits de l'olive avant la mouture. Le contenu inorganique de margines est principalement composé de métaux.

La teneur en minéraux des margines est indiquée dans le **tableau II**.

Les principaux éléments de ces eaux usées sont le potassium (0,73–8,6 g / L), suivi du calcium et du sodium (0,03–1,1 et 0,05–0,8 g / L), respectivement. Les métaux sont importants du point de vue nutritionnel et toxicologique. Certains métaux, en particulier le fer, le cuivre et le zinc, sont essentiels au métabolisme des plantes. Il convient de souligner que les margines peuvent être utilisées comme engrais si son pouvoir polluant était contrôlé.

Tableau II : Les caractéristiques physicochimiques des margines selon différents auteurs.

Paramètres	Unité	Paraskeva et al ; (2007)	Asses et al; (2009)	Karpouzias et al ;(2010)	El-Abbassi et al ; (2013)	Mekki et al ; (2013)	Khoufi et al ; (2015)	Gamme de Valeurs
Ph	---	5,2	5,1	5,7	5,3	5	4,8	4,8-5,7
Conductivité	Ms/cm	5	---	11	24	81	17,5	5-81
DCO	g/L	16,5	95	48	156	53	150	16,5-156
DBO	g/L	---	---	---	---	13,4	37,5	13,4-37,5
Résidus sec	g/L	11,5	84,2	---	90	39,4	53,16	11,5-90
Lipides	g/L	---	---	---	7	---	---	7
Phénols	g/L	0,8	4,82	8,8	4,1	8,6	8,9	0,8-8,9
Sucre	g/L	1,3	---	---	4,3	---	---	1,3-4,3
Nitrogène total	g/L	0,06-0,3	---	0,9	---	0,5	---	0,06-0,9

Tableau III : Composition minérale des margines :

Elément	Unité	Mekki et al; (2006)	Karpouzias et al ;(2010)	Moraetis et al ;(2011)	Danellakis et al ;(2011)	Plotrowska et al ;(2011)	Gamme de valeurs
Pb	µg/L	---	---	6,7	10	---	6,7-10
Cd	µg/L	---	---	0,03	1	---	0,03-1
Fe	mg/L	23	6,5	---	8,88	20	6,5-23
Zn	mg/L	---	3,4	2,94	4,98	---	2,94-4,98
Cu	mg/L	---	2,4	---	2,96	---	2,4-2,96
Mn	mg/L	---	0,9	1,61	2,7	20	0,9-20
Mg	g/L	0,19	0,12	0,11	0,11	0,03	0,03-0,19
Ca	g/L	0,9	1,1	0,15	0,29	0,03	0,03-1,1
K	g/L	8,6	6,1	4,22	0,73	3,47	0,73-8,6
Na	g/L	0,8	0,07	---	0,15	0,05	0,05-0,8

2.4. Caractéristiques microbiologiques

Des analyses microbiologiques ont montré que les levures et les champignons sont capables de s'y développer mieux que les bactéries (Esmail *et al*, 2014 ; Millan *et al*, 2000). En effet, ils semblent être les mieux adaptés à l'acidité et à la salinité élevées des margines, et ils résistent plus que les bactéries à la toxicité des substances phénoliques. 130 espèces de microorganismes lipolytiques (56 champignons, 22 levures et 52 bactéries) ont été rapportées dans les margines. Des bactéries cellulolytiques, des champignons pectinolytiques et des actinomycètes sont également rapportés (Ramos-Cormenzana, 1986). Plusieurs genres des levures sont isolés et identifiées dans les margines : *Saccharomyces*, *Candida* et *Williopsis* (Ciafardini *et al*, 2006). La flore fongique se compose essentiellement d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium negricans*, et *alternaria sp*. La charge microbienne totale est évaluée par le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT).

2.5. Valorisation des margines

Jusqu'à maintenant, le traitement des margines constitue un problème complexe vue la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment. Donc, l'application d'un traitement simple s'avère insuffisant (Ranalli, 1991a ; Hamdi, 1993a). Toutefois, les procédés de traitement envisageables pour l'élimination de la charge polluante des margines peuvent être classés selon quatre catégories, et peuvent être utilisés seuls ou combinés : procédés thermique, procédés physique, procédés chimiques et procédés biologiques. Le choix du système de traitement approprié est lié à plusieurs facteurs locaux, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la possibilité de stockage et le rapport entre la charge produite par les huileries et la population locale (Francesco, 1993).

3. Toxicité des margines sur l'environnement

Ces effluents constituent un grave problème avec un impact sévère sur la qualité des sols et de l'eau, et donc sur l'environnement et l'agriculture (Khoufi *et al*, 2007). La toxicité des margines est due essentiellement à la présence des acides gras libres à longue chaîne et des composés phénoliques à fortes concentrations (4 à 15g/L) (Zahari *et al*, 1999).

Les margines contiennent des concentrations élevées en phosphores et en tanins ainsi qu'une large quantité de nutriments (Ghattas, 2004). Elles sont capables de modifier la composition microbienne du sol par l'intermédiaire de leur activité antibactérienne (Borya *et*

al, 1995). Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant leur membranes (Ranalli, 1999).

Les composés phénoliques peuvent agir en tant que composants phytotoxiques, inhibant la croissance ainsi que la germination des plantes et la croissance végétative (Morillo *et al*, 2009).

L'impact environnemental se traduit par plusieurs phénomènes :

- Acidification du milieu ;
- Destruction de la flore bactérienne du sol ;
- Pollution des oueds et barrages et disparition de la vie aquatique ;
- Pollution de la nape souterraine ;
- Forte agressivité, vis-à-vis des matériaux constituant les canalisations (FAO, 2013).

En plus des désagréments visuels et des mauvaises odeurs, la forte charge organique des margines détruits totalement la faune et la flore aquatique par absorption de l'oxygène dissous dans l'eau (Samperdro, 2004).

Le grignon d'olive présente aussi quelques inconvénients sur l'agriculture. La difficulté de l'intégrer uniformément dans le sol, et sa toxicité pour les plantes en raison de sa quantité importante de polyphénols (Lynch, 1980).



CHAPITRE II

Polyphénols

2.1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires).

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix *et al*, 2005).

2.2. Principales classes des polyphénols

2.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont constitués de deux sous-groupes: Les acides hydroxybenzoïques, qui ont en commun la structure en C6-C1 et les acides hydroxycinnamiques, des composés aromatiques avec une chaîne latérale à trois carbones (C6-C3).

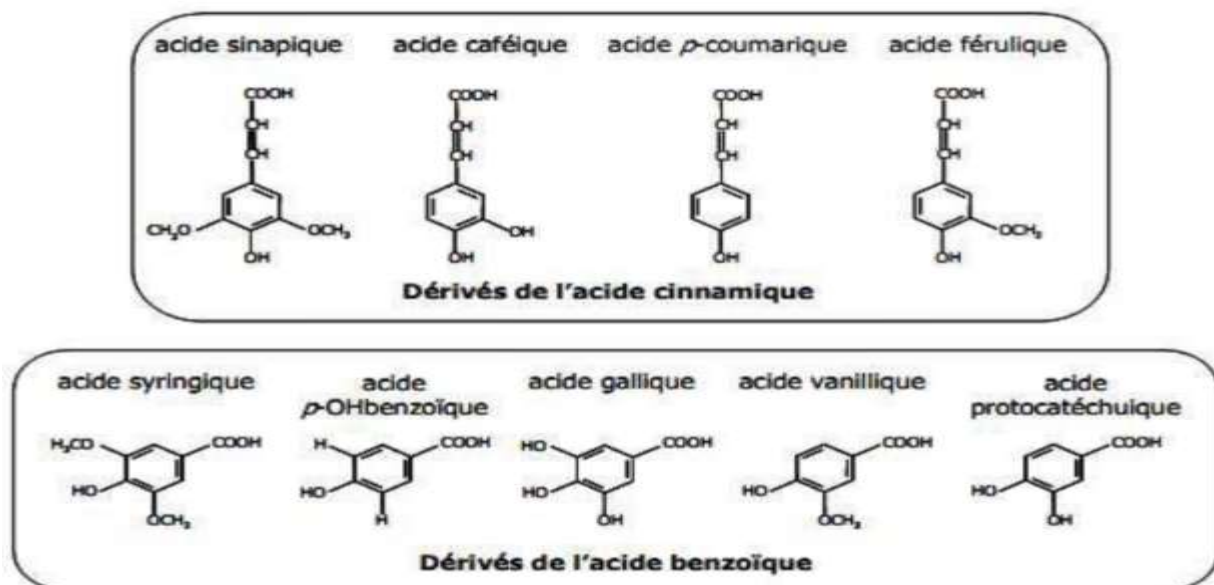


Figure 5 : Les structures chimiques des différents acides phénoliques (Anne-Laure, 2007)

2.2.2. Les tannins

Aujourd'hui, le terme est largement utilisé pour décrire un sous-groupe de composés phénoliques qui sont produits sous forme de métabolites secondaires, par une multitude d'espèces végétales diversifiées. Leur poids moléculaire est de plus de 500 Daltons, ils sont solubles dans l'eau avec la capacité de précipiter les protéines (Hagerman *et al*, 1998 ; Cowan, 1999 ; Toth et Pavia, 2001; Bennick, 2002 ; Koivikko *et al*, 2005 ; Koivikko, 2008).

- **Les tannins hydrolysables**

Les tannins hydrolysables sont des esters d'un sucre simple (glucose ou xylose principalement) et d'acides phénoliques. Ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique. Les acides phénoliques libérés sont l'acide gallique dans le cas des gallotannins et l'acide ellagique dans le cas des ellagitannins (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Derbel et Ghedira, 2005).

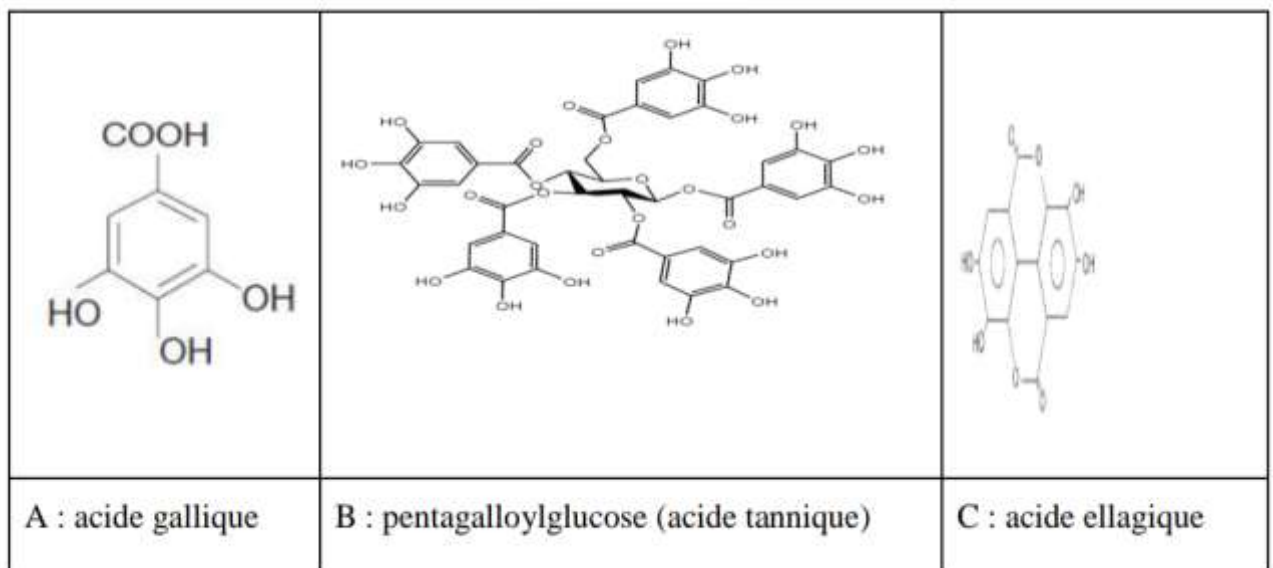


Figure6 : Structure de l'acide gallique (A), d'un exemple de tannins hydrolysables (B) et de l'acide ellagique (C) (Derbel et Ghedira, 2005 ; Nicholson et Vermerris, 2006).

- **Les tannins condensés**

Les tannins condensés sont des polymères d'unités flavaniques, le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8. Les précurseurs sont des flavan-3-ols (catéchine et épicatechine) et des flavan- 3,4 diols (Zimmer et Cordesse, 1996).

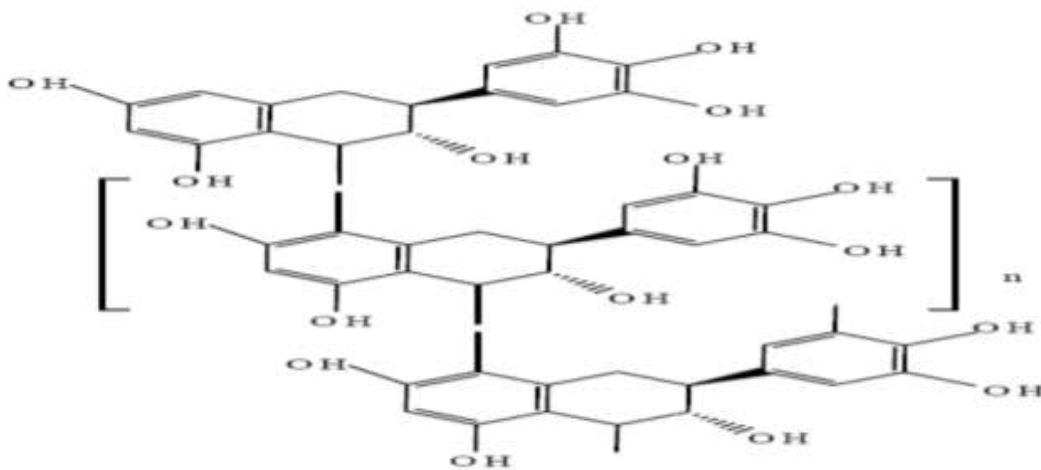


Figure7 : Exemple de structure d'un tannin condensé (Macheix *et al*, 2006).

2.2.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal (Ghedira, 2005), qui possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone constitués de deux cycles phényles, les cycles A et B, reliés par une chaîne à trois carbones (structure en C6-C3-C6). La chaîne en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisée pour former le cycle C (Bruneton, 1999).

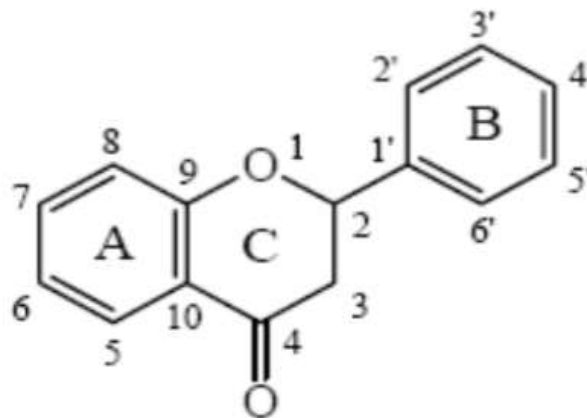
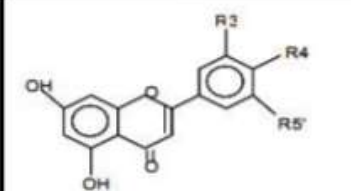
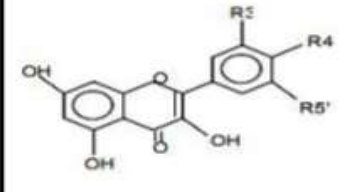
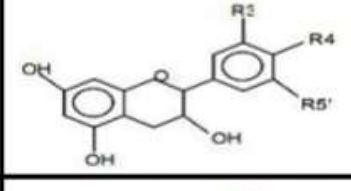
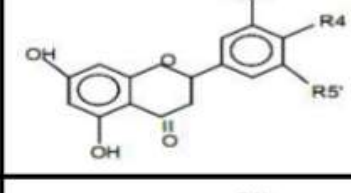
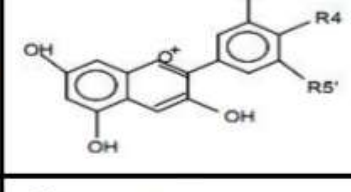
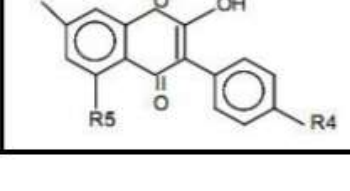


Figure8 : Structure de base des flavonoïdes (Saraf *et al*, 2007).

Des variations dans des modèles de substitution dans le cycle C a pour résultat les principales classes de flavonoïdes (les flavones, les flavonols, les flavanes, les flavanones, et les anthocyanidines). (Balasundram *et al*, 2006).

Des substituants des cycles A et B donnent naissance à des composés différents à l'intérieur de chaque classe de flavonoïdes. Ces substitutions peuvent impliquer l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation et la sulfatation (Balasundram *et al*, 2006).

Tableau IV : Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples (Aruoma *et al*, 2003).

Classes	Structure chimique	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

2.3. Activités biologiques des polyphénols

2.3.1. Activité antioxydante

Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement

tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert *et al*, 2005).

➤ Les Radicaux libres

• Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxyde ROO•, radical alkoxyde RO•), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyl OH•, monoxyde d'azote NO•, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet 1O_2 , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxyde d'azote $ONOO^-$ (Favier, 2003).

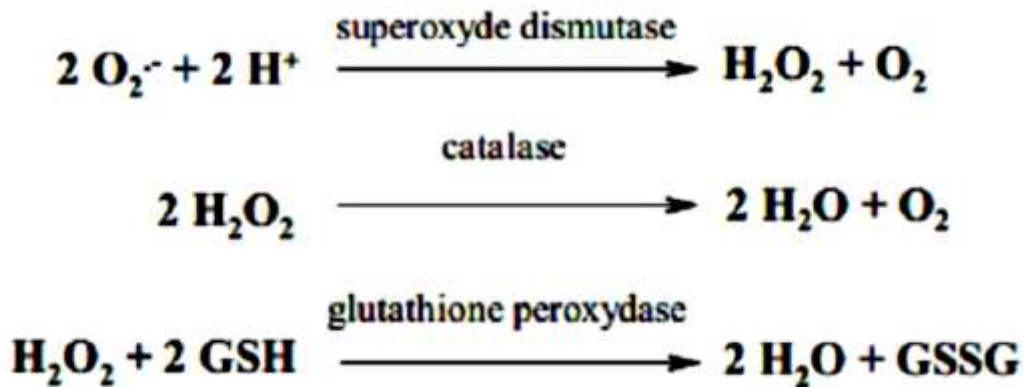
➤ Antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS.

Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

• Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (Favier, 2006). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

- **Les antioxydants secondaires**

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes. (Dacosta, 2003).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques...etc. (Kohen et Nyska, 2002).

2.3.2. Activité antimicrobienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes

hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

➤ **Les principales substances antimicrobiennes**

• **Les antibiotiques**

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des microorganismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

• **Les composés phénoliques**

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. Cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (Ulanowska *et al*, 2007).

Des flavonoïdes, une flavone et une flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montré comme possédant l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Wächter *et al*, 1999). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont été rapportés exhiber une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus* une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs (Valsaraj *et al*, 1997).

• **Autres activités des polyphénols**

➤ **Propriétés anti-inflammatoires**

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir de la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire de manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS (Oxyde nitrique synthase) responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est déclencheur chimique de l'inflammation (Lahlah, 2008). D'autres études, affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes, plus particulièrement la lutéoline, l'apigénine, catéchine sur la cyclo-oxygénase enzyme synthétiques des molécules impliquées fortement dans le processus inflammatoire (Gerotti, 2006).

➤ **Propriétés préventives des maladies cardio-vasculaires**

Les flavonols et les flavonoïdes sont à l'origine d'un effet cardioprotecteur via leurs effets antioxydants qui permettent une protection contre l'oxydation des LDL qui est l'un des facteurs clés du processus physiopathologique de l'athérosclérose ce qui limite leur incrustation dans les parois des artères qui contribue à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissu, également par l'inhibition de l'activité plaquettaire et leurs propriétés vasodilatatrices (Prior *et al*, 2001). L'action protectrice de l'acide gallique serait également due à son action antioxydante (piégeage des radicaux libres) (Priscilla *et al*, 2009). Le trans-resvératrol agit sur l'agrégation plaquettaire et la vasodilatation. En jouant sur le statut antioxydant, il régule par ailleurs l'expression génétique et mène à une diminution de la concentration totale en lipides (cholestérol et triglycérides) (Delmas *et al*, 2005).

➤ **Applications industrielles des polyphénols**

Grace aux propriétés biologiques qu'ils possèdent, les polyphénols, ont été exploitées, et utilisées dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique. Les propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavanols et les tanins, permettent de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (Daglia, 2012). La capacité antioxydante de composés comme les polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Les polyphénols sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés, d'arômes alimentaires, aussi ils rentrent dans la composition des produits pharmaceutiques et cosmétiques (Moure *et al*, 2001). Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, le principal responsable du SIDA (Sartori-thiel, 2003).

A horizontal orange scroll graphic with a gradient from light to dark orange. It has a white border and is decorated with scroll-like details at the top and bottom edges. The text is centered on the scroll.

Partie expérimentale

CHAPITRE III

Matériels et méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LBAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO) durant la période comprise entre Février et Juillet 2019. L'objectif de cette étude est l'évaluation des activités biologiques des composés phénoliques des margines et leur caractérisation physicochimique.

3.1. Matériel

3.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué de matériel végétal et de souches bactériennes.

Le matériel végétal

Les margines utilisées sont récupérées de différentes huileries à partir de cinq régions différentes : Azazga, Bouira, Tizirt, Oued aissi et Beni Yenni. Les margines sont conservées au congélateur jusqu'à utilisation.

Tableau V : Présentation du matériel végétal

Echantillons	Caractéristiques	Région	Système d'extraction
E1	Noir	OUED AISSI	Moderne
E2	Lisse, marron, homogène	TIGZIRT	Moderne
E3	Non homogène, non granuleux	AZAZGA	Moderne
E4	Noir, homogène	AZAZGA	Traditionnelle
E5	Lisse, homogène, noirâtre	AZAZGA	Traditionnelle
E6	Lisse, marron foncé, homogène	AZAZGA	Traditionnelle
E7	Marron, homogène	BEJAIA	Moderne
E8	Marron, odeur d'huile d'olive	BENI YENNI	Moderne
E9	Marron noirâtre	BENI YENNI	Moderne
E10	Marron, liquide	BOUIRA	Moderne

Les souches bactériennes utilisées :

Les souches utilisées dans notre étude microbiologique sont des souches de référence du laboratoire LBAB de l'UMMTO et deux SARM.

Tableau VI: Les souches bactériennes utilisées dans notre étude microbiologique

Groupes	Souches	Gram	Code
Souches de référence	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 25922
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923
	<i>Bacillus cereus</i>	Positif	ATCC 14579
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	ATCC 700603
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	LGA 251
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	MU 50

III.1.2. Appareillage :**Tableau VII:** L'appareillage utilisés lors de travail expérimental.

Appareil	Référence	Appareil	Référence
Spectrophotomètre UV-visible	Medline scientific limited	Balance de precision	Sartorius
Centrifugeuse Réfrigérée	Sigma 4-16k	Balance analytique	Denever instrument
Bain Marie	Memmert	Vortex	VELP scientifica, Heidolph
Autoclave de paillasse	Pbinternational	Agitateur magnétique	Labinco, Variomag poly 15 NETEZ
Etuve 37°C et 105°C	Binder,Memmert	Congélateurs	ENIEM
Four à moufle	Nabertherm Controller b170	Réfrigérateurs	Maxipower
pH mètre	Inolab Hanna Instrument	Rotavapor	Stuart

III.1.3. Petit matériel**Tableau VIII :** Le petit matériel utilisé lors de travail expérimental.

Verreries	Matériels en plastique	Autres
Erlenmeyer Fioles jaugées Tubes à essai Pipette pasteur Bécher Entonnoirs	Epindorpes Embouts Cuve de spectrophotomètre	Pinces Micropipette(1mL) Anses Papier Wattman Bec Bunsen Disques d'antibiotiques

III.1.4. Produits chimiques et milieux de cultures utilisés

Tableau IX: Les produits chimiques utilisés

Produits chimiques et réactifs	DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), A B T S (2,2-azini-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), ferrocyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$), persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), TCA (acide trichloroacétique, chlorure de fer ($FeCl_3$), folin-ciocalteu, acide gallique, acide ascorbique, DMSO
Solvants organiques	Acétate d'éthyle, éthanol, méthanol
Sels	Chlorure de sodium (NaCl), carbonate de sodium (Na_2CO_3), phosphate dissodique Na_2HPO_4 , phosphate dipotassium K_2HPO_4 .
Milieux de culture	BHIB (Brain Heart Infusion Broth), Gélose nutritive (GN), Mueller Hinton (MH)

3.2. Méthodes

3.2.1. Extraction des polyphénols :

L'extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle représente une alternative simple et efficace pour séparer les composés phénoliques des margines par rapport à d'autres méthodes.

L'acétate d'éthyle est confirmé être un solvant convenable pour la récupération des composés phénoliques contenus dans les margines (Visioli *et al*, 1999 ; Bcherrawi, 2000).

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée en mélangeant un volume de margines avec volume d'acétate d'éthyle (V/V). (Mettre dans des flacons teintés pour éviter l'oxydation).

Le mélange a été agité continuellement magnétiquement, puis laisser macérer. Procéder à une centrifugation. Une séparation en deux phases permet d'aspirer le surnageant d'acétate d'éthyle riche en polyphénols à l'aide d'une micropipette (filtration).

L'acétate d'éthyle est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un dépôt jaune foncé de polyphénols.

Enfin, le dépôt jaune est subdivisé en 2 volumes dont l'un est récupéré par le DMSO tandis que l'autre est récupéré dans le méthanol à l'aide d'une micropipette.

3.2.2. Dosage des composés phénoliques totaux (CPT) par la méthode de colorométrie

La teneur en composés phénoliques des différents extraits de margine a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon Singleton et Rossi, (1965). Elle 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. Deux essais ont été réalisés.

La concentration en composés phénoliques d'extrait est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.

Protocole :

Préparation d'un volume à partir de chaque extrait ou dilution et un volume d'eau distillée sont ajoutés puis additionné à un volume du réactif de Folin-ciocalteu. Après 6min, un volume de la solution Na_2CO_3 à 7% est ajouté. Le volume total agité puis ajusté à 3 mL avec l'eau distillée. Les absorbances sont mesurées à 760nm après incubation pendant 1h à l'obscurité.

La concentration des CPT est déterminée à partir d'une courbe (étalon) en utilisant l'acide gallique comme standard.

- **Expression des résultats**

La teneur en polyphénols a été déterminée par la formule suivante :

$$T = C * V * D / P_s$$

- T : teneur en phénols totaux.
- C : concentration des polyphénols en équivalent d'acide gallique déduit de la courbe.
- V : Volume de l'extrait.
- D : facteur de dilution.
- P_s : poids de la matière sèche

3.2.3. Caractérisation physico-chimique des margines

Plusieurs méthodes physicochimiques ont été employées pour caractériser les margines étudiés. Deux essais ont été réalisés pour chaque test.

Détermination de la teneur en eau et de la matière sèche totale (MS). La matière sèche (MS) est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines (Aissam, 2003).

Elle est déterminée selon le protocole suivant :

- Sécher des capsules en porcelaine vides à l'étuve.
- Tarer les capsules après refroidissement dans un dessiccateur.
- Introduire dans chaque capsule un volume de margine, et les placer dans l'étuve.
- Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur et après refroidissement les peser.
- L'opération est répétée jusqu'à obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à 30min pour éviter la caramélisation).

-La teneur en matière sèche est déterminée par la formule suivante

$$MS = (M2 - M0) \times 100 / TE$$

- **M0** : Masse de la capsule vide (g/l).
- **MS** : Teneur en matière sèche (g/l).
- **M2** : Masse de la capsule et des margines après séchage (g).
- TE** : Teneur en eau (%).

- **Détermination de la teneur en eau :**

La teneur en eau ou humidité, est la proportion effective d'eau contenue dans. Elle est exprimée par la formule ci- dessous :

$$TE = (M1 - M2) \times 100 / M1 - M0$$

TE : Teneur en eau (%)

M1 : Masse de la capsule et les 10 ml de margine avant séchage(g).

M0 : Masse de la capsule vide(g).

- **La teneur en cendre et en matière organique**

Pour les margines, elle est déterminée par incinération de la matière sèche obtenue à 550 °C dans un four à moufle pendant 5h.

Mode opératoire

- On met les échantillons dans des capsules en porcelaine.
- On place les capsules dans un four à moufle jusqu'à obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre.
- On retire les capsules de four, on les met dans un dessiccateur pour se refroidir et puis on procède à la pesé.

La teneur en matière organique est calculée comme suit

$$\text{MO}\% = 100 - \text{TC}\%$$

MO : matière organique

TC% : teneur en cendres

La teneur en cendre représente la fraction minérale des margines. Elle est donnée par la formule suivante :

$$\text{TC} = \frac{\text{mc}}{\text{v}} * 1000 \text{g/l}$$

mc : masse en cendres utilisées

v : volume prise d'essai

- **Détermination du pH**

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre.

Mode opératoire

- Placer un volume de margines dans un bécher.
- Agiter magnétiquement pour bien homogénéiser.
- Procéder à la détermination de pH en prenant soin que l'électrode soit complètement immergée dans la solution.

La valeur du pH est lue directement sur le pH-mètre.

3.2.4. Tests de l'activité antioxydante

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des composés phénoliques des margines étudiées trois tests *in vitro* en duplicata ont été réalisés pour chaque échantillon (le test de DPPH, du pouvoir réducteur FRAP et le test de réduction du radical ABTS).

❖ Test de pouvoir réducteur FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur des extraits phénoliques est basé sur la réduction de Fe^{3+} présent dans le complexe $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ en Fe^{2+} en présence d'un antioxydant qui possède le pouvoir de céder des électrons. L'absorbance de milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation de pouvoir réducteur des composés testés.

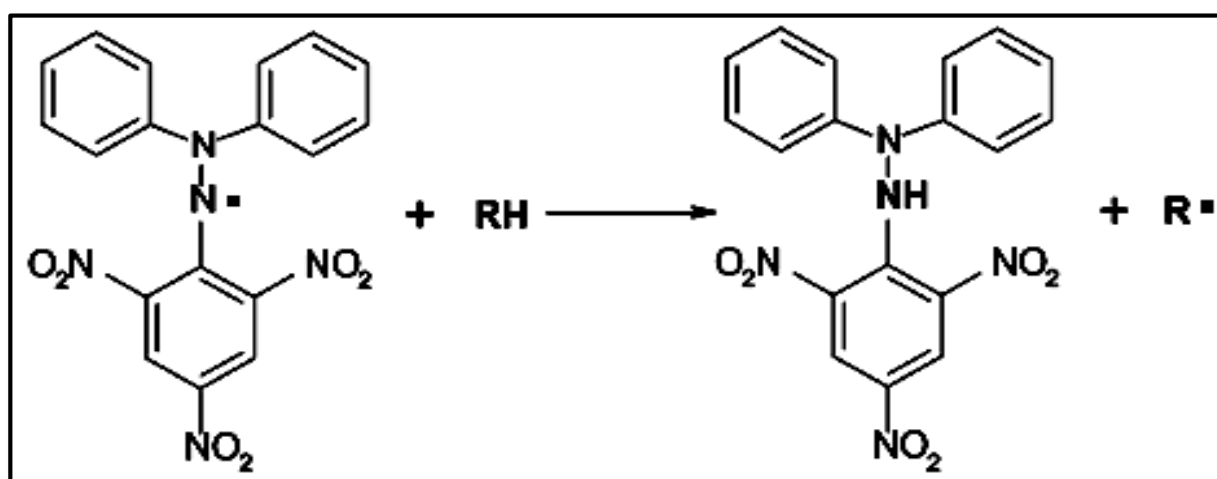
Mode opératoire

Le protocole expérimental suivi est celui d'Ouyaizu (1986) avec une petite modification. Un volume des extraits phénoliques de différentes concentrations ont été mélangés avec un volume de tampon phosphate (pH=6.6) et un volume de ferrocyanure de potassium $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ (1%). Le mélange obtenu est incubé à 50°C pendant 20mn ensuite un volume de l'acide trichloracétique (10%) est ajouté. Le mélange subit une centrifugation. Le surnageant est récupéré ; un volume de ce dernier est mélangé avec le même volume de l'eau distillé et un volume d'une solution de FeCl_3 à 0,1%.

❖ **Méthode de DPPH** (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

L'activité anti-radicalaire des composés ph

énoliques contenus dans les extraits préparés est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2'- diphényl-1-picrylhydrazyl). Ce dernier est stable au cours de temps et possède un électron non apparié sur un atome d'azote ce qui lui confère la capacité de produire des radicaux libres donnant à la solution une couleur violette foncée (Cotelle *et al*, 1996 ; Trouillas *et al*, 2003). En présence d'un antioxydant le radical DPPH est réduit formant ainsi un produit stable de couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 517 nm (Maataoui *et al*, 2006).

Radical DPPH[•]

DPPH

Figure 9 : Structure du DPPH[•] et sa réduction par l'antioxydant RH (Paixao *et al*, 2007).

L'acide ascorbique à différentes concentrations a été utilisé comme standard.

❖ **Mode opératoire**

Le protocole expérimental utilisé est celui de Brand-Williams *et al*, 1995. La solution du DPPH est préparée par solubilisation du DPPH dans l'éthanol. Un volume des solutions d'extraits phénoliques ou standards sont ajoutés à 1mL de DPPH. Après homogénéisation au vortex le mélange est laissé à l'obscurité. Les absorbances sont lues à 517nm. Les témoins positifs sont représentés par une solution d'acide gallique et une solution d'acide ascorbique comme antioxydants standards. Les concentrations des composés phénoliques utilisés varient selon les extraits. Pour exprimer les résultats obtenus, on calcule le pourcentage d'inhibition qui

correspond au pourcentage de DPPH• qui a été inhibé par les antioxydants présents dans les échantillons testés selon la formule proposée par Yen et Dhu, (1994) :

$$\% \text{ DPPH inhibé} = \frac{\text{Absorbance blanc} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance blanc}} \times 100$$

❖ **Piégeage des radicaux libres par le test ABTS (2,2- azini-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)**

La formation du radical cation l'ABTS^{•+} résulte de l'arrachement d'un électron de l'un des atomes d'azote de la molécule ABTS par un oxydant (le persulfate de potassium).

En présence d'antioxydants donneurs de protons, ce radical l'ABTS^{•+} de coloration bleu-vert est réduit en ions ABTSH⁺ incolore. Le suivi de cette décoloration à 734 nm permet d'évaluer le potentiel anti-radicalaire de l'extrait (Re *et al*, 1999).

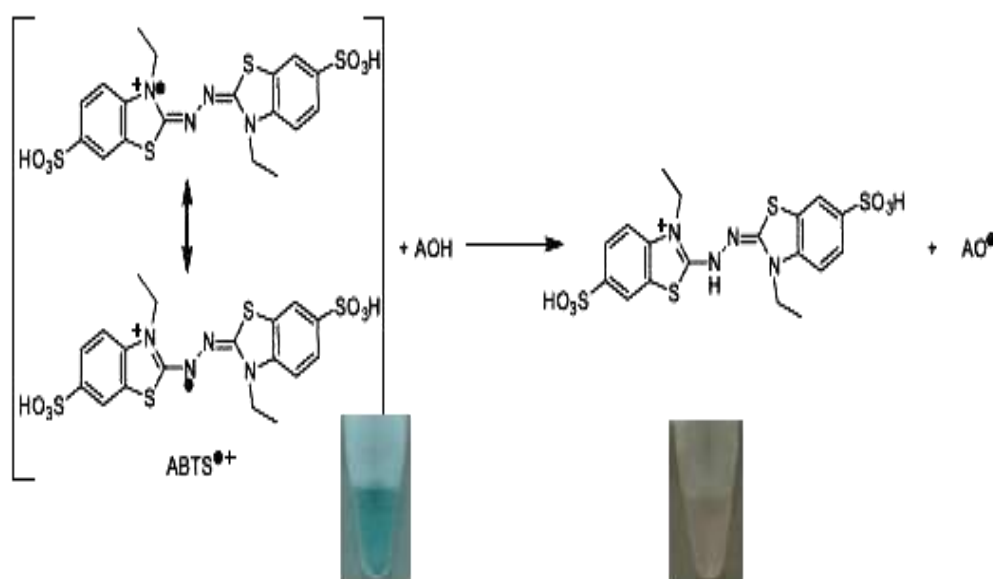


Figure10 : Processus de réduction du radical ABTS^{•+} en présence d'un antioxydant (Re *et al*, 1999)

Protocole

Le test ABTS a été réalisé selon la méthode de (Re *et al*, 1999).

Une solution ABTS à une concentration de 7mM est préparée dans de l'eau déminéralisée qu'on mélange avec une solution de persulfate de potassium d'une concentration de 2,45 mM dans de l'eau déminéralisée. Laisser reposer à température ambiante dans l'obscurité de 12 à 16 heures. La solution de l'ABTS^{•+} est diluée dans l'éthanol afin d'avoir une absorbance de 0,70 (± 0,02) à 734 nm. Un volume d'extrait est ajouté à un volume de la solution ABTS. Le mélange est incubé pendant 6 min à l'obscurité puis les absorbances sont mesurées à 734 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard. Pour déterminer les IC₅₀, différentes concentrations d'extrait ont été testées.

Le pourcentage de réduction du radical ABTS^{•+} a été calculé par la loi suivante :

$$\% \text{ ABTS}^{+}\text{inhibé} = \frac{\text{Absorbance blanc} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance blanc}} \times 100$$

3.2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de margine, la méthode de diffusion sur milieu gélosé a été réalisée en utilisant les disques stériles, appelée antibiogramme (Somaie *et al*, 2013).

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet antimicrobien des différents extraits sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition.

Le choix de ces souches est en fonction de leur différence pariétale (Gram + et Gram -), leur pathogénicité et de leur résistance naturelle aux antibiotiques

➤ Préparation de pré culture

Les souches bactériennes sontensemencées dans la gélose nutritive par la méthode de stries et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser la croissance et avoir des cultures jeunes de 18 heures à 24 heures.

➤ **Standardisation et préparation de l'inoculum**

On prélève à l'aide d'une anse a boucle de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à une DO de 0.08 à 0.10(10^8 UFC) à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

➤ **Aromatogramme**

Pour ensemer les boites de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton, un ensemencement par écouvillonnage est réalisé. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boite de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur tout le contour de la surface gélosée. Les disques imprégnés d'un volume précis d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. La Triméthoprime Sulfaméthoxazol est utilisée comme témoin positif pour les souches de références et Chloramphénicol, des disques imprégnés du même volume précédent de DMSO ont servi de témoin négatif. Finalement, les boites de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C .

➤ **Lecture des aromatogrammes**

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibition au tour des disques. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits (Ponce *et al*, 2003).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre $< 8\text{mm}$.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre $> 20\text{mm}$.

CHAPITRE VI

Résultats et discussions

4.1. Extraction

Après la réalisation de l'extraction, nous avons obtenu des extraits de couleurs et odeurs bien distinguées.

4.2. Teneur en polyphénol totaux

La mesure de l'absorbance d'une solution d'acide gallique, comme standard, à différentes concentrations, nous a permis de tracer une courbe d'étalonnage. L'analyse quantitative des polyphénols est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimée en mg d'acide gallique par g de matière sèche, en utilisant l'équation de type : $y=0,0042x$, $R^2=0,999$.

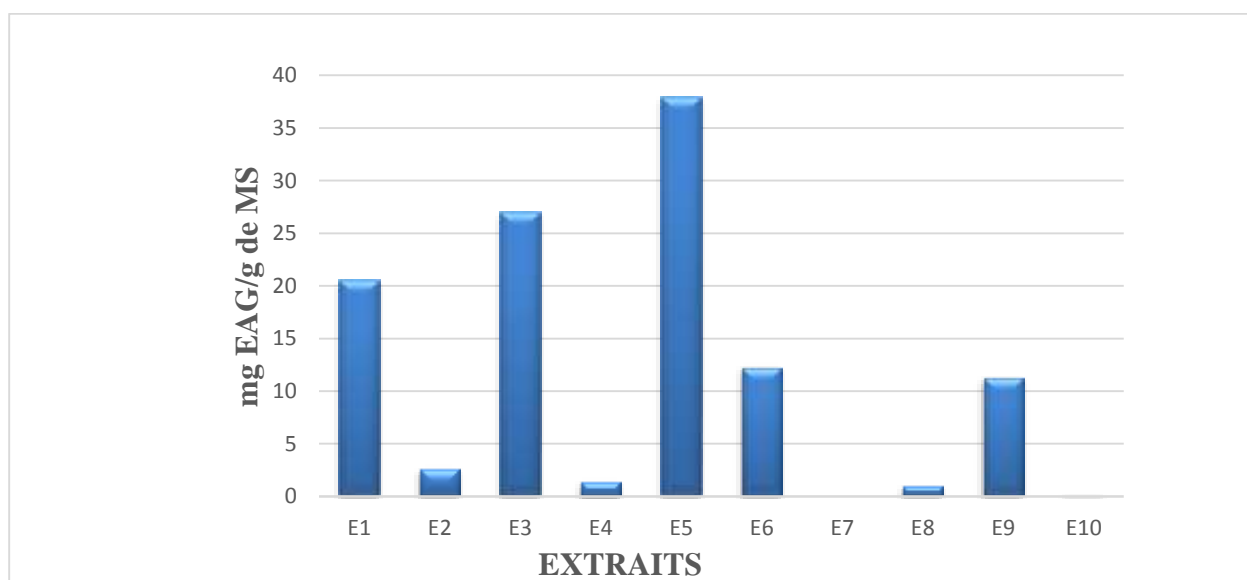


Figure 11: Diagramme représentant la teneur en polyphénols totaux de dix extraits.

D'après la figure ci-dessus, on peut déduire que la valeur supérieure est celle obtenue en huilerie traditionnelle de l'ordre de 38,38 mg EAG/g de MS par rapport aux autres valeurs issues en système traditionnel ayant les valeurs respectivement 19,1 mg EAG/g de MS et 3,01 mg EAG/g de MS.

Ces valeurs sont supérieures à celles de margines marocaines de la région de Marrakech rapportées par El hadjouji *et al*, (2008) qui sont de l'ordre de 0,7 g/l.

Par ailleurs, la teneur en composés phénoliques de margines issues par Almi, (2010) qui était de l'ordre de 2,63g/kg est beaucoup plus faible que celles de nos résultats correspondants à

(20,6) ;(25,9) ; (4,44) mg EAG/g de MS par ordre (provenant d'une huilerie moderne) et très proche de l'extrait E2 voire même identique ayant une TPP de (2,64) mg EAG/g de MS.

Ait Baddi *et al*, (2008), ont démontré que l'acétate d'éthyle exerce lui aussi un haut pouvoir d'extraction des polyphénols de margines. Il contribue aussi à l'élimination des fractions protéiques, glucidiques et acides organiques qui peuvent interférer avec l'extrait phénolique.

Pour les autres extraits, l'extrait E7 présente la fraction polyphénolique la plus faible avec une teneur de (0,37) mg EAG/g de MS par rapport à celles issues de l'extrait 8 (E8) et l'extrait 10 (E10) avec des teneurs de (6,71) et (0,68) mg EAG/g de MS par ordre.

Cette variation de la teneur en PPT des margines dépend de plusieurs facteurs lesquels pourrait être les suivants :

- La différence entre les méthodes utilisées pour extraire les PPT de margines (rapport V/V, type de solvant)
- La température des olives avant et durant le broyage influence sur la solubilisation des polyphénols (Caponio et Catalano, 2001) ;
- La variété de l'olivier, les conditions de culture et le degré de maturation des olives (Ziogas *et al*, 2010) ;
- Les procédés technologiques utilisés pour séparer la phase aqueuse (margine) de la phase huileuse ;
- Le procédé de trituration, l'âge des margines, le procédé d'extraction et les techniques d'analyse qualitative et quantitative des monomères phénoliques (Hamdi, 1996; Demaroc *et al*, 2007) .

4 .3. La teneur en eau

La détermination en eau a donné un taux d'humidité allant de 81,7% à l'exception de E10 dont sa teneur en eau est caractérisée par 8,1%.

Ces valeurs se rapprochent des valeurs trouvées par Ait ameur et Bouzidi, (2013) qui sont de l'ordre de 88,73 % pour les margines traditionnelles et 91,95% pour les margines modernes.

Les taux d'humidité élevées de margines s'expliquent par l'eau existant dans les olives d'une part et d'autre part par l'eau rajoutée au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive (Procida et Ceccon, 2006).

En outre, des teneurs en matière sèche sont proches de 2,1g/10ml à 18,8g/10mL à l'exception de E10 représentant une matière sèche de 89,9g/10mL.

La teneur en MS est influencée par les procédés d'extraction mis en œuvre, la maturité

des olives, les conditions édaphiques (caractéristiques du sol) et climatiques.

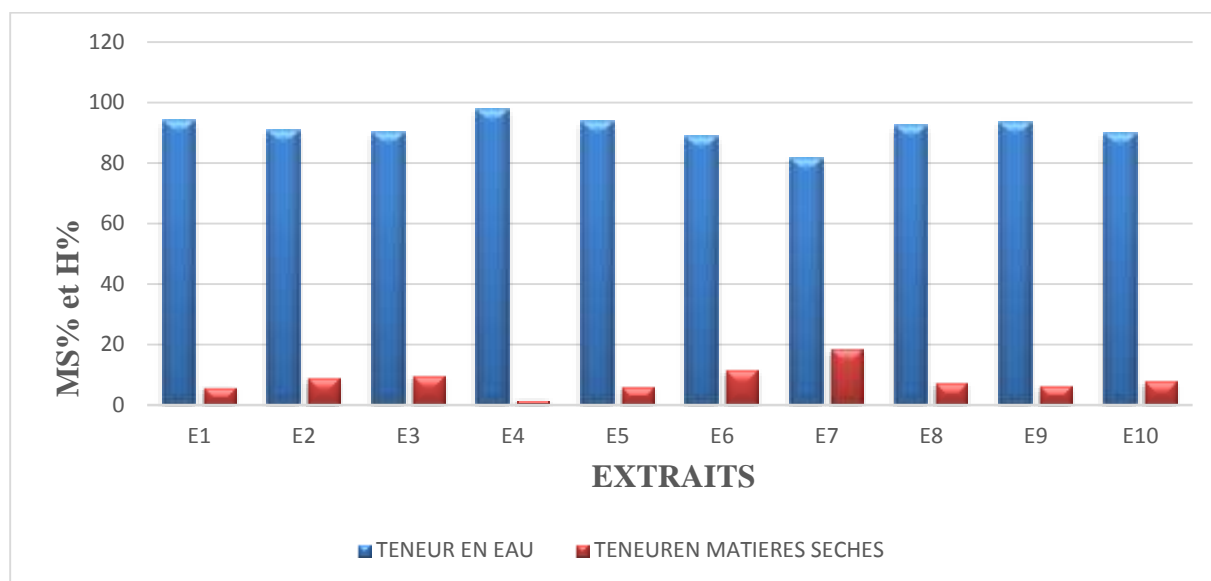


Figure 12 : Teneur en eau et en matière sèche des margines.

IV.4. Teneur en cendres

Le pourcentage en cendres totales permet d'informer sur la teneur en minéraux, ces derniers n'étant pas transformés en substances volatiles à haute température, contrairement aux matières organiques. D'après la figure précédente, la teneur en cendre totales a été évaluée à 1,01-17,48% pour le système d'extraction traditionnel tandis qu'elle est de l'ordre de 0,72-9,11% pour le système d'extraction moderne.

Ces résultats révèlent que le système d'extraction affecte la teneur en cendre des margines.

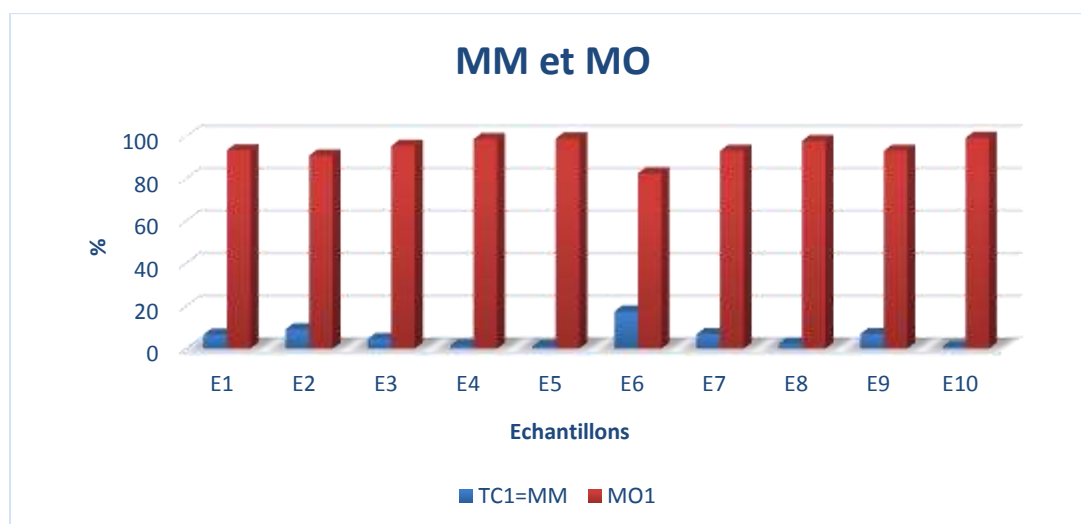


Figure13 : Teneur en cendres et en matière minérale.

IV.5. pH

Le pH est un critère de qualité, il est en fonction de la qualité d'acides ionisables qu'il renferme (ions H⁺) ainsi que sa composition minérale.

Les valeurs de pH des margines analysées sont comprises entre 3,7 et 4,93.

La valeur maximale est attribuée à E4 et la valeur minimale est attribuée à E7.

D'après les résultats on constate que les valeurs trouvées sont proches de celle étudié par Eroglu *et al.*, (2008).

Cependant l'acidité des margines est liée à la durée de leur stockage dans les bassins de stockages. Ceci peut être expliqué aussi par des réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques (Hamdi, 1991). Ces réactions se manifestent par un changement de la coloration initiale des margines vers une couleur noire très sombre (Assas *et al.*, 2002).

Les résultats de pH sont illustrés dans le tableau ci-après :

Tableau X: Valeurs de pH de chacun des extraits

Extraits	Valeur de pH
E1	4,86
E2	4,6
E3	4,2
E4	4,93
E5	4,5

E6	4,39
E7	3,7
E8	4,2
E9	4,56
E10	4,51

IV.6. Activité antioxydante

IV.6.1. Test de FRAP :

L'activité antioxydante de tous les extraits de margines a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power). Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Elle est universelle peut être appliquée aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (Li *et al*, 2008).

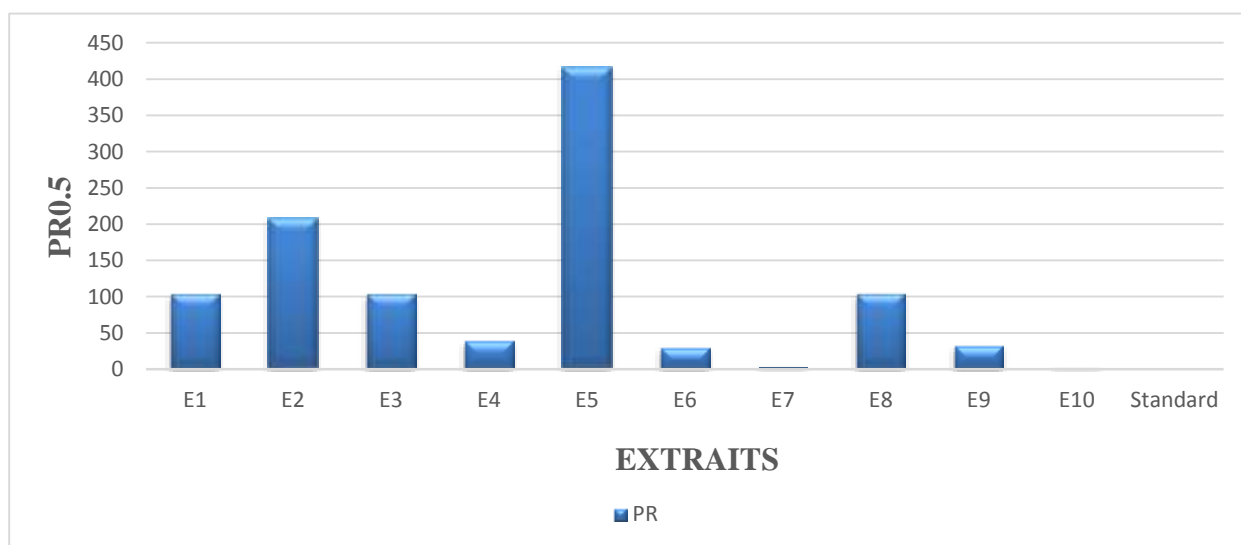


Figure14 : Diagramme représentant le PR_{0,5} en fonction des différents extraits.

De part de tableau on remarque que tous les extraits possèdent un potentiel réducteur plus important même supérieur à celui de standards déterminés par des valeurs de PR_{0,5} inférieures à celle de l'acide ascorbique (58,13 µg/ml). Il apparaît clairement que les extraits des différents margines étudiés présentent des pouvoirs réducteurs plus importants. On

pourrait expliquer cet écart par la variation des composés phénoliques présents dans chaque extrait

IV.6.2. Test de DPPH :

Le test de DPPH a permis de mettre en évidence une activité antioxydante appréciable de la plante étudiée.

Cette activité dépasse pour certains extraits (E1 : 529,94 μ g/ml ; E3 : 120,75 μ g/ml ; E8 : 268,59 μ g/ml et E9 : 414,76 μ g/ml) l'activité de l'acide ascorbique, considéré comme un puissant antioxydant.

On constate également que la majorité des extraits renferment des propriétés antiradicalaires intéressantes qui se manifestent avec des valeurs faibles des IC50, dues à leurs capacités de céder des électrons pour réduire le radical DPPH.

Toutes les valeurs des IC50 des différents extraits (E2 : 39,34 μ g/ml ; E4 : 55,22 μ g/ml ; E5 : 25,62 μ g/ml ; E6 : 9,98 μ g/ml ; E7 : 0,817 μ g/ml ; E10 : 12,55 μ g/ml) sont inférieures à celles marquées par l'acide ascorbique (86,65 μ g/ml) dont la plus faible est caractérisée par l'extrait(E7).

D'après les résultats, les margines possèdent un pouvoir antioxydant non négligeable (Benavente-Garcia *et al*, 2000 ; Savournin *et al*, 2001).

Ceci montre que les extraits E2, E4, E5, E6, E7 et E10 ont une capacité réductrice supérieure de l'acide ascorbique à l'exception des extraits E1, E3, E8, E9 qui ont une valeur supérieure à celle du standard dont la plus élevée est marquée par E1 (530,23 μ g/ml), donc ils présentent une faible activité.

Les écarts entre les IC50 des différents extraits sont probablement liés à la différence du profil phénolique qui varie en fonction de l'extrait, de la méthode d'extraction des composés phénoliques et de la polarité des solvants utilisés.

Ces résultats de l'activité antioxydante des extraits phénoliques peuvent s'expliquer par la différence de la composition en polyphénols de ces extraits. En effet, la capacité de réduction des radicaux est largement influencés par la composition phénolique de l'échantillon. (You-Cheng Hseu *et al*, 2008).

Les valeurs des concentrations des IC50 sont rapportées dans la figure suivante :

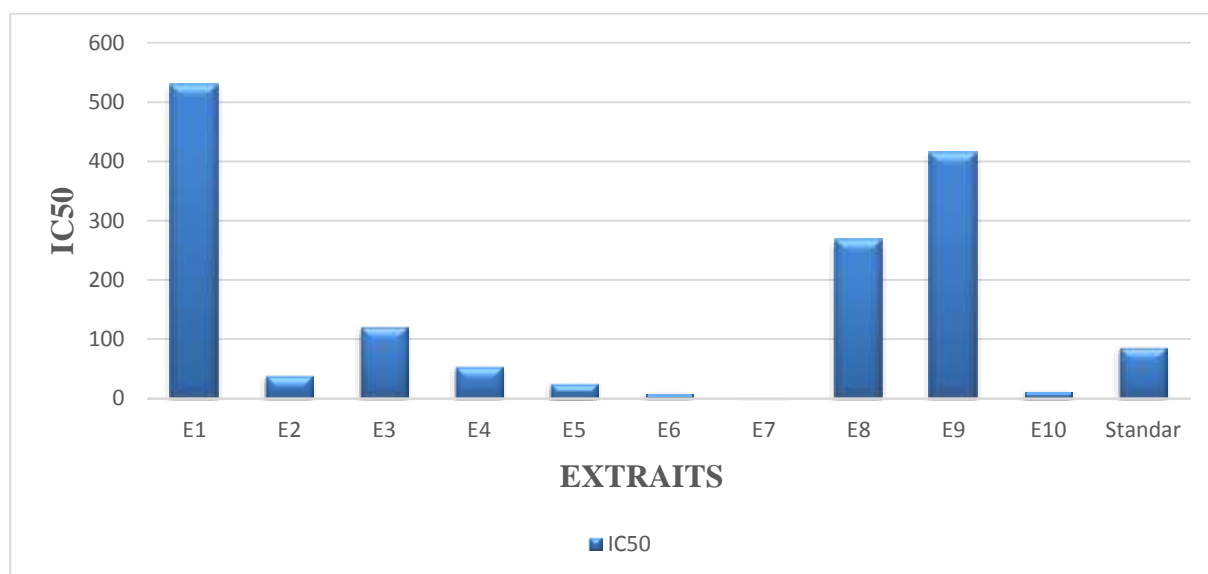


Figure 15 : Diagramme représentant l'IC50 des différents extraits

4.6.3. Evaluation de l'activité antioxydante par le test ABTS :

Cette méthode repose sur la réduction de radical cationique ABTS^{•+} par un atome d'hydrogène ou un électron provenant d'un antioxydant, entraînant une décoloration de milieu réactionnel, estimée par spectrophotométrie à 734nm. La valeur IC50 désigne la concentration de polyphénols nécessaires pour inhiber 50% de radical ABTS^{•+}. Elle est calculée à partir de l'équation de régression linéaire des pourcentages d'inhibitions en fonction de la concentration des composés phénoliques testés. Une valeur faible d'IC50 indique une activité antioxydante forte.

D'après les résultats obtenus, les valeurs des IC50 des différents extraits (E1 : 136.075 µg/ml, E3 : 44.24 µg/ml, E4 : 110.51 µg/ml, E8 : 40.81 µg/ml, E9 : 73.15 µg/ml et E10 : 14.83 µg/ml) sont supérieures à celle marquée par l'acide ascorbique (14.49 µg/ml) respectivement.

Donc on peut constater que les extraits cités ci-dessus possèdent une capacité antioxydante faible par rapport à celle du standard indiqué par l'acide ascorbique (14.49 µg/ml) où la plus faible capacité réductrice a été montrée par l'E1 (136.075 µg/ml) comparée à celle du standard (acide ascorbique 14.49 µg/ml).

Tandis que les extraits (E2, E5, E6, E7) possèdent les valeurs IC50 comme suit : 13.02 µg/ml ; 9.55 µg/ml ; 6.59 µg/ml ; 4.52 µg/ml) par ordre.

Ces derniers ont montré une activité anti oxydante très élevée où la meilleure activité est caractérisée par E7 (4.52 $\mu\text{g/ml}$) avec une activité anti oxydante (4.52 $\mu\text{g/ml}$).

Beretta *et al*, (2005) et Blasa *et al*, (2007) ont montré que la variation de l'activité antioxydante est due à la qualité des composés phénoliques responsables de cette activité.

L'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (Ksouri *et al*, 2009). Dans ce travail, nous avons utilisé trois méthodes pour évaluer l'activité antioxydante in vitro des extraits étudiés à savoir ABTS, DPPH et FRAP. Ces tests ont été choisis parmi les tests les plus cités dans la littérature car ils sont faciles à effectuer et aussi la présence des réactifs au laboratoire

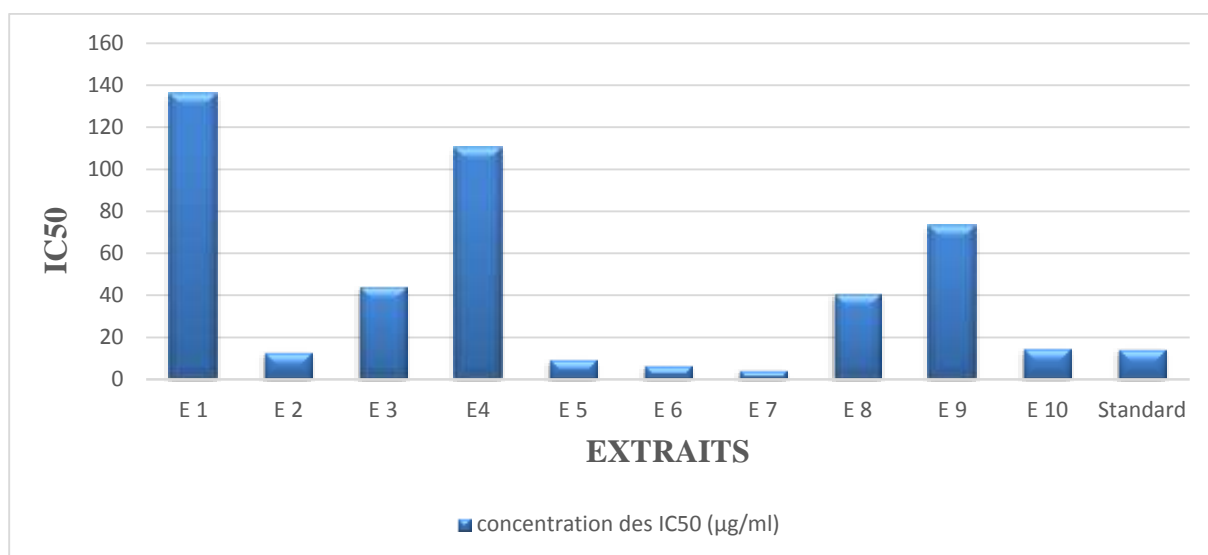


Figure 16: Diagramme représentant les IC50 des différents extraits

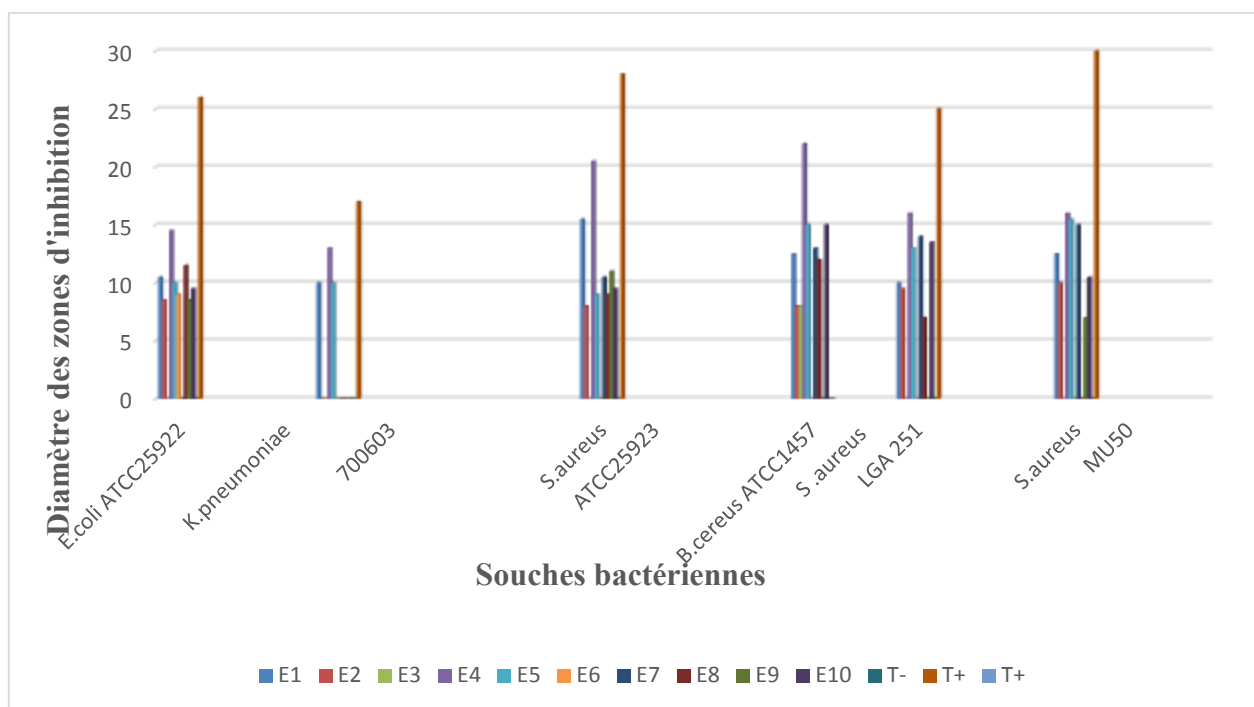


Figure17 : Des diamètres des zones d'inhibition en (mm) résultants des souches testées.

4.7. Evaluation de l'activité antibactérienne

4.7.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur milieu solide

Ce test vise à mettre en évidence la présence ou l'absence d'une activité antibactérienne des différents extraits étudiés vis-à-vis des les souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*. Le degré de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne aux composés contenus dans les différents extraits est estimé par le diamètre de la zone d'inhibition. Les diamètres des zones d'inhibitions exercées par les extraits phénoliques étudiés sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XI : Diamètres de zones d'inhibition en mm exercées par les extraits phénoliques étudiés sur les différentes souches utilisées

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	T+	T-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10,5	8,5	0	14,5	10	9	0	11,5	8,5	9,5	26	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10	0	0	13	10	0	0	0	0	7,5	17	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15,5	8	0	20,5	9	0	10,5	9	11	9,5	28	0
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	12,5	8	8	22	15	0	13	12	0	15	0	0
<i>S. aureus</i> LGA 251	10	9,5	0	16	13	0	14	7	0	13,5	25	0
<i>S. aureus</i> MU 50	12,5	10	0	16	15,5	0	15	0	7	10,5	30	0

T+ : Triméthoprim Sulfaméthoxazole comme témoin positif

T- : DMSO

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition que les zones d'inhibition sont très variables.

D'après les résultats illustrés (**tableau XI**) on remarque qu'il existe des variations de sensibilité des bactéries testées selon les extraits :

E. coli ATCC 25922 présente des zones d'inhibition entre 8,5 et 14,5 mm, étant donné qu'elle est résistante vis-à-vis les extraits E3 et E7.

K. pneumoniae ATCC 700603 étant résistante vis-à-vis les extraits E2, E3 et de E6 jusqu'à E9 respectivement, tandis qu'elle présente une sensibilité vis-à-vis E1 (10 mm) E5 (10 mm) et E10 (7,5 mm) avec une sensibilité plus importante vis-à-vis de E4 avec un diamètre d'inhibition de 13 mm

On remarque que les bactéries à Gram+ sont plus sensibles par rapport aux bactéries Gram- en vue des extraits présentant une sensibilité vis-à-vis de ces bactéries. Les bactéries à Gram+ sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques, cela est dû principalement aux peptidoglycanes constituant la paroi. En effet, les bactéries perdent leur rigidité et se lysent sous leur pression osmotique interne qui rompt leur membrane cytoplasmique (Athamena *et al*, 2010).

S. aureus ATCC 25923 présente une sensibilité vis à vis tous les extraits avec un diamètre d'inhibition qui varie entre 8 mm et 15,5 mm avec un diamètre élevé de 20,5 mm ; à l'exception de E3 et E6 ayant une résistance vis-à-vis *S. aureus*.

Il s'avère que les diamètres d'inhibition vis-à-vis la souche *B. cereus* ATCC 14579 sont de l'ordre de 8 mm jusqu'à à 22 mm à l'exception de E6 et E9 qui présentent une résistance.

Enfin, nous avons noté de bonnes zones d'inhibition concernant les deux souches SARM (*S. aureus* MU 50 et *S. aureus* LGA 251) utilisées avec des diamètres d'inhibition qui varient entre 7 mm et 16 mm pour certains extraits comparativement aux autres qui présentent une résistance vis-à-vis de cette souche.

Selon Shan *et al*, (2007), la membrane des bactéries Gram positif peut être traversée facilement par les polyphénols qui peuvent atteindre leur site d'action. En effet, il a été démontré que les PP détruisent la membrane plasmique, détériorent la force motrice des protons et le mouvement des électrons active le transport des contenus cellulaires.



Conclusion

Cette étude avait pour objectif la caractérisation physicochimique et microbiologique des margines. Notre étude a été consacré au dosage d'un antioxydant (polyphénols) des margines, suivie par l'évaluation de leurs activité antioxydante. La quantification des CP d'extraits de margines a permis de mettre en relief la richesse de certains extraits en CP.

Les CP de l'olivier, qui se partagent entre l'huile et les margines durant le processus de l'extraction de l'huile d'olive pourraient constituer des substances à valoriser. Particulièrement, les margines connues sous le nom de déchet oléicole, pourraient constituer une source riche en molécules phénoliques actives. Ce qui permettrait à certain degré de palier au problème de pollution de l'environnement causés principalement par les CP difficilement dégradables par les microorganismes.

Les extraits de margines ont une efficacité très marquée vis-à-vis des bactéries Gram- et Gram+.

En outre, la sensibilité de bactéries est influencée par le type d'extrait et la concentration en PPT déposée dans le disque. Dans la mesure où certains polyphénols des margines sont biologiquement actifs, la mise en œuvre de techniques de valorisation de ces effluents serait d'une grande importance. Dans cet égard, plusieurs techniques ont été développées.

Les études expérimentales menées dans le laboratoire ont montré la forte richesse en polyphénols des margines que nous avons testé. Ainsi, les recherches vont être poursuivies afin d'extraire ces composés d'intérêts et d'effectuer des tests biologiques pour prouver leurs activités et les valoriser.

Références bibliographiques

- **Abbassi E. A., Kiai H et Hafidi A, (2012).** Profil phénolique et activités antioxydantes de l'eau de lavage des moulins à huile. *Chimie alimentaire*. 132:406-412p
- **Abdulmajed K., McGuigan C et Heard C. M, (2005).** Délivrance topique d'ascorbate de rétinyle: 4. Activité anti-oxydante comparée aux services DPPH. *Radic gratuit. Res.*39: 491-498p.
- **Achak A., Ouazzani 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. *Eau*. 21: 53-57p
- **Ahmad N., Fazal H., Abbasi B. H., Anwar S et Basir A, (2012).** Activité de piégeage des radicaux libres DPPH et différence phénotypique dans la plante hépatoprotectrice (*Silybummarianum L.*). *Toxicol. Santé ind* .
- **Aissam H., (2003).** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed ben abdellah (Maroc). Fès, 94p.
- **Aissam H., Errachidi F., Merzouki M et 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: 23-30p.
- **Ait ameur S et Bouzidi F, (2013).** Etude de quelques paramètres physicochimiques et microbiologiques des margines issues de deux systèmes d'extraction d'huile d'olive : système de presse (traditionnel) et système de centrifugation à tri phases (moderne). Mémoire d'ingénieur. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Algérie.
- **Ait baddig., Cegarra J., Marlina G., Revel J.C. et Hafidi M, (2008).** Évolution qualitative et quantitative des composés polyphénoliques lors du compostage d'un mélange de paille des eaux usées d'un moulin à huile. *Journal des matières dangereuses*. Article sous presse
- **Almi D, (2010).** Etude du pouvoir antioxydant des composés et extraits phénoliques issus des olives et sous-produits de l'olivier (feuilles et margines) variété Chemlal sur l'oxydation thermique simulant la friture de deux huiles à large consommation : huile d'olive et huile de tournesol. Mémoire de magister en science biologiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- **Amaral Carla., Marco S., Lucas.Joa-o Coutinho., Antonio L., Crepspi., Maria do rosa 'Anjos A. et Celia pais B,(2008).** Caractérisation microbiologique et physico-chimique des eaux usées d'un moulin à huile provenant d'un moulin à huile continu dans le nord-est du Portugal. *Bioresource Technology*.9, 7215-7223.

- **Aruoma O.I., Bahorun T. et Jen L.S, (2003).** Neuroprotection par des composants bioactifs dans des extraits de plantes médicinales et alimentaires. Recherche par mutation. 544, 203-21.
- **Asses .N ., Ayed L ., Bouallagui H ., Ben Rejeb I ., Gargouri M et Hamdi M, (2009).** Utilisation de *Geotrichum candidum* pour le traitement des eaux usées des moulins à huile en culture immergée et statique. Bioresource. Technology. 100 (7): 2182–2188p.
- **Athamena S ., Chalghem1 I ., Kassah-laouar A ., Khebri S et Laroui S, (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extrait de *Cuminumcyminum* 1. Lebanese Science Journal . Vol :11-13p.
- **Balasundram N., Sundram K et Sammam S, (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry. . 99:191-203p.
- **Bcherrawi N, (2002).** Extraction des polyphénols des margines. Mémoire de fin d'études d'Ingénieur Agronome. Université Libanaise. 111p.
- **Belaid C., Kallel M et Elleuch B, (2002).** Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive (margines). Déchets sciences & technique. 27:30-34p.
- **Benavente -garciao ., Castillo J., Ortuno A et Del rio J.A, (2000).** Activité antioxydante des phénols extraits des feuilles d'*Olea europea* L, Food chem . 68:457-462p.
- **Bennick A, (2002).** Interaction des polyphénols végétaux avec les protéines salivaires. Crit Rev Rev Oral Biol Med. .13 (2):184-196p.
- **Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M et Facino R.M,(2005) :** Standardisation des propriétés antioxydantes du miel par une combinaison de dosages spectrophotométriques / fluorométriques et de chimiométries. Anal . Chim.Acta.(533):180-191p
- **Blasa M ., Candiracci M ., Accorsi A ., Piacentini M.P et Piatti E, (2007).** Les flavonoïdes de miel comme agents de protection contre les dommages oxydatifs des globules rouges humains. Chimie alimentaire . (104):1635-1640p.
- **Bouheroum M, (2007).** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes: *Rhantherium adpressum* et *Ononis angustissima*. Thèse de doctorat. Université de Constantine. Algérie,
- **Bouranis D.L ., Vlyssides A.G ., Drosopoulos J.B et Karvouni G, (1995).** Quelques caractéristiques du nouveau conditionneur de sol organique issu du co-compostage des eaux usées de traitement de l'huile d'olive et des résidus solides. Sol. Sci. Plante. Annal . 26 : 2461-2472p.

- **Bruneton J, (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3^{ème}Ed.Lavoisier .Paris,199-388p
- **Bruneton J, (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3^{ème}Ed. Lavoisier .
- **Cabrera F., Lopez R., Martinez-Bourdiu E., Dupuy De Lome E. et Murillo J.M, (1996)** Traitement des eaux usées des usines d'huile d'olive par le sol. Biodégradation et biodégradation internationales. 38:215-225p.
- **Capasso R., Evidente A ., Shivo L ., Orru G ., Marcialis M.A. et Cristinzio G, (1995).** Polyphénols antibactériens issus des eaux usées des usines d'huile d'olive. J. Appf. Bactérien. 79:393-398p.
- **Caponio F et Catalano P, (2010).** Le marteau écrase contre le disque écrase. L'influence de la température de travail sur la qualité et la conservation de l'huile d'olive vierge. Resource.Technology. 213:219-224p.
- **Cardinali A., Cicco N., Linsalata V., Minervini F., Pati S. et Pieralic M, (2010).** Composés dans la fraction phénolique de l'huile d'olive.Clinical Chemistry. . 46: 976-988p.
- **Charis M, (2017).** Galanakis- Les déchets des moulins à olives - les progrès récents pour le développement durable. Gestion-Presses académique.
- **Cnuced, (2010).** Huile d'olive site internet :
<http://r0.unctad.org/infocomm/français/olive/technologie.htm>
- **Danellakis D ., Ntaikou I ., Kornaros M. et Dailianis S, (2011).** Toxicité des eaux usées d'un moulin à huile d'olive en milieu marin: altérations des indices de stress dans les tissus de la moule *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 101 (2): 358–366p.
- **Davies L.C ., Vilhena A.M ., Novais J.M. et Martins-Dias S, (2004).** Caractéristiques des eaux usées des moulins à olives: modélisation et analyse statistique. GrasasAceites. 55 (3): 233–241p.
- **De marroco E ., Savarese M ., Paduano A. et Sacchir , (2017).** Caractérisation et fractionnement de ses propriétés antioxydantes et de sa bioactivité.Eur.Food.Resource. Technology. 226:653-659p.
- **Derbel S. et Ghedira K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. Phytothérapie et Nutrition. 1 :28-34p.
- **Dermeche S ., Nadour M ., Larroche C ., Moulti-mati F. et Michaud P, (2013).** Déchets des margines: caractérisations biochimiques et stratégies de valorisation. Biochimie des procédés. . 48:1532–1552p.
- **Dhaouadi K., Raboudi F., Estevan C., Barrajo E., Vilanova E., Hamdaoui M. et Fattouch S, (2010).** Effets sur la viabilité cellulaire et activités antioxydantes et

antimicrobiennes des extraits polyphénoliques du sirop de dattes tunisiennes (Rub El Tamer). *J. Agric. Food Chem.* 59: 402-406p.

- **Di-Giovacchino L., Mascolo A. et Seghitti L., (1988).** Sulle caratteristiche delle acque di vegetazione delle olive. *La Rivista delle Sostanze Grasse.* 65p.
- **El hadjoui H., Ait baddi G., Yaacoubi A., Hamdi H., Winteron P., Revel J.C. et Hafidi M., (2008).** Optimisation des conditions de biodégradation pour le traitement des eaux usées des moulins à huile. *Bioresour. Technol.* 99:5505-5510p.
- **El-Abbassi A., Khayet M., Kiai H., Hafidi A. et Garcia-Payo M.C., (2013b).** Traitement des eaux usées brutes des moulins à huile par distillation osmotique et distillation à membrane osmotique. *Sep. Purif. Technol.* 104: 327-332p.
- **Elmekawy A., Diels L., Bertin L., De wever H. et Pant. D., (2014).** Review: Potential biovalorization techniques for olive millery refinery wastewater. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 8:283-293p.
- **Fenice M., Giovannozzi Sermanni G., Federici F et D'Annibale A., (2003).** Production immergée et à l'état solide de laccase et de Mn-péroxydase par le média à base d'eaux usées du moulin à olives Panustigrinus. *J Biotechnol.* 100 (1) : 77-85p.
- **Fiorentino F., Garofalo A., De Santi G., Bono G.B., Giusto G et Norrito, (2003).** Répartition spatio-temporelle des recrues (groupe O) de Merluccius et Phycisblennoides (Poissons., Gadiformes) dans le détroit de Sicile (Méditerranée centrale). *Hydrobiologie* 503: 223-236p.
- **Francesco G.L., (1993).** Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae.* 47 : 15-20p.
- **Galanakis C M., Tornberg E et Gekas V., (2010).** Une étude de la récupération des fibres alimentaires des eaux usées des moulins à huile et de la capacité de gélification de la fraction de fibres solubles. *LWT - Food Sci. et Techn.* 43 : 1009-1017p.
- **Galli E., Pasetti L., Fiorelli F et Tomati U., (1997).** Compostage des eaux usées des moulins à huile : aspect microbiologique. *Gestion des déchets et recherche.* 15 (3): 323-330p.
- **Garcia Garcia I., Jimenez Pena P.R., Bonilla Venceslada J.L., Martin Martin A., Martin Santos M.A et Ramos Gomez E., (2000).** Élimination des composés phénoliques de l'olive. Références bibliographiques 53 eaux usées à l'aide de *Phanerochaete* et *Echrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* et *Geotrichum candidum*. *Process Biochem.* 35 (8):751-758p.
- **Garrido Hoyos S.E., Martinez Nieto L., Camacho Rubio F et Ramos Cormenzana A., (2002).** Cinétique du traitement aérobie des eaux usées des moulins à huile (OMW) avec *Aspergillus terreus*. *Process Biochem.* 37: 1169-1176p.

- **Gharsallah N., Labat M., Aloui F et Sayadi S, (1999).** L'effet du prétraitement de Phanerocha et echryosporium des eaux usées des moulins à huile sur la digestion anaérobie. Conservation et recyclage des ressources. 27: 187-192p.
- **Ghedira K, (2005).** Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie. . (4): 162-169p.
- **Hagerman A.E., Rice M.E. and Ritchard N.T, (1998).** Mécanismes de précipitation des protéines pour deux tanins, le pentagalloyl glucose et l'épicatéchine 16 (4f8) catéchine (procyanidine). Journal de la chimie agricole et alimentaire. , 46: 2590-2595p.
- **Hamdi M, (1993a).** Perspectives et contraintes futures de l'utilisation et du traitement des eaux usées des usines vivantes: A. Examen. Ingénierie des bioprocédés. , 8, 209-214p.
- **Hamdi M, (1993c).** Valorisation et épuration des effluents des huiles d'olive: utilité de la microbiologie industrielle. Olivae. 46: 20-24p
- **Hamdi M, (1996).** Digestion anaérobie des eaux usées des moulins à huile. Biochimie des procédés. 31:105-110.
- **Hamdi M, (1993).** Valorisation et épuration des effluents des huilleries d'olives: l'utilité de la microbiologie industrielle. Olivae. 46 :20-24p.
- **Hamdi M., Garcia J.L et Ellouz R, (1992)** Processus biologique intégré pour le traitement des eaux usées. Bioprocess.Eng. 8-79p.
- **Karpouzas D.G., Ntougias S., Iskidou E., Rousidou C., Papadopoulou K.K., Zervakis G.I. et Ehaliotis C, (2010).** Les eaux usées des moulins à huile affectent la structure des communautés bactériennes du sol. Appl. Ecol du sol. 45 (2): 101–111p.
- **Kessoum Samia ,2014,** Activité antioxydante de polyphénols d'Artemisia herba alba).Mémoire de Master.Université Abderrahmane MIRA de Béjaia .36p.
- **Khanbabaee K et Ree T.V.,(2001).** Tanins: Classification et définition. Natural Products Rep. 18: 641-649p.
- **Khoufi S., Louhichi A et Sayadi S, (2015).** Optimisation de la co-digestion anaérobie des eaux usées des moulins à huile et du fumier de volaille liquide en condition discontinue et réacteur à boucle jet semi-continu. Bioresource. Technology. 182: 67–74p.
- **Kissi M., Mountadar M., Assobhei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P. et Sannia G,(2001)** Rôles de deux champignons basidiomycètes de la pourriture blanche dans la décoloration et la détoxification des eaux usées des moulins à huile. Appl Microbiol Biotechnol. 57 (1-2): 221-6p.
- **Koivikko R., Lopenen J., Eränen J.K. et Jormalainen V, (2008).** Variation des phlorotannins parmi trois populations de Fucusvesiculosus révélée par HPLC et quantification colorimétrique. Journal of Chemical Ecology. 34: 57-64p.

- **Koivikko R., Loponen J., Honkanen K et Jormalainen V, (2005).** Contenu de phlorotannins solubles, liés aux parois cellulaires et exsudés dans l'algue brune *Fucus vesiculosus*, avec des implications sur leurs fonctions écologiques. *Journal of Chemical Ecology*. 31 (1): 195-212p.
- **Lamraoui Imane et Kaddour Ilham, 2018.** Caractérisation microbiologiques et biochimiques d'une eau de végétation (margine). Mémoire de Master .Université Larbi Ben M'Hidi Oum Bouaghi. Algérie. 59p.
- **Lee O.H. et Lee B.Y, (2010).** Activités antioxydantes et antimicrobiennes des composés phénoliques individuels et combinés dans l'extrait de feuille d'*Olea europaea*. leaf extract. *Short Communication Bioresource Technology* .101:3751-3754p.
- **Leger C.L ., Kadiri-Hassani N et Descomps B, (2000).** Diminution de la production d'anions superoxyde dans les cellules de promonocytes humains cultivées (THP-1) en raison de mélanges de polyphénols provenant des eaux usées de traitement de l'huile d'olive. *J Agric Food Chem.* ts de l'utilisation et du traitement des eaux usées des usines vivantes: A. Examen. *Ingénierie des bioprocédés*. 8 : 209-214p.
- **Levis-Menzi R., Raffaldi R., Saviozzi A. et Cardelli R, (1995)** Décomposition des boues d'oliviers digérées par voie anaérobie, environnement. *Science*. 7 : 1411-1422p.
- **Loussert R, et Brousse G,** « l'olivier » Edition Moionneuve et Larose Paris **1978**.
- **Macheix J.J ., Fleuriet A et Sarni-Manchado P, (2006).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : *Les polyphénols en agroalimentaire*. Edition Technologie et document. Paris.
- **Macheix JJ., Fleuriet A et Jay-Allemand C, (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne. 4-5p.
- **MC amouretti - G. Come.** Le livre de l'Olivier (EDISUD)
- **Mcnamara C.J., Anastasiou C.C., O'flaherty V. et Mitchell R, (2008).** Bioremédiation des eaux usées des moulins à huile. *Int Biodeter Biodegr*. 61:127–134p.
- **Mebirouk M ,(2002).** Rejets des huileries, Développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols dans la margine. *CMPP News*, n°11.
- **Mekki A ., Dhouib A et Sayadi S, (2006).** Changements dans les propriétés microbiennes et du sol après modification avec les eaux usées traitées et non traitées des moulins à huile. *Microbiol. Res*. 161 (2):93–101p.
- **Mekki A ., Dhouib A et Sayadi S, (2013).** Revue: effets de l'épuration des eaux usées des moulins à huile sur les propriétés du sol et la croissance des plantes. *Int. J. Recyc. Org. Waste Agric*2 (1): 1–7p.

- **Moraetis D., Stamati F.E., Nikolaidis N.P et Kalogerakis N, (2011).** Irrigation des eaux de maïs par les usines de transformation du maïs: impacts sur les sols et les eaux souterraines. *Agric. Gestion de l'eau*. 98 (7): 1125–1132p.
- **Munir J., Rusan M., Ammar R., Albalasmeh A. et Malkaw I, (2016).** Effets des eaux usées des usines d'olive traitées sur les propriétés du sol et la croissance des plantes. *Pollution du sol, de l'air et de l'eau*. 227:135p.
- **Nefzaoui A, (1984).** Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. In : Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Étude FAO production et santé animales 43, Rome.
- **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, 20-22 Janvier. *Science et Technique, Olivaen°* : 19 .
- **Nefzaoui A, (1991).** Valorisation des sous-produits de l'olivier. Option méditerranéenne. : 101-108p.
- **Nicholson R et Vermerris W, (2006).** Biochimie des composés phénoliques. Édition: Springer. New York. 01-48p.
- **Ochando-pulido., Javier miguel., Fragoso., Rita., Macedo et Antónia, (2016).** Un bref examen des processus récents de traitement des effluents des moulins à huile. Dans: *Produits d'Olivier*. Université de Grenade. Espagne. 284-300p.
- **Outayeb Wassila et Touabi Farida 2014.** Mémoire de Master. Université de Mouloud Mammeri .Tizi Ouzou. Algérie.72p .
- **Paraskeva C.A., Papadakis V.G., Tsarouchi E., Kanellopoulou D.G. et Koutsoukos P.G, (2007).** Traitement par membrane pour le fractionnement des eaux usées des moulins à huile. *Dessalement*. 213 (1–3): 218–229p.
- **Piotrowska A., Rao M.A., Scotti R et Gianfreda L, (2011).** Changements dans les propriétés chimiques et biochimiques du sol suite à un amendement avec les eaux usées brutes et déphénolisées des moulins à huile (OMW). *Geoderma*. 161 (1–2): 8–17p.
- **Pozo C., Martínez-Toledo M.V., Rodelas B et Gonzalez-Lopez J, (2002)** Effets des conditions de culture sur la production de polyhydroxyalcanoates par *Azotobacter chroococcum* H23 dans des milieux contenant une forte concentration en alpêchine (eaux usées d'huiles d'olive) comme principale source de carbone. *J. de biotechnologie*. 97:125-131p.
- **Procida G et Cecon L, (2006).** Détermination gaschromatographe des acides gras libres dans les eaux usées de la poste d'olive. *Anal.Chim.Acta*. 561:103-106.

- **Rahim A.A., Rocca E., Steinmetz J., Kassim M.J., Ibrahim M.S et Osman H, (2008).** Activités antioxydantes des extraits d'écorce de *Rhizophora apiculata* de mangrove. *Chimie alimentaire*. 107: 200-207.
- **Ramos-cormenzana A, (1986).** Caractéristiques physiques, chimiques, microbiologiques et biochimiques des eaux de végétation, Symposium international de Proc sur la valorisation des sous-produits d'olive FAO.UNDP, Sevilla (Espagne). 19-40p.
- **Ranalli A, (1991).** Les effluents des moulins à huile: Propositions de réutilisation et d'épuration faisant référence à la législation italienne. *Olivae*. 39 : 26-40p.
- **Ranalli A, (1991a).** Les effluents des moulins à huile: Propositions de réutilisation et d'épuration faisant référence à la législation italienne. *Olivae*. 3 : 30-39p.
- **Saadi I., Laor Y., Raviv M. et Medina S, (2007).** Epannage des eaux usées des moulins à huile: effets sur l'activité microbienne et la phytotoxicité potentielle du sol. *Chemosphère*. 66:75–83p.
- **Sancoucy R, (1984).** Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen. Étude FAO Production et santé animale Synthèse no. 43 FAO Pub Rome.
- **Saraf S., Ashawat S. M et Saraf S, (2007).** Flavonoïdes: Une protection nutritionnelle contre les dommages cellulaires oxydatifs et induits par les UV. *Avis de pharmacognosie*1,(1) .
- **Sarni-Manchado P et Cheynier V, (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris. 2-10p.
- **Sarni-Manchado P et Cheynier V, (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris. 2-10p.
- **Savournin C., Baghdikian B., Elias R., Dargouth -kesraooui F., Boukef K., Balansard G. et Agric J, (2001).** *Food chem*. 49: 618p.
- **Sayadi S., Allouche N., Jaoua M et Aloui F, (2000)** Effets néfastes des polyphénols de masse moléculaire élevée sur le biotraitement des eaux usées des moulins à huile, *Biochimie des procédés*. 35 (7) : 725-735p
- **Shan L., He P et Sheen J, (2007).** Interceptant les cascades de signalisation MAPK de l'hôte par des effecteurs bactériens de type III. *Cell Host Microbe*. 1:167-174p.
- **Sekour B, (2012).**., Phytorotation de l'huile d'olive vierge (H.O.V) par ajout des plantes végétales(thym, ail, romarin).Mémoire de Magister. Université M'HAMED BOUGARA -BOUMERDES,116.
- **Singleton V. L., Orthofer R. et Lamuela-Raventos R. M, (1999).** Analyse des phénols totaux et autres substrats et antioxydants d'oxydation au moyen du réactif Folin-Ciocalteu. *Methods Enzymol*.1999. 1:167-174p.

- **Tohge T., Matsui K., Ohme-Takagi M., Yamazaki M. et Saito K, (2005)** Amélioration de l'activité de nettoyage radical des semences d'Arabidopsis génétiquement modifiées. *Biotechnol. Lett.* 27: 297-303p.
- **Toth B.G et Pavia H, (2001).** Élimination des phlorotannins des algues brunes dissoutes à l'aide de polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) insoluble. *Journal of Chemical Ecology.* 27 (9): 1899-1910p.
- **Urquiaga I, (2000).** N. E. S. et Leighton F. E. D. E. Antioxydants de polyphénols végétaux et stress oxydatif. *Biol. Res.* . 33: 55-64p.
- **Villemur P. et Dosba F, (1997).** Oléiculture:evolution variétale et acquisition de la maîtrise des pratiques culturales :Huile d'olive. *OCL*.4(5) :351-355p.
- **Vuorela S, (2005).** Analyse, isolement et bioactivité de la phe de colza nolics. Ed. Université d'Helsinki, Helsinki , 76p.
- **You-cheng hseu., Wen-huei chang., Chee-shan chen., Yi-chen chia., Hseng-kuang hsu., Jia-jiuan wu. et Hsin-ling yang, (2008).**Activités anti-oxydantes des extraits de feuilles de ToonaSinensis à l'aide de différents modèles d'antioxydants *Toxicologie alimentaire et chimique* . 46:105-114 p.
- **Zagklis D. P ., Vavouraki A. I ., Kornaros M. E. et Paraskeva C. A, (2015).** Purification des phénols des eaux usées des moulins à huile par filtration sur membrane et adsorption / désorption de résine. *Journal des Matériaux Dangereux.* 285: 69-76p.
- **Zimmer N. et Cordesse R, (1996).** Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA productions animales.* 9(3) :167-179p.
- **Ziogasv ., Tanou G. B ., Molassiotis., A. A Diamantidis G. B et Vasilakakis M, (2010).** Activités antioxydantes et anti-radicaux libres des extraits phénoliques d'olives.*Food, Chem.* 120:1097-1103p.

Sites Webographiques:

- L'arbre de l'olivier (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/arbres/images/olivier-port.jpg>).
- bourse-dz-.com/huile-dolive-hausse-de-la-production-algerienne-de-27.
- (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/arbres/images/olivier-port.jpg>)
- http://www.olivardeche.fr/file/conferencespdf/valorisation_coproducts_olive_D_Sauvant.pdf.
- ONH (2015) Office National de l'Huile. <http://www.onh.com.tn/index.php/fr/2016-05-23-14-44-46/lolivier/patrimoine-et-repartition>.
- Site net : sience7.blogspot.com/2017/08/les-differentes-apparoches-de.html.