

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA 1

Faculté des Sciences



Département de Chimie

Mémoire présenté par

LARID Ilhem

ELAICHI Karima

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : **Chimie des Substances Naturelles**

Titre

Etude de profil chimique des polyphénols extraits à partir des margines : Essais de biodégradation et de biotransformation avec la microflore indigène et sélectionnée

Soutenu publiquement le 18 juillet 2019 devant le jury composé de

Y. Daghbouche	Pr	Présidente	Université de Blida 1
F/Z Ferradji	MCB	Examinatrice	Université de Blida 1
A. Badis	Pr	Promoteur	Université de Blida 1

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018 / 2019

REMERCIEMENT

En premier lieu, on remercie Allah le Tout Puissant de nous avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Qu'il nous soit permis d'exprimer notre profonde reconnaissance et nos remerciements les plus sincères à Mr. Abdelmalek BADIS, notre promoteur et Professeur à l'université SAAD DAHLAB-BLIDA 1, pour la confiance qu'il nous a accordé en nous proposant ce thème de recherche. Ses critiques constructives et sa rigueur scientifique nous ont été très utiles pour mener à bien ce travail. Alors, au moment où s'achève ce travail, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre très grande reconnaissance.

On tient à remercier le Pr. Y. DAGHBOUCHE qui nous fait honneur de présider ce jury, merci pour l'aide qu'elle a fourni et les connaissances qu'elle a su nous transmettre. On la remercie également pour sa disponibilité et la qualité de ses conseils.

On adresse nos sincères remerciements à Mme FERRADJI, maître de conférences qui nous a fait l'honneur de juger ce travail.

Nos profonds remerciements vont également aux deux doctorantes du laboratoire de chimie des substances naturelles et de biomolécule (LCSN-BioM), Melle BEICHI Madjeda et Melle SAIDANI Fatiha pour leurs conseils avisés qui nous ont été précieux pour la rédaction du présent manuscrit. On les remercie également pour leurs soutiens matériels qui nous a permis de réaliser les différentes manipulations.

On souhaite adresser nos remerciements les plus sincères au corps professoral et administratif de l'université SAAD DAHLAB-BLIDA 1, pour la richesse et la qualité de leur enseignement, qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

On désire aussi remercier nos professeurs, qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Un grand merci à nos parents, pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnels, à la fois moral et économique, qui nous a permis de réaliser les études que nous voulons.

On voudrait exprimer notre reconnaissance envers les amis qui nous ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de notre démarche.

DEDICACES

« C'est à force d'études et de travaux que l'homme réussit à distinguer qu'il a une âme différente de son corps ; et c'est à force de génie, la meilleure partie de lui-même, qu'il devient immortel par ses ouvrages ». *Pierre-Jules Stahl*

Je dédie ce modeste travail réalisé grâce à l'aide d'ALLAH tout puissant

A mes très chers parents, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui,

A ma sœur et à mon frère, qui ont été toujours à mes côtés tout au long de mes années d'études.

LARID Ilhem

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents

Mes belles amies

Mes frères et sœurs

Mes neveux, mes nièces

Ma chère Sarah

À tous ceux qui m'ont enseigné

« Aucun mot ne peut exprimer ma joie, mon amour, ma gratitude et mon honneur merci,
pour votre présence dans ma vie. »

ELAICHI Karima

ملخص

المياه النباتية المستهدفة في هذه الدراسة مستخرجة من زيتون من فصيلة شمالال المحصود في الموسم الزيتي 2019/2018.

تم الحصول عليها من المطحنة التقليدية "عمارة و فريز" في منطقة تيزي راشد (500 متر إلى اليمين من تيزي راشد إلى تيزي وزو). تتميز المياه هذه المياه النباتية المجمعة بحموضة تبلغ 4.84 وعلى معدل يبلغ 3.81 جم / لتر من مركب الفينول.

كشفت الدراسات الميكروبيولوجية لهذه المياه النباتية أن الخمائر والفطريات التي تقدر على التوالي ب: 2.22×10^5 UFC.ml/L و 7×10^8 UFC.ml/L تمثل غالبية الكائنات الميكروبيولوجية في هذه النفايات السائلة في حين أن البكتيريا تمثل 2×10^4 UFC/mL

يُظهر اختبار مضادات الميكروبات الذي تم إجراؤه على تسع سلالات من نوع ATCC®. أن الخمائر من نوع *Candida albicans* ()، والبكتيريا من نوع *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis* و *Agrobacterium tumefaciens* تم تثبيتها بواسطة مستخلص البولي فينول. على عكس للفطر *Aspergillus Niger* والبكتيريا *Enterobacter* و *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ، التي لاحظنا مقاومتها لنفس المستخلص

تظهر متابعة التحلل للمياه النباتية لمدة 7 أيام بواسطة السلالات الداخلية والخارجية المعزولة من الطحالب الحمراء أن معدل التخلص من المركبات الفينولية يصل إلى أكثر من 80 %.

يستخدم مستخلص البولي فينول كمصدر للكربونات في وسط فقير للسلالات الخارجية، كما أن الزيادة في كمية لبعض السلالات تؤكد نموها وبالتالي استهلاك المستخلص.

الكلمات المفتاحية: المياه النباتية، متعدد الفينول، التحلل البيولوجي، الاستخلاص، الوصف

RESUME

La margine ayant fait l'objet de cette étude est issue de la trituration des olives de la variété « Chemlal » récoltées au cours de la saison oléique 2018/2019. Elle a été obtenue auprès d'une huilerie traditionnelle « AMARA ET FRERES » de la région de Tizi Rached (à 500 m à droite en allant de Tizi-Rached vers Tizi-Ouzou). Les margines collectées sont caractérisées par un pH acide de 4.84 et par un taux moyen en composés phénoliques de 3,81 g/L.

L'étude microbiologique de ces margines a révélé que les levures et les champignons qui sont respectivement de l'ordre de 2.22×10^5 UFC.ml/L et 7×10^8 UFC.ml/L représentent la flore majoritaire de cet effluent, tandis que les bactéries sont de l'ordre de 2×10^4 UFC/mL

Le test antimicrobien effectué sur neuf (09) souches ATCC®, montre que la croissance de la levure *Candida albicans*, les bactéries *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis* et *Agrobacterium tumefaciens* est inhibée par l'extrait poly-phénolique. Par contre, nous avons constaté une résistance vis-à-vis du même extrait pour le champignon *Aspergillus niger*, les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Enterobacter sp.*

Le suivi de la biodégradation de la margine pendant 07 jour par des souches endogènes et exogènes isolées d'une algue rouge montre un taux d'élimination des composés phénoliques jusqu'à plus de 80%.

L'extrait poly-phénolique est utilisé comme une source de carbones dans un milieu MM pour les souches exogènes et l'augmentation du culot bactérien pour certaines souches confirme leur croissance par conséquent la consommation de l'extrait.

Mots clés : Margine-Polyphénols-Biodégradation-Extraction-Characterisation.

ABSTRACT

The Margin that is the subject of this study is derived from the crushing of the “Chemlal” olives harvested during the 2018/2019 oleic season. It was obtained from a traditional oil mill « AMARA ET frères » in the Tizi Rached region (500m to the right from Tizi-Rached to Tizi-Ouzou). The Margins collected are characterized by an acidic pH of 4.84 and an average phenolic content of 3.81 g/l.

The microbiological study of these Margins revealed that yeasts and fungi which are respectively of the order of 2.22×10^8 UFC.ml/1 and 7×10^8 UFC.ml/1 represent the majority flora of this effluent, while bacteria are in the order of 2×10^8 CFU/mL.

The antimicrobial test conducted on nine (09) strains of ATCC® shows that the growth of the yeast *Candida albicans*, the bacteria *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis* and *Agrobacterium tumefaciens* is inhibited by the polyphenolic extract. On the other hand, we contrasted the resistance with the same extract for the fungus *Aspergillus niger*, the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Enterobacter*.

Following biodegradation of Margin for 07 days by endogenous and exogenous strains isolated from a red alga shows a removal rate of phenolic compounds up to 80%.

Polyphenolic extract is used as a source of carbon in an MM environment for exogenous strains and the increase of the bacterial base for some strains confirms their growth with a resulting increase in extract consumption.

Key words : Margin-Polyphenols-Degradation-Extraction-Characterization.

LISTE DES ABREVIATIONS

- **Cl⁻** : chlorure
- **H₂** : dihydrogène
- **%** : pour cent
- **(p/v)** : poids / volumes
- **(v/v)** : volumes / volumes
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **C** : carbone
- **CH₄** : Méthane
- **CO₂** : dioxyde de carbone
- **CP** : composés phénoliques
- **DBO** : demande biologique en oxygène
- **DBO₅** : demande biologique en oxygène pendant 5 jours
- **DCO** : demande chimique en oxygène
- **DMSO** : diméthylsulfoxyde
- **F-C** : Folin-Ciocalteu
- **g/L** : grammes par Litres
- **h** : heures
- **H₂O** : dihydrogen monoxide
- **HCl** : chlorure d'hydrogène
- **IR** : infrarouge
- **IRTF** : Infrarouge à transformée de Fourier
- **ISP2** : International Streptomyces Project
- **J.C** : Jésus-Christ

- **kg** : kilogrammes
- **LB** : Luria Bertani
- **m** : mètres
- **mg Ac Gal/l** : milligrammes acide gallique / litre
- **mg/l** : milligrammes par litres
- **MH** : Mueller-Hinton
- **min** : minutes
- **mL** : millilitres
- **MM** : matières minérale
- **MM** : milieu minimum
- **mm** : millimètres
- **MO** : matières organique
- **mS cm⁻¹** : millisiemens par centimètres
- **MS** : matière sèche
- **N** : azote
- **Na₂CO₃** : trioxocarbonate de disodium
- **NaCl** : chlorure de sodium
- **NaOH** : hydroxyde de sodium
- **nm** : nanomètres
- **O** : oxygène
- **O₂** : dioxygènes
- **pH** : potentiel hydrogène
- **qt** : quinaux
- **R** : rendement

- **RMN** : résonance magnétique nucléaire
- **SAB** : Sabouraud
- **T** : temps
- **t** : tonnes
- **UFC.ml⁻¹** : Unité Formant Colonie/ml
- **UV** : ultraviolet
- **°C** : degré Celsius

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : la campagne oléicole 2017/18 de la production d'huile d'olive.....	5
Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques des margine.....	9
Tableau 3 : Composition minérale des margines.....	10
Tableau 4 : Les acides phénoliques et leur structure présent dans les margines.....	16
Tableau 5 : les composés phénoliques des margines et leurs activités biologiques	19
Tableau 6 : Caractérisation microbiologique des margines étudiées.....	38
Tableau 7 : Résultat de l'activité antimicrobienne de l'extract poly phénolique.....	39

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol)	17
Figure 2 : L'hydroxytyrosol (3,4- dihydroxyphenylethanol)	17
Figure 3 : Structures chimiques des flavonoïdes des margines.....	17
Figure 4 : méthodologie expérimental du travail.....	24
Figure 5 : huilerie traditionnelle « AMARA ET FRERES »	25
Figure 6 : spectromètre IR-TF Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™10.....	26
Figure 7 : Organigramme de l'extraction des composés phénoliques de la margine.....	28
Figure 8 : Organigramme du dosage des polyphénols de la margine.....	29
Figure 9 : Organigramme Biodégradation des composés phénolique par a microflore endogène.....	32
Figure 10 : souche 17R.....	32
Figure 11 : souche 3'R.....	32
Figure 12 : souche AZ3	33
Figure 13 : souche AZ4.....	33
Figure 14 : Spectre IRTF d'absorbance de la margine.....	36
Figure 15 : Fraction lipidique avant et après séchage.....	37
Figure 16 : micro-organisme présent dans la margine.....	39
Figure 17 : Activité antimicrobienne des margines vis-à-vis des souches testées.....	40
Figure 18a : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique de concentration [0.025-0.7mg/mL] dans le domaine dynamique.....	41
Figure 18b : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique de concentration [0.025-0.16mg/mL] dans le domaine linéaire.....	41
Figure 18c : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique de concentration [0.18-0.7 mg/mL] dans le domaine linéaire.....	42

Figure 19 : cinétique de la biodégradation des composés phénoliques (CP).....	42
Figure 20 : Le taux d'abattement des CP par la microflore endogène.	43
Figure 21 : Spectre IR(ATR) d'absorbance de l'extrait poly phénolique.....	43
Figure 22 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation Jour 2.....	44
Figure 23 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation Jour 4 et 7.....	45
Figure 24 : Spectre IR(ATR) d'absorbance montrant l'évolution de la biodégradation....	46
Figure 25 : cinétique de la biodégradation des CP par des souches sélectionnées.....	47
Figure 26 : Le taux d'abattement des CP par des souches sélectionnées.....	47
Figure 27 : Spectre IRTF d'absorbance du produit de biodégradation par 3'R Jour 2.....	48
Figure 28 : Spectre IRTF d'absorbance du produit de biodégradation par 3'R Jour 4.....	49
Figure 29 : Spectre IRTF d'absorbance du produit de biodégradation par 3'R Jour 7.....	49
Figure 30 : Spectre IR d'absorbance des produits de biodégradation par 17R Jour 2,4 et 7	50
Figure 31 : Spectre IRTR d'absorbance du produit de biodégradation par AZ4 Jour 2	51
Figure 32 : Spectre IRTR d'absorbance du produit de biodégradation par AZ4 Jour 4	52
Figure 33 : Spectre IRTR d'absorbance du produit de biodégradation par AZ3 Jour 2 ...	52
Figure 34 : Spectre IRTR d'absorbance des produits de biodégradation par AZ3 Jour 4, 7	53
Figure 35 : Effet de concentration de l'extrait poly phénolique sur la croissance de 17R	54
Figure 36 : Effet de concentration de l'extrait poly phénolique sur la croissance de 3'R	54
Figure 37 : Effet de concentration de l'extrait poly phénolique sur la croissance de AZ3	54

Figure 38 : Effet de concentration de l'extrait poly phénolique sur la croissance de AZ4
.....54

Figure 39 : Evolution du culot bactérien en fonction du temps.....55

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	i
DEDICACES.....	ii
ملخص.....	iv
RESUME.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTE DES ABREVIATIONS.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
INTRODUCTION GENERALE.....	1

PARTIE I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur Oléiculture.....	3
I.1. L'olivier.....	3
I.1.1. Origine et histoire.....	3
I.1.2. L'arbre	3
I.1.3. Botanique	4
I.1.4. Le fruit.....	4
I.2. La production oléicole.....	4
I.2.1. La production oléicole mondiale.....	4
I.2.2. La production et le secteur oléicole Algérienne.....	5
I.3. Système d'extraction d'huile d'olive.....	6
I.4. Les principaux sous-produits de l'oléiculture.....	6
Chapitre II : Les margines.....	8
II.1. Origine	8
II.2. Caractérisation physico-chimique des margines.....	8
II.2.1. Fraction minérale.....	9
II.2.2. Fraction organique	10
II.2.2.1. Les glucides.....	10
II.2.2.2. Les composés azotés.....	11
II.2.2.3. Les vitamines.....	11
II.2.2.4. Les acides organiques.....	11

II.2.2.5. Les huiles.....	11
II.2.2.6. Les composés phénoliques.....	11
II.3. Caractérisation microbiologique des margines.....	12
II.3.1. Les champignons.....	12
II.3.2. Les bactéries.....	12
II.3.3. Les levures	12
II.4. Impact des margines sur l'environnement et traitement	12
II.4.1. Impact des margines sur l'environnement	13
II.4.1.1. Pollution du sol.....	13
II.4.1.2. Pollution de l'air	13
II.4.1.3. Pollution des eaux	13
II.4.2. Traitement et valorisation des margines	14
Chapitre III : Les composés phénoliques présent dans les margines	15
III.1. Les acides phénoliques	15
III.2. Les alcools phénoliques.....	17
III.3. Les flavonoïdes.....	17
III.4. Les tannins	18
III.5. Les autres composés phénoliques.....	18
III.6. Effets biologiques des composés phénoliques.....	18
III.6.1. Vis-à-vis de l'homme.....	18
III.6.2. Vis-à-vis des plantes	18
III.7. Activité biologique.....	18
III.8. Valorisation des composés phénoliques des margines0.....	19
III.8.1. En agro-alimentaire.....	20
III.8.2. En cosmétologie.....	20
III.8.3. En phytothérapie.....	20
Chapitre IV : La biodégradation.....	21
IV.1. Définition de la biodégradation.....	21
IV.2. Types de biodégradation.....	21
IV.2.1. Biodégradation primaire.....	21
IV.2.1. Biodégradation totale « ultime ».....	21

IV.2.1. Biodégradation facile.....	21
IV.2.1. Biodégradation intrinsèque.....	21
IV.3. Méthodes de mesure et d'évaluation de la biodégradabilité.....	21
IV.4. Biodégradation des margine.....	22

PARTIE II : Étude expérimentale

I. Introduction	23
II. Matériels et méthodes.....	25
II.1. Echantillonnage	25
II.2. Analyse de la margine par spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (IRTF).....	25
II.3. Etude physico-chimique des margine.....	26
II.3.1. Mesure du pH.....	26
II.3.2. Matière sèche (MS).....	26
II.3.3. Matières minérale (MM) et organique (MO).....	26
II.3.4. Teneur en lipides.....	27
II.3.5. Composés phénoliques.....	27
II.3.5.1. Extraction des composés phénolique.....	27
II.3.5.1.1. La dilipidation des margines.....	27
II.3.5.1.2. Extraction des composés phénoliques à l'acétate d'éthyle.....	27
II.3.5.2. Dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu.....	29
II.3.5.2.1. Préparation de la solution mère de l'acide gallique.....	30
II.3.6. Conductivité électrique	30
II.4. Etude microbiologique	30
II.4.1. Dénombrement.....	30
II.4.1.1. Dénombrement préparation des suspensions (dilutions de la margine).....	30
II.4.1.2. Milieux de culture utilisées	30
II.4.1.2.1. Les bactéries	30
II.4.1.2.2. Champignons et Levures	30
II.4.2. Activité antimicrobienne de l'extrait poly-phénolique par la méthode de diffusion sur disque.....	31
II.4.2.1. Les souches testées.....	31
II.5. Étude de la biodégradation des composés phénolique par la microflore endogène « margine pure »	31

II.6. Étude de la biodégradation des composés phénolique par des souches sélectionnées « margine stérile »	32
II.6.1. Origine des souches.....	32
II.6.2. Milieux de cultures.....	33
II.6.3. Repiquage des souches	33
II.6.4. Préparation de la Préculture.....	33
II.6.5. Culture.....	33
II.7. Étude de la biodégradation de l'extrait poly-phénolique par des souches sélectionnées.....	34
II.7.1. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice en milieu solide.....	34
II.7.1.1. Préparation de l'inoculum (Préculture).....	34
II.7.1.2. Préparation du milieu de culture	34
II.7.1.3. Ensemencement et Séchage.....	34
II.7.1.4. Déposition des disques et incubation	35
II.7.1.5. Lecture des résultats.....	35
II.7.2. Procédure de la biodégradation.....	35

PARTIE III : résultats et discussions

I. Résultats et discussion.....	36
I.1. Analyse de la margine par spectroscopie infrarouge (ATR).....	36
I.2. Etude physico-chimique des margine.....	36
I.2.1. Mesure du pH.....	37
I.2.2. Matière sèche (MS) et d'humidité.....	37
I.2.3. Matières minérale (MM) et organique (MO)	37
I.2.4. Teneur en lipides.....	37
I.2.5. Composés phénoliques.....	38
I.2.6. Conductivité électrique	38
I.3. Etude microbiologique	38
I.3.1. Dénombrement.....	38
I.3.2. Activité antimicrobienne de l'extrait poly-phénolique	39
I.4. Étude de la biodégradation des composés phénolique	41
I.4.1. Par la microflore endogène	41
I.4.1.1. Suivie cinétique de la biodégradation par dosages des composés phénoliques totaux.....	41

I.4.1.1. Analyse du produit de la biodégradation par IR(ATR).....	43
I.4.2. Par des souches sélectionnées « margine stérile ».....	46
I.4.2.1. Suivie cinétique de la biodégradation par dosages des composés phénoliques totaux.....	46
I.4.2.2. Analyse du produit de la biodégradation par IR(ATR).....	48
I.4.2.2.1. La souche 3'R.....	48
I.4.2.2.2. La souche 17R.....	50
I.4.2.2.3. La souche AZ4.....	51
I.4.2.2.4. La souche AZ3.....	52
I.5. Étude de la biodégradation de l'extrait poly phénolique.....	54
I.5.1. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice la biodégradation	54
I.5.2. Cinétique de la biodégradation par mesure du culot bactérien.....	55
CONCLUSION GENERALE.....	57
REFERENCES.....	59
ANNEXES	

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'olivier est une plante emblématique de la Méditerranée. En effet, il n'est pas étonnant que la plupart de la superficie mondiale dédiée à cette culture se trouve justement dans le Bassin méditerranéen. C'est dans cette région que se concentre 95 % de la production mondiale et 85 % de la consommation mondiale [1].

Avec la promotion des vertus bénéfiques de l'huile d'olive pour la santé, la demande mondiale ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît constamment pour répondre aux besoins des consommateurs, du coup la nécessité de produire une huile de qualité, avec le minimum d'impacts négatifs sur l'environnement, est une condition essentielle pour qu'elles puissent rester concurrentielles sur le marché [2].

En plus de sa production principale (huile d'olive vierge et huile de grignons), l'industrie oléicole génère deux résidus, l'un solide (les grignons) et l'autre liquide (les margines), ces derniers n'ont jusqu'à présent pas de valeur économique en Algérie [3].

Les margines sont des eaux de végétation qui sont générées lors de l'extraction de l'huile d'olives vierge. Ce sont des effluents riches en matière organique (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines...), et en sels minéraux (potassium, sodium, magnésium ...). Les margines posent un sérieux problème de contamination pour tous les pays oléicoles. L'effet nocif de ces dernières dérive en grande partie de leur contenu en composés phénolique. Difficilement biodégradables ils empêchent les cycles biologiques du sol et souillent les eaux naturelles [4].

La valorisation de ces résidus est devenue une nécessité pour éviter une pollution de plus en plus sérieuse. Elle correspond à des procédés de traitement physique, chimique et biologique conçu essentiellement pour réduire le pouvoir polluant des margines [5].

Afin de diminuer le pouvoir polluant et de valoriser cette dernière, ce travail est une partie intégrante de cette thématique et porte sur le traitement biologique qui consiste à suivre la dégradation des polyphénols de la margine par trois voies microbiologique différentes, la première en utilisant la microflore endogène « margine brute », la seconde en utilisant quatre souches différentes « 2 *Streptomyces* et 2 *Bacillus* » dans une margine stériliser et la dernière biodégradation concerne l'extrait poly phénolique utilisé dans ce cas comme source de carbone pour ces 4 souches. Nous avons en parallèle mis au point une caractérisation physico-chimique et microbiologique de la margine et nous avons testés les effets antibactériens que manifestent l'extrait poly phénolique.

Pour cela, notre travail est subdivisé en 3 parties :

- La synthèse bibliographique, cette dernière inclut des généralités sur l'oléiculture, différents processus d'extraction d'huile d'olive, composition des margines et leur valorisation, une généralité sur les polyphénols, leurs caractéristiques, les différents polyphénols présents dans les margine etc., nous présentons aussi le concept de la biodégradations et les travaux réaliser sur la margine.
- La partie expérimentale a pour objectif de présenter le matériel et les méthodes utilisées pour effectuer les différentes analyses, de tester l'efficacité des souches utiliser dans les trois stratégies de la biodégradation des polyphénols.
- La dernière partie est consacrée aux résultats obtenus et ainsi qu'à leurs interprétations.

Une conclusion et les perspectives clôtureront ce travail de recherche.

PARTIE I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur Oléiculture

I.1. L'olivier

I.1.1. Origine et histoire

L'olive était l'un des premiers arbres fruitiers cultivés par l'homme. Son origine a été le sujet de plusieurs débats, Son histoire se confond avec celle des civilisations qui ont vu le jour autour du bassin Méditerranéen [6]. Il existait déjà sur le pourtour méditerranéen dès la préhistoire et 6000 ans avant J.C, il était signalé en Egypt. Dès 1200 ans avant J.C. Les grecs, peuple de la mer, ont sillonné la méditerranée et faire connaître la culture de l'olivier en Espagne, en Sicile et Afrique du Nord. Les Romains ont permis ensuite une grande extension des oliveraies et un essor des échanges d'huile d'olive [7].

En Algérie, la culture de l'olivier remonte à la plus haute antiquité. En effet, l'huile d'olive faisait l'objet d'un commerce intense entre Algérie et Rome, durant l'époque romaine et constituait l'une des bases essentielles des activités économiques des populations rurales [8].

I.1.2. L'arbre

L'olivier est un arbre à tronc droit souvent fissuré à écorce grise et aux petites feuilles opposées vertes argentées auquel le climat méditerranéen convient parfaitement (hiver doux, automne et printemps pluvieux, été chaud, sec et une grande luminosité). Il est représenté par deux espèces, sous une forme sauvage oléastre (*Olea europaea*, variété Sylvestris) et sous une forme cultivée, olivier (*Olea europaea*, variété Sativa) [9].

L'olivier cultivé est un arbre ayant des feuilles vertes tout le long de l'année. Ses dimensions et sa forme varient avec les conditions climatiques, l'exposition, la fertilité du sol et la variété, il pousse dans le climat tempéré et il est également réputé pour sa grande rusticité lui permettant de s'adapter facilement aux sols rocheux, ingrats, caillouteux et arides. Une autre particularité de l'olivier est le grand développement de son port qui peut atteindre 15 à 20 m de hauteur avec un tronc de 1,5 à 2 m de diamètre [10].

L'olivier bénéficie d'une longue durée de vie, il peut même être considéré comme immortel car si le tronc disparaît, des rejets reconstituent spontanément l'arbre. Il se multiplie très facilement par voie végétative ou à partir de boutures [11].

I.1.3. Botanique

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé "Olea" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe [12].

La classification botanique de l'olivier selon [13], est la suivante :

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : Astéridées
- Ordre : Lamiales
- Famille : Oléacées
- Genre : Oléa
- Espèce : Oléa européa

I.1.4. Le fruit

L'olive est une drupe à noyau à mésocarpe charnu, indéhiscente (ne s'ouvrant pas). Sa forme est ovoïde ou ellipsoïde. Ses dimensions sont très variables suivant les variétés. La paroi de ce fruit est constituée : de l'épicarpe (peau) solidement attaché à la pulpe. A maturation, l'épicarpe passe de la couleur vert tendre (olive verte), à la couleur violette ou rouge (olive tournante) puis à la coloration noirâtre (olive noire) [14].

Sa composition physique est [15] :

- Un épicarpe 2 à 2,5 % : l'eau de l'olive. Elle est recouverte d'une matière cireuse, la cuticule, qui est imperméable à l'eau.
- Un mésocarpe 71,5 à 80,5% : la pulpe du fruit. Elle est constituée de cellule dans lesquelles vont être stockées l'huile d'olive.
- Un endocarpe : 17,3 à 23,0% paroi du noyau 2,0 à 5,5% Amandes
- Pour les composé chimiques de L'olive ils sont généralement de lipides, glucides, protides, cendres et eau.

I.2. La production oléicole

I.2.1. La production oléicole mondiale

Selon les données du l'an 2017, la production mondiale a atteint 2 900 000 tonnes (t). Les pays membres de l'UE enregistreraient une production totale de 1 805 000 t, la production européenne arrive en tête avec l'Espagne, l'Italie, la Grèce et le Portugal. Pour les autre pays

la Turquie, la Tunisie, le Maroc, l'Algérie et l'Argentine. Les pays non membres, comme la Syrie, l'Australie et le Chili, produiraient conjointement 177 000 t d'huile d'olive. Le principal importateur d'huile d'olive reste les États-Unis, avec 37 % du marché mondial, suivi de l'Union européenne (16 %) [16].

Tableau 2 : la campagne oléicole 2017/18 de la production d'huile d'olive.

Pays	production
UE	1 805 000 t
Espagne	1 090 500 t
Italie	320 000 t
Grèce	300 000 t
Portugal	78 800 t
Algérie	80 000 t
Argentine	37 500 t
Maroc	140 000 t
Tunisie	220 000 t
Turquie	287 000 t

I.2.2. La production et le secteur oléicole Algérienne

Les surfaces agricoles consacrées à l'oléiculture ont atteint depuis 1999 à ce jour (2019), près de 500.000 hectares [17].

La production nationale de la filière oléicole s'est établie à 6.844.606 quintaux en 2017 la production a été de 2.928.812 quintaux d'olive de table, de 3.915.794 quintaux d'olive à huile. Ajoutant que la production d'huile avait atteint 685.215 hectolitres en 2017 [18].

Étalée sur une superficie globale de 432.916 hectares comprenant 60.969.641 d'arbres, dont 36.117.825 oliviers en production, la filière oléicole avait enregistré un rendement de 19 kg/arbre et 17,5 litres/quintal en 2017 [19].

Les wilayas productrices d'olives pour l'année 2017, sont Mascara avec une production de 800.000 quintaux, Tlemcen avec une production de 730.000 quintaux et Bejaia avec une production de 600.551 quintaux [18].

I.3. Système d'extraction d'huile d'olive

L'huile d'olives est le principal produit de la production oléicole. Les méthodes d'extractions varient, mais le processus d'extraction d'huile d'olives reste toujours le même. Les olives vertes sont récoltées en septembre jusqu'à février.

L'huile d'olive est contenue dans vacuoles (minuscules poches situées dans les cellules des olives.). Pour pouvoir récupérer cette huile, il faut briser la paroi de ces derniers, cette opération est appelé broyage.

Dans la plupart des cas, les olives sont broyées entières (avec leur noyau). Du coup on obtient une pâte de consistance plus au moins liquide (pâte).

Cependant le broyage ne suffit pas pour briser la totalité des vacuoles, et afin de libérer le maximum d'huile, un malaxage est appliqué à la pâte.

Le broyage et le malaxage permettent d'obtenir une pâte qui contient de la matière solide (débris de noyau, épiderme, parois cellulaires, ...) et des liquide (huiles et eaux de végétations, c'est-à-dire l'eau contenue dans les cellules végétales de l'olive).

L'étape suivante consiste à séparer la partie solide (appelé grignon) de la partie liquide. Cette opération s'appelle : séparation de phases.

La dernière étape de l'extraction de l'huile d'olive consiste à séparer l'huile de végétation désignée sous terme « margines », il s'agit de la décantation. Il faut donc séparer l'huile de la margine [19].

A l'heure actuelle, trois techniques d'extractions sont mises en œuvre [20] :

- Procédés discontinus ou systèmes à presses.
- Procédés continus ou systèmes à centrifugation a trois phases.
- Procédés continus ou systèmes à centrifugation a deux phases.

I.4. Les principaux sous-produits de l'oléiculture

Comme le présente la partie précédente, lors du processus de production d'huile d'olive deux sous-produits sont ainsi engendrés :

- Un résidu solide appelé « grignon » formé de pulpe et de noyaux et en cas de système à deux phases, il y a production de grignon humide. Elles représentent environ un tiers du poids des olives fraîches triturées [21]. Cent Kg d'olive produisent en moyenne 35 Kg de grignon et 100 litres de margine [22].
- Un résidu liquide nommé margine, parfois nommés alpechine. Les margines sont des eaux usées qui sont générées lors d'extraction de l'huile d'olive vierge [23]. Ces

effluents sont composés de 40 à 50% de l'eau végétal qui provient du fruit (olive) et le reste de l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration [24].

Chapitre II : Les margines

II.1. Origine

Les margines sont obtenues lors de l'extraction de l'huile d'olive à partir de l'eau contenue dans le fruit, ajoutée au cours du broyage et des étapes de trituration. 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'olives, la saison de récolte, le taux de maturation des fruits et les conditions climatiques [25].

II.2. Caractérisation physico-chimique des margines

La margine se présente sous forme d'un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre à noire, avec une forte odeur d'olive et un aspect trouble [26]. Elle est caractérisée par un pH acide (4-5,5) avec un fort pouvoir tampon et une très grande conductivité électrique (conductivité supérieure à 10 mS.cm^{-1}) [27].

La margine peut être considérée comme un complexe chargé en matières organique et minérale. Sa composition massique est de 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matières organiques et 0,4 à 2,5% de sels minéraux. La fraction organique contient 2 à 15 % de composés phénoliques ce qui correspond à une concentration de 10 g/l [28].

Le tableaux ci-dessous regroupe quelques paramètres chimiques des margines.

Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques des margines [29].

Paramètre	Valeur
DCO (g/l)	340-374
Chlorures (g/l)	11.16-25.48
Conductivité (ms/cm)	24-29.8
pH	4.75-4.9
Taux des sucres (g/l)	18.54-26.87
DBO ₅ (mg/l)	1250-6250
Matières sèches (g/l)	138.44-240
Matières minérales (g/l)	22.69-24.35
Matières volatiles (g/l)	114.09-212
Matières en suspension (g/l)	5.1-10
Taux d'humidité (%)	86-87.6
Masse volumique (g/cm ³)	1.03-1.05

La composition de ces effluents est plus ou moins variable. Elle dépend de [30] :

- La qualité des olives,
- Leur degré de maturité,
- Système d'extraction,
- La qualité d'eau rajoutée lors de la phase d'extraction de l'huile.

II.2.1. Fraction minérale

Les margines contiennent des quantités significatives en sels minéraux [26]

- 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures).
- 20% insolubles (carbonates et silicates).

Les éléments les plus représentatifs dans la fraction minérale sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%) [30].

Tableau 3 : Composition minérale des margines [31].

Elément	Concentration (mg/l)
Ortho phosphates (PO_4^{3-})	800,6
Chlorures (Cl^-)	270,2
Sulfate (SO_4^{2-})	16,68
Sodium (Na^+)	5370,9
Potassium (K^+)	15295,5
Calcium (Ca^{2+})	1167,6
Magnésium (Mg^{2+})	410,3
Fer (Fe)	103,4
Aluminium (Al)	8,34
Chrome (Cr^-)	0,66
Nickel (Ni)	3,36
Cobalt (Co)	1,33
Manganèse (Mn)	1,66
Cadmium (Cd)	0,83
Oxyde de silicium (SiO_2)	41,7
Zinc (Zn)	10,0

II.2.2. Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques [32] :

- Fraction insoluble dans la phase aqueuse : constituée essentiellement de pulpes d'olives, qui représente la matière en suspension et colloïdale
- Fraction soluble dans la phase aqueuse : les sucres, les lipides, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques et les composés phénoliques.

II.2.2.1. Les glucides

Les glucides sont des composant de la matière vivante formé de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Sa teneur dans la margine varie entre 2 et 8% du poids de la pulpe d'olive fraîche [33]. Ils contiennent principalement 3% lignocellulosiques et 0,6 % des pectines [34].

Les sucres simples les plus fréquents dans les margines sont, en particulier, Arabinose, Galactose, Glucose, Rhamanose, Acide Gluronique, Acide Galacturonique [33].

II.2.2.2. Les composés azotés

Ils sont principalement les protéines (grosse molécule complexe d'acides aminés) sa teneur variant entre 1,2 et 2,4% (p/v). Les acides aminés plus abondants dans les margines sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline et la glycine [26].

II.2.2.3. Les vitamines

Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique, mais indispensable à l'organisme. Plusieurs vitamines ont été identifiées. Les plus fréquentes sont les vitamines du groupe D (calciférol) et la vitamine PP (vitamine B3 ou acide nicotinique) avec une concentration de 124 mg.kg⁻¹ de margines [32].

II.2.2.4. Les acides organiques

Les acides organiques sont des composés organiques présentant des propriétés acides, c'est-à-dire capable de libérer un cation (ion chargé positivement).

La proportion des acides organiques présente dans les margines varie entre 0,5 et 1,5% (p/v). Les principaux acides organiques rencontrés sont les acides fumarique, glycérique, lactique, malique et malonique [35]

II.2.2.5. Les huiles

Les huiles sont des liquides gras, inflammable, insoluble dans l'eau, d'origine végétale, animale ou minérale.

La concentration d'huile résiduelle contenue dans les margines est très variable selon le procédé d'extraction utilisé. Elle varie entre 0,02 et 1% (v/v) [30]. L'acide oléique est l'acide gras le plus abondant avec un pourcentage de 65% par rapport à la totalité d'huile [26].

II.2.2.6. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Plus de 50 différents composés phénoliques ont été identifiés dans les margines [36]. La teneur en composés phénoliques dans les margines dépend du système d'extraction de l'huile d'olive [37].

En général, cette teneur varie entre 3 à 5 g/l et peut dépasser 9 g/l [38].

II.3. Caractérisation microbiologique des margines

Les études microbiologiques effectuées sur plusieurs échantillons de margines ont confirmé l'absence totale de micro-organismes pathogènes. Donc, ces effluents ne posent aucun problème hygiénico-sanitaire [39].

Les levures et les champignons se développent mieux que les bactéries. Ces micro-organismes supportent la salinité élevée et le pH acide caractéristiques de ces effluents, et résistent plus que les bactéries aux substances phénoliques [38].

II.3.1. Les champignons

La flore fongique se compose essentiellement [39] :

- *Aspergillus flavius*,
- *Aspergillus candidus*,
- *Penicillium negricans*,
- *Alternaria sp* possèdent la capacité de dégrader les phénols à faible concentration.

II.3.2. Les bactéries

La flore bactérienne regroupe les bactéries qui résistent aux polyphénols particulièrement les bactéries à Gram-négatif [39].

- *Pseudomonas sp.*
- *Bacillus megaterium*.

II.3.3. Les levures

Parmi les levures, on trouve [39] :

- *Trichosporium cutaneium*
- *Cryptococcus albidius*
- *Rhodotorula sp.*
- *Candida sp*
- *Saccharomyces sp.*

II.4. Impact des margines sur l'environnement et traitement

L'industrie oléicole engendre l'huile d'olive comme produit principal, mais elle présente l'inconvénient de générer d'importantes quantités de sous-produits. Les grignons ne posent pas de problèmes particuliers pour l'environnement car ils sont réutilisés en agriculture et en industries, En revanche, les margines sont rejetées directement dans les égouts.

Les critères de pollution des margines se limitent à trois facteurs principaux :

- L'acidité,
- La conductivité élevée due à l'ajout du sel lors du stockage des olives avant leur trituration,
- La concentration élevée en matière organique représentée essentiellement par les composés phénoliques qui sont responsables de la toxicité et de la coloration brune rougeâtre à noire des margines.

II.4.1. Impact des margines sur l'environnement

L'impact des margines sur l'environnement se caractérise par l'effet des margines sur les différents compartiments de l'environnement.

II.4.1.1. Pollution du sol

L'épandage direct des margines sur le sol est l'origine de nuisances diverses, leur pH acide, leur salinité élevée ainsi que leur abondance en composés phénoliques provoquent la destruction de la microflore du sol et induisent des effets toxiques aux cultures végétales [35]. Ceci entraîne la stérilisation du sol et le déséquilibre de la symbiose entre la microflore du sol et les plantes [40].

II.4.1.2. Pollution de l'air

La décharge des margines dans les bassins d'évaporation à ciel ouvert, sur les terres ou dans les eaux naturelles génère des processus de fermentation et l'émission de plusieurs gaz, notamment le méthane, le dioxyde de carbone et le sulfure d'hydrogène [41]. Ce qui conduit au dégagement d'odeurs désagréables.

II.4.1.3. Pollution des eaux

Les résidus métalliques et organiques, la demande biologique et chimique en oxygène constituent une source de pollution de l'eau qui se transmet vers les eaux souterraines et superficielles du globe terrestre [42]. Le rejet de ces effluents dans les rivières et les égouts sans aucun traitement préalable pose de sérieux problèmes pour le système aquatique. Leur effet nocif dérive en grande partie de leur contenu en composés phénoliques qui peuvent inhiber la croissance des micro-organismes, spécialement les bactéries [43]. Ce qui diminue la décomposition biologique naturelle.

II.4.2. Traitement et valorisation des margines

Suites aux impacts des margines sur l'environnement, ainsi pour des considérations économiques, plusieurs chercheurs ont choisi la voie du traitement et de la valorisation des margines pour limiter leurs pollutions. Ces applications dépendent essentiellement des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de ces effluents [44].

Jusqu'à maintenant, le traitement des margines constitue un problème complexe vu la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment. Donc, l'application d'un traitement simple s'avère insuffisant [45].

Les travaux de valorisation qui ont été effectués sont surtout orientés vers la valorisation des margines par la voie biologique (aérobies, anaérobies) [46]. Des travaux ont été aussi effectués sur la bioconversion des composés phénoliques des margines par les microorganismes en molécules d'intérêt comme l'hydroxytyrosol [47].

La valorisation des margines par épandages agricole a été largement étudiée par plusieurs chercheurs [48-23].

Cependant, les questions environnementales doivent être prises en compte lors du choix de la méthode appropriée pour éviter de créer un impact pire sur l'environnement au lieu de résoudre un problème. Par conséquent, une évaluation environnementale complète de l'une de ces solutions doit être effectuée avant de l'examiner.

Divers procédés sont applicables aussi, tels que les traitements physico-chimiques (coagulation/floculation, filtration sur membrane...) [49-29], les traitements thermiques (incinération, évaporation,) [50], et le traitement par des bassins d'évaporation naturelle qui reste actuellement, la technique la plus usitée en raison de sa simplicité [51].

Chapitre III : Les composés phénoliques présent dans les margines

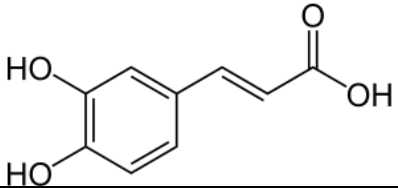
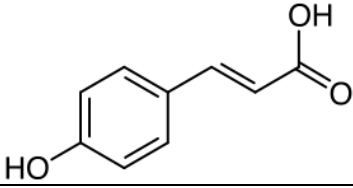
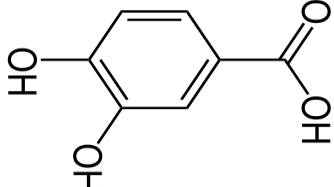
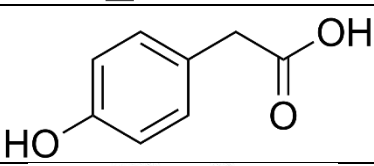
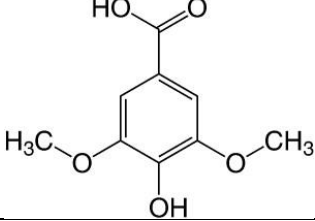
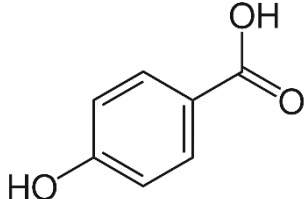
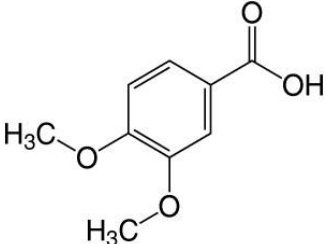
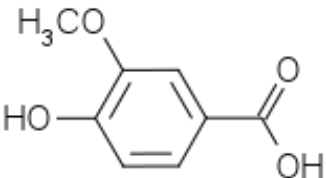
D'après *Ranilli* (1991) les composés phénoliques (ou bio phénols) des margines sont très divers et leur structure est très variable. Pendant le processus de fabrication de l'huile d'olive, les bio phénols sont transférés à partir de la pâte d'olives au cours du broyage/malaxage à l'huile et aux différents sous-produits, particulièrement aux margines [52]. Composés à tendance hydrophile, leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans la phase aqueuse. En effet, 2% seulement des composés phénoliques originaires des olives sont transférés à l'huile, 53% aux margines et 45% aux grignons d'olives. La composition phénolique des margines varie en fonction de la composition des olives [53].

Les composés phénoliques des margines les plus importantes sont les classes des [54] :

III.1. Les acides phénoliques

Ce sont les monomères les plus abondants dans les margines. Ils sont représentés dans le tableau 4 [55].

Tableau 4 : Les acides phénoliques et leur structure présent dans les margines [55].

Acides phénolique	Structures
Acide caféique	
Acide p-coumarique	
Acide protocatéchuique	
Acide 4-hydroxyphénylacétique	
Acide syringique	
Acide p-hydroxybenzoïques	
Acide vératrique	
Acide vanillique	

III.2. Les alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Les principaux alcools phénoliques rencontrés dans les margines sont [56]:

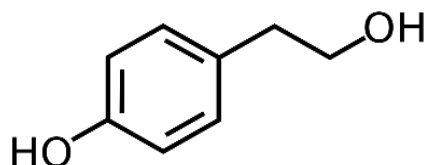


Figure 1 : Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) [56].

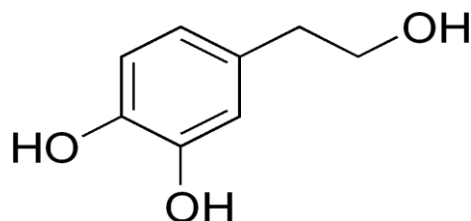


Figure 2 : L'hydroxytyrosol (3,4- dihydroxyphenylethanol) [56].

Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libres ou associés à l'acide élénolique [57].

III.3. Les flavonoïdes

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [58].

Ghedira (2005) a montré que les margines contiennent un ensemble de flavonoïdes tels que montre la figure 3 [59].

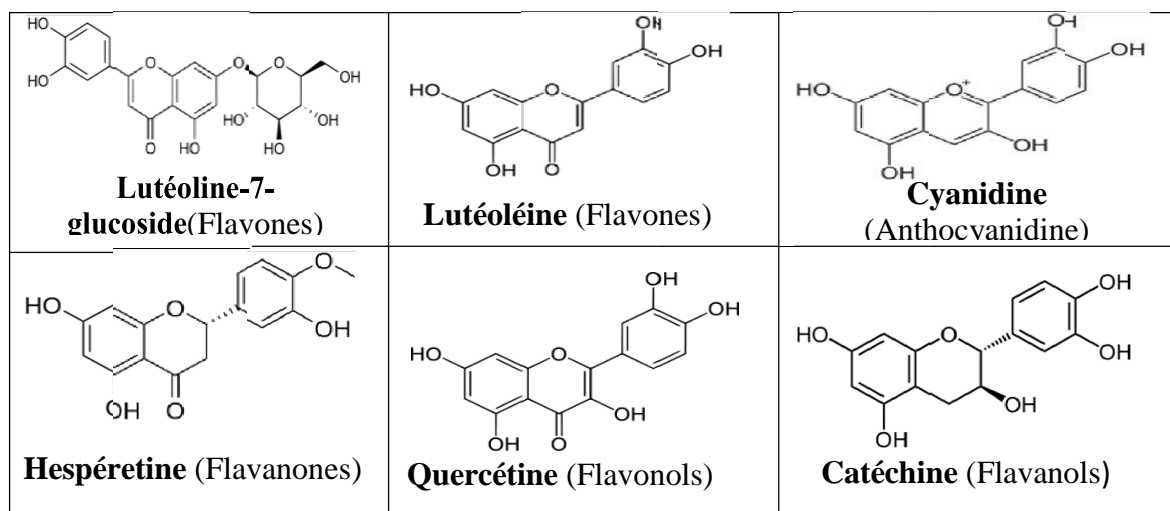


Figure 3 : Structures chimiques des flavonoïdes des margines [59].

III.4. Les tannins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les minuscules poches situées dans les cellules des olives [60].

Selon Macheix et *al.*, (2005) leur structure est très complexe, Ils sont classés conventionnellement en tanins hydrolysables et tanins condensés [61].

III.5. Les autres composés phénoliques

D'autres composés phénoliques ont été identifiés [62] :

- Oleuropéine
- L-caféyl- glucose
- Oleuropéine aglycone

Le gout amer de la margine est dû à l'abondance de l'oleuropéine dans celle-ci, elle peut atteindre jusqu'à 2% du poids d'olives.

III.6. Effets biologiques des composés phénoliques

III.6.1. Vis-à-vis de l'homme

En 2010, Crozier a démontré que les composés phénoliques sont de plus en plus utilisés dans le domaine thérapeutique [63].

De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires, et qu'ils agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères [64].

III.6.2. Vis-à-vis des plantes

Impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques, les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques dans la qualité alimentaire.

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent due à la teneur en composés phénoliques [65].

III.7. Activité biologique

Zbakh et El-Abbassi (2012) ont résumé la bio-activités des principaux composés phénoliques des margines [66] dans le tableau 5.

Tableau 5 : les composés phénoliques des margines et leurs activités biologiques.

Composé phénolique	Activité biologique
Hydroxytyrosol	Activité Antioxydante Activité Cardioprotective Activité Antimicrobienne et antivirale Activité Anti-inflammatoire Activité Fongicide
Tyrosol	Activité Antioxydante Activité Anti-inflammatoire Activité Cardio-protectrice Activité Neuroprotectrice
Oleuropéine	Activité Antioxydante Activité cardio-protectrice Activité Neuroprotectrice Activité Antiproliférative Activité Anti-hypertensive Activité Antimicrobienne et antivirale Activité Anti-inflammatoire
Oleuropéine aglycone	Antioxydante Neuroprotectrice Cytoprotectice Anti-inflammatoire

III.8. Valorisation des composés phénoliques des margines

Il y a une évidence croissante que les radicaux libres soient impliqués dans plusieurs maladies humaines, et jouent un rôle capital dans la dégradation oxydative des aliments et des produits cosmétiques. Par conséquent, l'extraction des composés phénoliques biologiquement actifs à partir des margines constitue une alternative viable pour valoriser cet effluent problématique [67].

En effet, la fraction phénolique possède des activités biologiques intéressantes, il a été montré aussi que l'absorption journalière des polyphénols peut dépasser 1g/jour. Ce qui veut dire qu'elle est supérieure à celle des autres classes de métabolites secondaires et des

antioxydants alimentaires. Par exemple, elle est 10 fois supérieure à l'absorption de la vitamine C et 100 fois plus élevée à celle de la vitamine E et les caroténoïdes [68].

Trois grands créneaux d'applications sont identifiés par rapport aux propriétés des composés phénoliques : en agro-alimentaire, en cosmétologie et en phytothérapie.

III.8.1. En agro-alimentaire

Selon Berset et bondini (2000) les composés phénoliques agissent sur la qualité sensorielle des aliments, couleur, odeur et goût. Mais aussi sur leur conservation avec un rôle antibactérien et antioxydant [69].

III.8.2. En cosmétologie

En 2005 Macheix J. a montré que l'intérêt des composés phénoliques en cosmétologie est lié aux propriétés : Antioxydante, leur capacité de chélater les métaux, pouvoir anti-inflammatoire, effet antimicrobien et l'intervention sur l'activité de nombreuses enzymes.

Ils permettent de lutter contre le vieillissement cutané en tant que molécule anti-radicalaire et en tant que protecteur des protéines de la peau comme l'élastine et le collagène.

Le seul frein de l'utilisation des composés phénoliques en cosmétologie est leur forte réactivité à l'oxydation et leurs instabilités dans les formulations cosmétiques conduisant ainsi à la variation possible de l'odeur et de la couleur [59].

III.8.3. En phytothérapie

Les éventuels bénéfices que pourraient apporter à la santé humaine les composés phénoliques intéressent particulièrement le domaine de la phytothérapie, puisque l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes.

Des effets protecteurs de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis-à-vis de différentes pathologies (maladies cardiovasculaires, cancers, diabète...) ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental.

De nombreuses études se sont penchées sur l'analyse du mode d'action des polyphénols dans la prévention de ces pathologies, qui met en cause les propriétés réductrices des composés phénoliques [59].

Chapitre IV : La biodégradation

IV.1. Définition de la biodégradation

La biodégradation « décomposition biologique », est le résultat de l'action d'un agent biologique « microbien » sur un composé organique avec comme seuls rejets, des produit simple « H₂O, CO₂, CH₄, H₂, Cl⁻ », mais aussi des produits organique simple « acides organiques etc. » Les matières organiques peuvent être dégradées en milieu aérobie avec l'oxygène, ou en milieu anaérobie sans oxygène [70].

IV.2. Types de biodégradation

Selon les facteurs conduisant à la modification de la structure moléculaire du polymère et par conséquent à la détérioration des propriétés macroscopiques, on parlera d'une [71] :

IV.2.1. Biodégradation primaire

La biodégradation primaire est définie comme la dégradation partielle de la structure moléculaire de la substance initiale. Cette biodégradation peut conduire à :

- La perte de l'activité biologique
- L'apparition de sous-produit plus toxique

IV.2.1. Biodégradation totale « ultime »

Elle est décrite comme la biodégradation complète de la structure moléculaire du composé, elle conduit du CO₂, CH₄, H₂O, divers minéraux et des microorganismes.

IV.2.1. Biodégradation facile

Dans ce cas les substances se dégradent rapidement dans les conditions environnementales.

IV.2.1. Biodégradation intrinsèque

Les substances sont dégradées dans les conditions optimales (forte quantité de microorganismes).

IV.3. Méthodes de mesure et d'évaluation de la biodégradabilité

Les méthodes d'évaluation de la biodégradabilité concernent principalement des mesures de perte de masses (tests de désintégration), de la quantité d'oxygène (O₂) consommée (DBO), du carbone organique dissous (COD), ou de la quantité de dioxyde de carbone (CO₂) émis (tests de biodégradabilité).

Des analyses supplémentaires peuvent être effectuées telles que la spectroscopie infrarouge (IR), la spectroscopie ultraviolet (UV)- visible, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la chromatographie par perméation de gel (pour déterminer la distribution des masses moléculaires), les propriétés mécaniques, et l'analyse de surface par microscopie électronique [72, 73].

IV.4. Biodégradation des margines

Plusieurs études ont été réalisées sur la biodégradation des margines, par des cultures pures de micro-organismes tels que *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Pleurotus ostreatus*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Aspergillus terreus* [74].

La biodégradation des margines à pH neutre par les micro-organismes du sol a permis d'éliminer 70% des composés phénoliques et de réduire 63% de la DCO initiale [75].

D'autres travaux ont prouvé l'efficacité du traitement aérobie des margines par *Phanerochaete chrysosporium*. Les résultats de cette étude ont révélé des taux d'abattement de la DCO et des polyphénols de l'ordre de 73% et 83% respectivement après 12 jours d'incubation pour une DCO initiale de 50 g d'O₂.l⁻¹.

Une élimination de la DCO de l'ordre de 55%, 52,5% et 62,8% a été obtenue avec des margines traitées en aérobiose par *Geothricum sp*, *Aspergillus sp*, et *Candida tropicalis* respectivement [76].

En général, le traitement des margines par l'application seule des procédés biologiques a donné des résultats insuffisants [77]. Ceci est dû en grande partie à la présence de fortes charges organiques polluantes représentées particulièrement par les composés phénoliques.

PARTIE II : Étude expérimentale

I. Introduction

La partie expérimentale est consacrée à la caractérisation physicochimique et microbiologique de la margine, la dégradation microbiologique des polyphénols présent dans celle-ci. Pour cela 3 stratégies ont été abordé :

- La biodégradation des polyphénols par la microflore endogène « margine pure » ;
- La biodégradation des polyphénols par 4 souches microbiennes à savoir [*Bacillus* : 17R, 3'R et 2 *Streptomyces* : AZ4, AZ3] « margine stérilisé » ;
- La biodégradation de l'extrait poly phénolique issu de la margine ;

La méthodologie du travail est récapitulée dans la figure 8. Elle se devise en quatre grandes partie :

- Caractérisation physicochimique et microbiologique ;
- Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la biodégradation ;
- Etude de la biodégradation des polyphénols ;
- Analyse par dosage colorimétrique et IRTF.

Les différentes manipulations ont été effectuées au niveau du laboratoire de recherche « Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) », Laboratoire de « Chimie » du département de chimie, Université Blida 1.

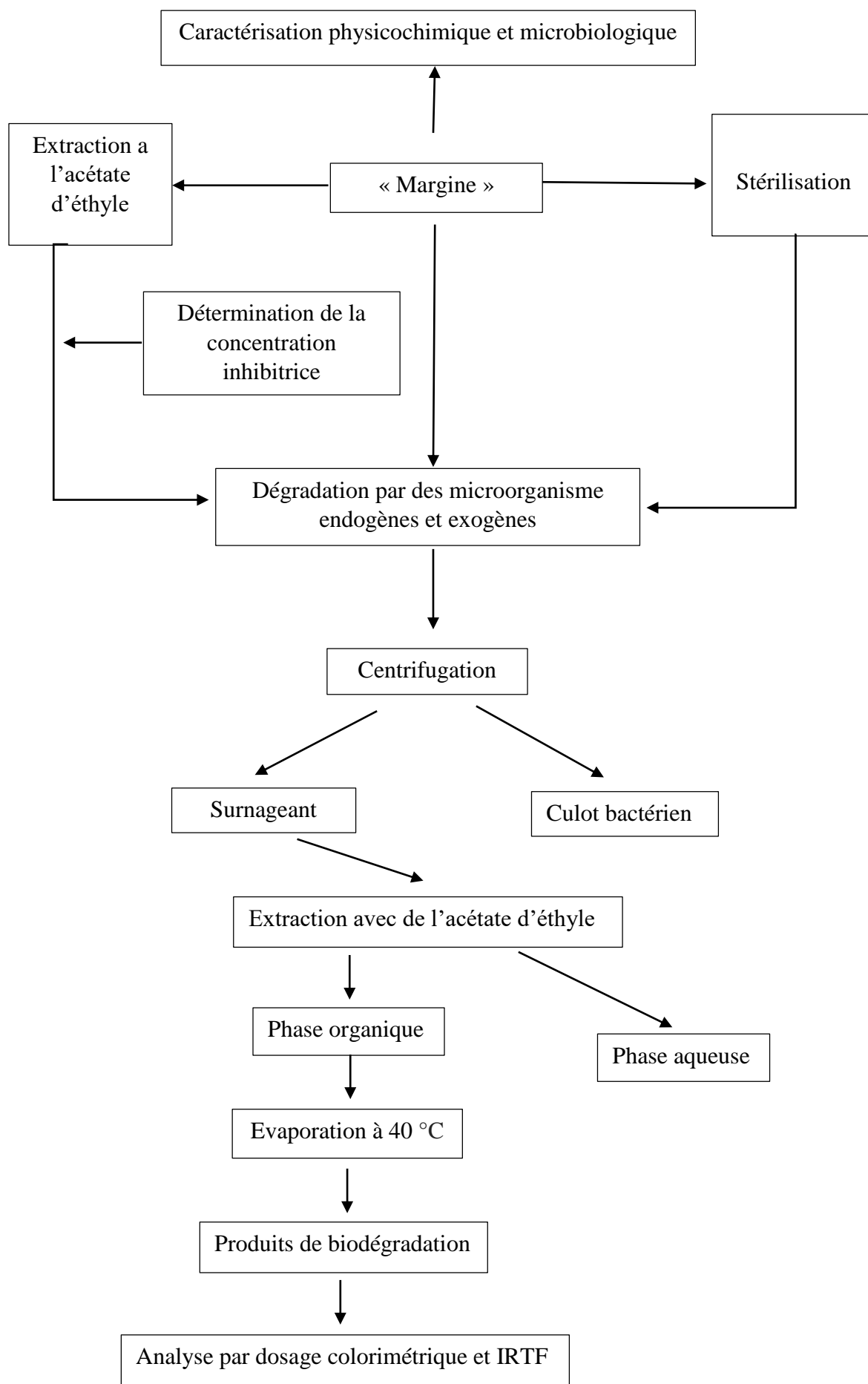


Figure 4 : Méthodologie expérimental du travail.

II. Matériel et méthodes

II.1. Echantillonnage

La margine ayant fait l'objet de cette étude est issu de la trituration des olives de la variété « Chemlal » récoltées au cours de la saison oléique 2018/2019. Elle a été obtenue auprès d'une huilerie traditionnelle « AMARA ET FRERES » de la région de Tizi Rached (à 500m à droite en allant de Tizi-Rached vers Tizi-Ouzou).



Figure 5 : huilerie traditionnelle « AMARA ET FRERES ».

II.2. Analyse de la margine par spectroscopie infrarouge (ATR)

L'analyse a été effectuée sur un Spectromètre Infrarouge (ATR) de marque Thermo Scientific type Nicolet™ iS™10, équipé d'un détecteur Étalon au sulfate de triglycine deutérié (DTGS) à réponse rapide ; Tellurure de mercure-cadmium (MCT) refroidi à l'azote liquide (en option), d'une gamme spectrale qui équivaut à 350-7800 cm^{-1} ou 375-11000 cm^{-1} (XTKBr). Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS 7.2 sous le système d'exploitation Microsoft Windows 10 (figure 6). L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution Mieux que 0,4 cm^{-1} .

Le spectromètre IR-TF Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™10 offre le plus haut niveau de fiabilité pour la vérification et l'identification des matériaux. Tous type d'échantillon (liquide/solide) peut-être analysé sans ajout de solvant ou le changement de pastille.



Figure 6 : spectromètre IR-TF Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™10.

II.3. Etude physico-chimique des margines

II.3.1. Mesure du pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre type (HANNA instruments modèle 210) (Annexe 1).

L'analyse est effectuée en triple.

II.3.2. Matière sèche (MS) et d'humidité :

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines. La MS est déterminée par la pesée d'un échantillon de margines avant et après évaporation à 105°C pendant 24 heures. Elle est exprimée en g/100 g de poids frais [78] :

$$\text{Humidité (\%)} = (P - P_s) / (P - P_o)$$

$$\text{MS (\%)} = 100 - \text{Humidité (\%)}$$

- P : poids du creuset + échantillon avant séchage.
- P_s : poids du creuset + échantillon après séchage.
- P_o : poids du creuset vide.

II.3.3. Matières minérale (MM) et organique (MO)

Les margines sèches ont été incinérées à 550°C jusqu'à une masse constante dans un four à moufle (annexe 2). La matière organique correspond à la différence entre le poids sec et les cendres (correspondant à la MM) qui en résultent.

II.3.4. Teneur en lipides

Vingt (20) mL de margine sont mélangés avec 30 mL de n-hexane (3×30 mL), le mélange est mixé vigoureusement dans une ampoule à décanter de 100 mL, puis centrifugé pendant 5 min à 3000 t/min. Les trois phases d'hexane sont combinées et le solvant est évaporé à 79°C dans un évaporateur rotatif, séchés à 100°C dans une étuve (annexe 2). Puis refroidis dans un dessiccateur pendant 30 min. Le séchage est répété jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La teneur en lipide est mesurée par gravimétrie.

II.3.5. Composés phénoliques

II.3.5.1. Extraction des composés phénoliques

Le protocole d'extraction des composés phénoliques à partir des margines est basé sur la méthode décrite par De Marco [79]. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle. L'extraction repose sur le principe de solubilité dans les solvants organiques (Annexe 3).

II.3.5.1.1. La dilipidation des margines

Elle se fait par une extraction totale à l'hexane. X ml de margines sont ajoutées à X ml d'hexane (V/V). Le mélange subit une agitation suivie d'une décantation pendant 10 min. les margines délipidées sont recueillies après séparation complète en deux phases : l'hexane (surnageant) et les margines délipidées (phase aqueuse) prêtes à une extraction liquide-liquide [79].

II.3.5.1.2. Extraction des composés phénoliques à l'acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle est confirmé d'être un solvant convenable pour la récupération des composés phénoliques contenus dans la margine [80]. Ce dernier est additionné aux margines délipidées (V/V), le mélange est secoué vigoureusement dans une ampoule à décanter (15min), L'ensemble est complètement séparé en deux phases : l'acétate d'éthyle riche en polyphénols en surnageant et les margines en culot. La phase organique riche en composés phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C [79].

Le rendement d'extraction est calculé selon la relation suivant :

$$R (\%) = (m \text{ Finale} / m \text{ Initial}) * 100$$

R : Rendement de la bioconversion et la biodégradation obtenu en pourcentage.

m Finale: Masse de finale en gramme.

m Initial : Masse initiale du menthol utilisé en gramme.

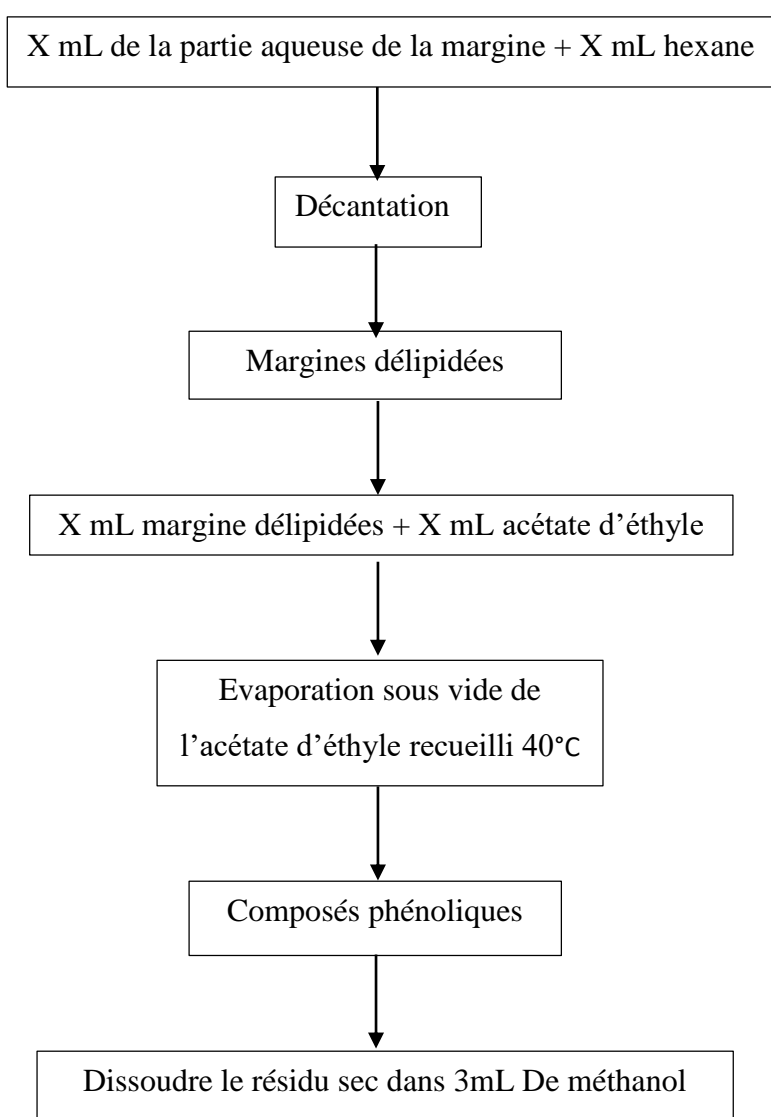


Figure 7 : Organigramme de l'extraction des composés phénoliques de la margine [79].

II.3.5.2. Dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu

En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique du réactif Folin Ciocalteu, qui se traduit par l'apparition d'une coloration bleue foncée, L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans l'échantillon. Le principe de cette méthode est le suivant [81] :

- On dilue 0.5 mL des extraits méthanoliques concentrés dans 20 mL d'eau distillée.
- On introduire 0.3 mL des extraits méthanoliques dilués, 20 mL d'eau distillée et 0.625 ml de réactif Folin-Ciocalteu dans des fioles de 25 mL.
- Après 3 min, on ajoute 2.5 mL de la solution saturée de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 35%.
- On Agite le contenu et diluer le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- On préparer un blanc, dans les mêmes conditions, en éliminant l'extrait.
- On Maintient les fioles préparées à l'obscurité pendant 1 heure.
- Lire les densités optiques à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (annexe 3).
- Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent acide gallique par litre de margine (mg EAG/l).

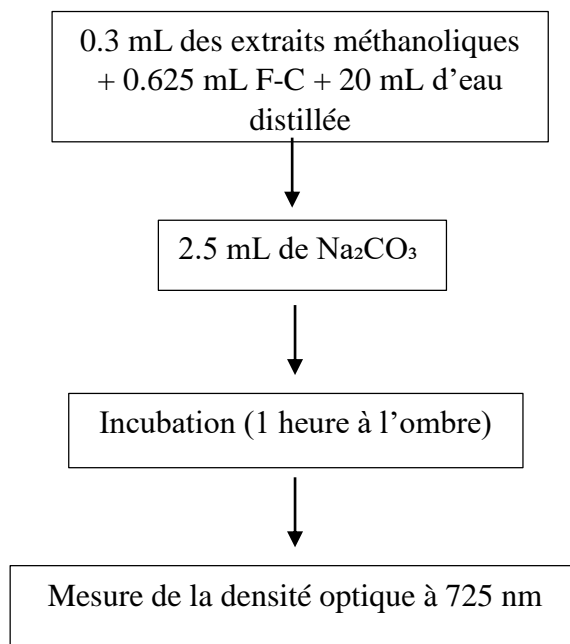


Figure 8 : Organigramme du dosage des polyphénols de la margine [81].

II.3.5.2.1. Préparation de la solution mère de l'acide gallique

Mettre 0,7 g d'acide gallique en poudre dans 100 mL de l'eau distillée. Une gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution mère d'acide gallique de différentes concentrations (0.025-0,7 mg/mL).

II.3.6. Conductivité électrique

La conductivité, la salinité sont mesurées à l'aide d'un conductimètre de type MARTINI instruments (annexe 1). La conductivité est exprimée en mS/cm.

II.4. Etude microbiologique

Les analyses microbiologiques des margines sont réalisées à travers le dénombrement des bactéries, des levures et des champignons.

II.4.1. Dénombrement

Après homogénéisation des margines, une série de dilutions dans de l'eau distillée stérile est réalisée. Un volume de 0,1 mL de chaque dilution appropriée est étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé de choix (annexe 3).

II.4.1.1. Dénombrement préparation des suspensions (dilutions de la margine)

- On mélange 1 mL de margine à 9 mL d'eau distillée stérile (la dilution 10^{-1} est ainsi réalisée).
- Puis On prélève 1 mL de la dilution 10^{-1} stérilement (à l'aide d'une micropipette) et On le mélange à 9 mL d'eau distillée stérile (la dilution 10^{-2}).

On procède ainsi jusqu'à la dilution 10^{-9} .

II.4.1.2. Milieux de culture utilisés (annexe 4)

II.4.1.2.1. Les bactéries

Le milieu de culture utilisé est le milieu LB, l'incubation des boîtes étalées est effectuée à 37°C pendant 24 heures.

II.4.1.2.2. Champignons et Levures

Le milieu SAB est le milieu de culture utilisé, l'incubation des boîtesensemencées est réalisée à 28°C pendant 3 à 7 jours.

II.4.2. Activité antimicrobienne de l'extrait poly-phénolique par la méthode de diffusion sur disque

L'activité antimicrobienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur les milieux gélose de MH pour les bactéries, les levures et SAB pour les champignons. Ainsi, les milieux MH, SAB sont uniformément ensemencés à l'aide d'un écouvillon stérile par une suspension de la souche à étudier. Des disques en papier absorbant de Whatman de 6 mm de diamètre sont stérilisés à l'autoclave (121°C pendant 20 minutes). Ils sont imbibés par l'extrait poly phénolique à tester à une concentration de 100 mg/ml. Les disques ainsi préparés sont déposés sur les milieux, laissés sous une période de diffusion pendant 4h à 0 °C. Puis, les boîtes sont incubées à 37 °C/24h.

II.4.2.1. Les souches testées

Nous avons ciblé 9 microorganismes (Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM)) pour les tests de l'activité antimicrobienne.

- *Escherichia coli* ATCC 25921
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Staphylococcus aureus* ATCC 449300
- *Listeria monocytogenes* ATCC 13932
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *agrobacterium tumefaciens* ATCC 23308
- *Enterobactere* sp
- *Entero faecalis*
- *Aspargillus niger*

II.5. Étude de la biodégradation des composés phénolique par la microflore endogène « margine pure »

Dans une série de 7 flacons nous avons introduit 50 mL de margine brute, qui ont été placés dans un incubateur agitateur (annexe 5) à 30°C. Une centrifugation a été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse de type SIGMA 3-16KL (Annexe 2) à 4800 tour/min pendant 20 min. A l'issue de cette étape, un surnageant et un culot sont obtenus.

Le suivi cinétique de la biodégradation se fait par le dosage des composés phénoliques présents dans le surnageant après centrifugation. Une extraction liquide-liquide est réalisée afin d'analyser par IR la nature du produit de biodégradation (figure 9).

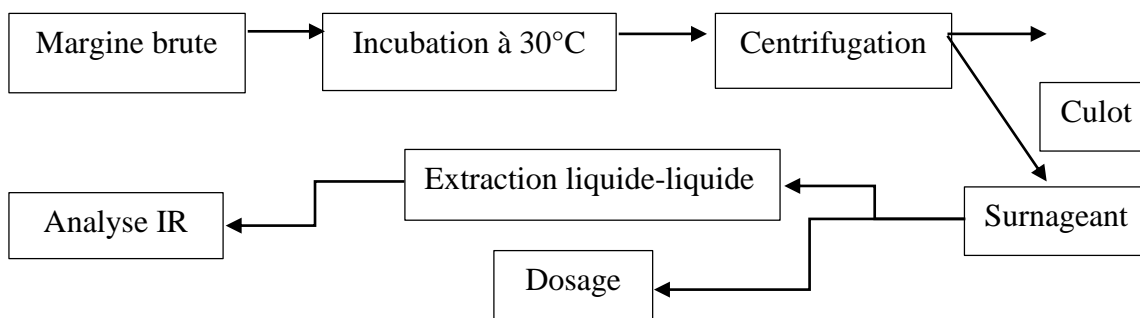


Figure 9 : Organigramme Biodégradation des composés phénolique par a microflore endogène.

II.6. Étude de la biodégradation des composés phénolique par des souches sélectionnées « margine stérile »

II.6.1. Origine des souches

Les souches microbiennes ont été nouvellement isolée à partir l’algue brune *Asparagopsis armata*. Récoltée en février 2016 au niveau du site la « Corne d’Or » à Tipaza (Algérie), dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) de l’Université de Blida 1 sur l’algue brune.

Les souches 17R et 3’R (Figure 10,11) appartiennent au genre *Bacillus* et les souches AZ3 et AZ4 (Figure 12,13) appartiennent au genre *Streptomycètes* ont été utilisées dans cette expérience. Ce sont des microorganismes de gram positif et mobile.

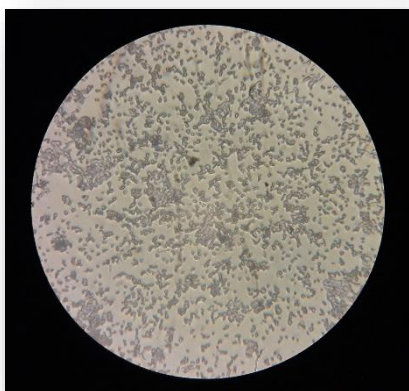


Figure 10 : souche 17R

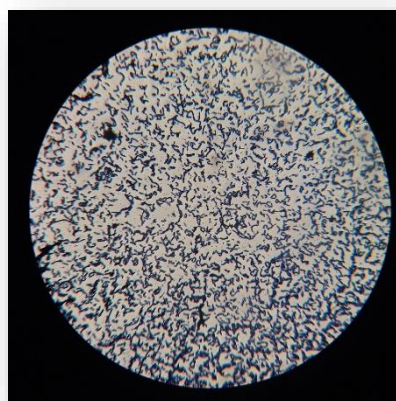


Figure 11 : souche 3’R

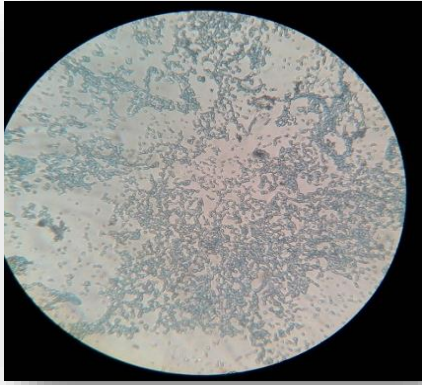


Figure 12 : souche AZ3

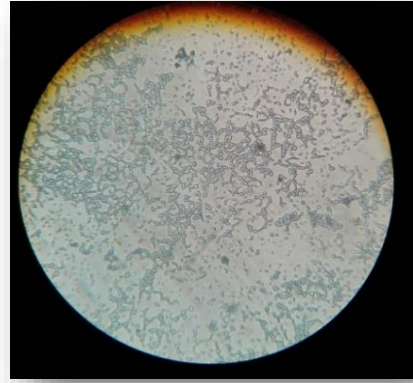


Figure 13 : souche AZ4

II.6.2. Milieux de cultures

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage en cycle humide 20 min à 120 °C (Annexe 5) et leur pH est ajusté à 7.8, 8.2, 6.8, 7.2 pour 3'R, 17R, AZ4, AZ3 respectivement par les solutions : NaOH (0.1N) et HCl (0.1N). Les flacons contenant le milieu doivent être fermés avec du coton et du papier aluminium. La composition chimique des milieux utilisés dans notre étude est regroupée dans un tableau (Annexe 4).

II.6.3. Repiquage des souches

Le repiquage des souches a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur. Les ensemencements sont faits dans des conditions d'asepsies. Après un bon développement des colonies, on effectue un repiquage de chaque colonie sur les milieux LB solide pour 17R, 3'R et le milieu ISP2 pour AZ4, AZ3. Ces boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24h pour *Bacillus* et à 30°C pendant 48h pour *Streptomyces*.

II.6.4. Préparation de la Préculture :

Cette étape consiste à préparer une suspension bactérienne en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture bactérienne de 18-24 h et les introduire dans des flacons contenant 50 mL de milieu LB et ISP2 liquide stérilisé dans l'autoclave à 120 °C pendant 20 min, puis incubé 24h pour 3'R, 17R et 48 pour AZ3, AZ4 (annexe 7).

II.6.5. Culture

Dans des flacons contenant 50 mL de milieu (pH ajusté pour chaque souche), stérilisé par autoclavage en cycle humide 20 min à 120 °C, est ajouté 4 mL de chaque Préculture à l'aide d'une micropipette dans des conditions d'asepsie strictes. Les flacons sont ensuite incubés à 30°C pendant 7 jours en mode agitation.

Le suivie cinétique de la biodégradation se fait comme pour la microflore endogène.

II.7. Étude de la biodégradation de l'extrait poly-phénolique par des souches sélectionnées

L'expérience a été réalisée en suivant les mêmes étapes que la précédente, la seule différence est dans le milieu de culture, ici les cultures se font dans un milieu minimum pauvre avec comme seul source de carbone notre extrait poly-phénolique

II.7.1. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice en milieu solide

Ce test consiste à déterminer l'effet inhibiteur des différentes concentrations de l'extrait poly-phénolique à savoir 0,5, 5, 20 et 50 mg/mL sur 3'R, 17R, AZ3 et AZ4.

La technique consiste à utiliser des disques de papiers buvards, imprégnés de la substance à tester. Les disques sont déposés à la surface d'un milieu solide uniformémentensemencée avec une suspension du germe étudié. La substance diffuse à partir du disque formant une zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance, plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

La procédure générale de la détermination de la gamme de concentration assimilable non inhibitrice comprend les étapes suivantes :

II.7.1.1. Préparation de l'inoculum (Préculture)

On prépare une suspension bactérienne en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture bactérienne de 18-24 h et les introduire dans des tubes à essais de 9mL d'eau physiologique (9 g de NaCl dans 100 mL d'eau distillée) stérilisé dans l'autoclave à 120 °C pendant 20 min, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

II.7.1.2. Préparation du milieu de culture

On fait fondre le milieu solide LB pour 17R, 3'R et ISP2 pour AZ3, AZ4 dans un four microonde, puis on coule aseptiquement le milieu de culture dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre et enfin on laisse refroidir et solidifier sur la paillasse.

II.7.1.3. Ensemencement et Séchage

On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne qu'on essore en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface du milieu solide, sèche, de haut en bas, en stries séries. On répète l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans

oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie du milieu, pour s'assurer que toute la boîte est bienensemencée. Pour finir on Laisse sécher les boîtes de Pétri pendant quelques minutes à température ambiante.

II.7.1.4. Déposition des disques et incubation

Une fois les milieux solides, on prélève aseptiquement à l'aide d'une pince un disque buvard imprégné dans différentes concentrations de l'extrait, ensuite le déposer sur la surface des milieux. On Appui doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu. Les boîtes sont placées 4 h à 4 °C dans un réfrigérateur pour assurer une bonne diffusion des produits étudiés. Enfin on incube les boîtes de Pétri à 30 °C pendant 24 h pour 3'R, 17R et pendant 48 h pour AZ3, AZ4.

II.7.1.5. Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition qui est représentée par une auréole formée autour de disque.

II.7.2. Procédure de la biodégradation

Une quantité bien définie de la suspension bactérienne et 0.5 ml d'une solution mère du substrat à une concentration de 50 mg/ml (préparée par dissolution de 0.55g d'extrait brute dans 11mL de DMSO) ont été ajoutée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile à 50 ml, du milieu de culture MM (7 flacons pour chaque souche). L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 12 jours.

Le suivie de la biodégradation se fait par la mesure du culot bactérien après séchage.

PARTIE III : Résultats et discussions

I. Résultats et discussion

I.1. Analyse de la margine par spectroscopie infrarouge (ATR)

L'analyse du spectre infrarouge de la margine (Figure 14) montre la présence d'une bande à 3337 cm^{-1} qui représente l'élongation O-H observée pour les phénols, il montre aussi des bandes dans la région 1636 cm^{-1} liée à la présence de la liaison C=C et d'une bande forte à 672 cm^{-1} qui caractérise la liaison C-H aromatique.

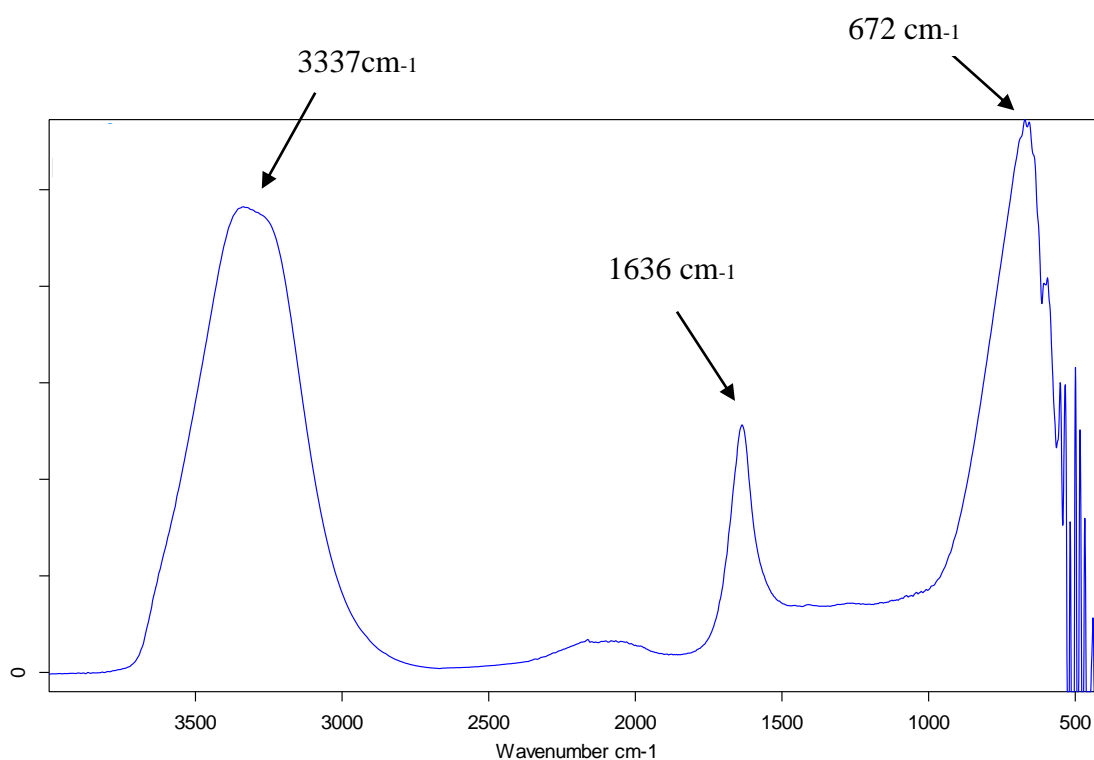


Figure 14 : Spectre IR (ATR) d'absorbance de la margine

I.2. Etude physico-chimique des margine

La margine étudié se présente sous forme de liquide résiduel caractérisé par une odeur nauséabonde qui s'accroît au fur et à mesure du temps. Dès le premier aperçu de la margine, on a constaté qu'elle a une coloration brune à brune-rougeâtre, qui devient de plus en plus sombre au cours de son stockage, avec un aspect trouble et une odeur forte qui rappelle celle d'huile d'olive.

I.2.1. Mesure du pH

Les margines sont caractérisées par un pH acide (entre 4,7 et 5,15), en raison de la présence des acides organiques (acides phénoliques, acides gras, ...). Ainsi la valeur enregistrée dans notre étude (**4.84**) se trouvent dans la citée dans la littérature.

I.2.2. Matière sèche (MS) et d'humidité

Les teneurs en eau mesurer dans la marge est de 88.88%, une valeur similaire à celle trouver dans la littérature pour des margine provenant d'une huilerie traditionnelle [82].

En ce qui concerne le taux de matière sèche nous avons enregistrer une valeur de 3.67g/100g de poids frais (36.7g/l)

I.2.3. Matières minérale (MM) et organique (MO)

La teneur en MO était de 3.26/100g de poids frais. Pour ce paramètre les valeurs rencontrées dans la littérature variaient entre 2 et 12,9 g/100 des margines brutes [83].

Concernant la teneur moyenne en MM des margines collectées était de 0.77g/100g de poids frais, une valeur se trouvant en dessous de la limite rencontrer dans par plusieurs auteurs qui variaient entre 0,8 et 3,4 g/100g. La conservation des olives, avant leur trituration, se fait en totalité par ajout de sel. Or, la conservation des olives utilisées dans notre étude était faite en dehors de tout ajout de sel ce qui explique de fort écart [83].

I.2.4. Teneur en lipides

La marge étudiée dans notre cas présentent un aspect visqueux lié à la présence de la fraction huileuse qui représente 2.1%. La quantité en matières grasses résiduelles présente dans les margines, dépend du système d'extraction d'huile d'olive. Le processus de centrifugation permet d'obtenir des taux faibles par rapport au processus traditionnel [84].

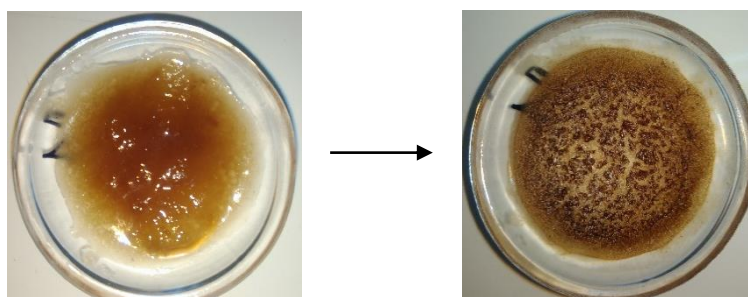


Figure 15 : Fraction lipidique avant et après séchage

I.2.5. Composés phénoliques

La margine est caractérisé par la prédominance de substances toxiques notamment les composés phénoliques, une valeur de 3.81 g/l a été enregistré dans notre étude, une quantité dans la limite avec celle retrouvé dans la littérature (3 à 5 g/l peut dépasser 9 g/l) [38].

Le rendement de l'extraction des polyphénols présent dans la margine est exprimé par la relation suivante :

$$R (\%) = (m \text{ finale} / m \text{ Initiale}) * 100$$

$$\text{Rendement d'extraction } R = (0.762/100) * 100 = 0.762 \%$$

I.2.6. Conductivité électrique

La conductivité électrique constitue un indicateur du degré de la minéralisation globale des eaux. Dans notre étude une valeur de 6.2 mS/cm a été enregistré, cette valeur est considérée comme faible à celle trouvé dans le littérature [29]. Cependant elle reflète la richesse naturelle de la margine en sels minéraux, expliqué par le non ajout de sel pratiqué pour la conservation des olives.

I.3. Etude microbiologique

I.3.1. Dénombrement

Les résultats du dénombrement de la margine dans le tableau 6, montrent que les levures et les champignons qui sont respectivement de l'ordre de $2.22 \cdot 10^5$ UFC.ml/1 et $7 \cdot 10^8$ UFC.ml/1 représentent la flore majoritaire de cet effluent, des valeurs en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs [85], tandis que les bactéries sont de l'ordre de $2 \cdot 10^4$ UFC/ml.

Tableau 6 : Caractérisation microbiologique des margines étudiées

Flore microbienne	UFC/ml
Les champignons	$7 \cdot 10^8$
Les levures	$2.22 \cdot 10^5$
Les bactéries	$2 \cdot 10^4$

La figure 16 représente les différents micro-organismes obtenus.

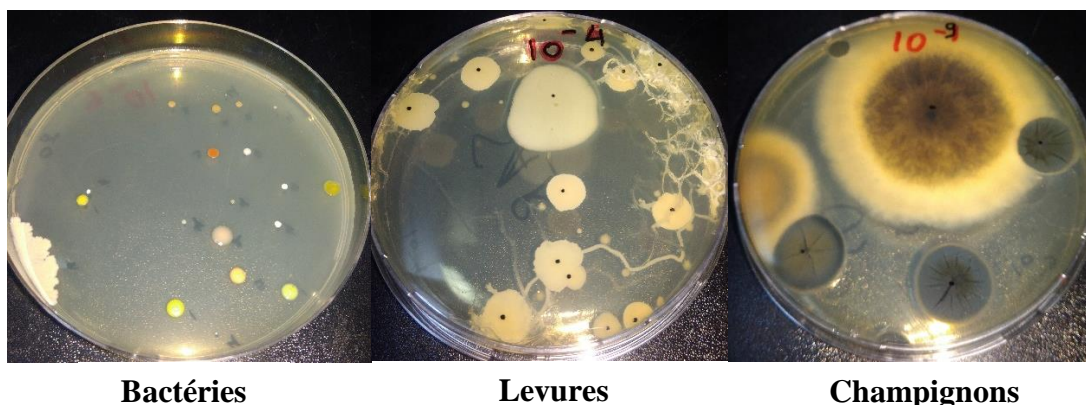


Figure 16 : micro-organisme présent dans la margine

I.3.2. Activité antimicrobienne de l'extrait poly-phénolique

La méthode de diffusion sur gélose nous a permis de mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'extrait poly phénolique envers des microorganismes pathogènes. D'après les résultats obtenus (tableau 7), l'activité se manifeste différemment sur les 9 souches testées montrant ainsi différents diamètres des zones d'inhibitions (Figure 17).

Tableau 7 : Résultat de l'activité antimicrobienne de l'extrait poly phénolique

Microorganismes	Activité
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25921	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 449300	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	+
<i>Enterobactere sp</i>	-
<i>Enterobacter faecalis</i>	+
<i>Aspergillus niger</i>	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 23308	+

+ : présence de zone d'inhibition / - : absence de zone



Agrobacterium tumefaciens

Escherichia coli

Candida albicans



Enterobacter faecalis

Enterobacter sp

Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus

Listeria

Aspergillus niger

Figure 17 : Activité antimicrobienne de l'extrait poly phénolique vis-à-vis des souches testées.

I.4. Étude de la biodégradation des composés phénolique

I.4.1. Par la microflore endogène

I.4.1.1. Suivi cinétique de la biodégradation par dosages des composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans cette méthode. Les résultats obtenus sont quantifiés en se référant à une courbe d'étalonnage (figure 18).

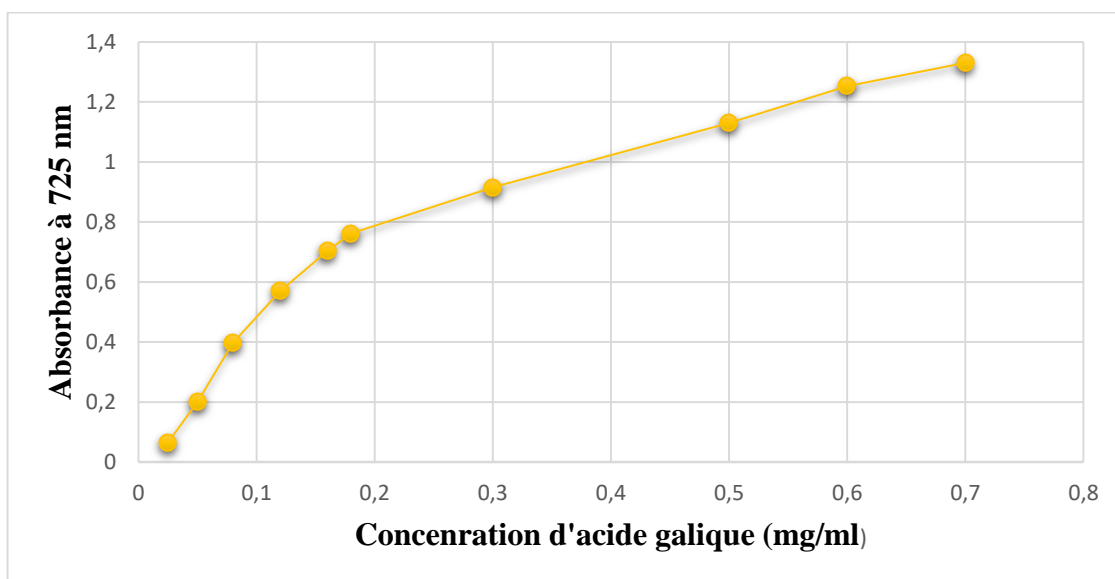


Figure 18a : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique de concentration [0.025-0.7mg/mL] dans le domaine dynamique.

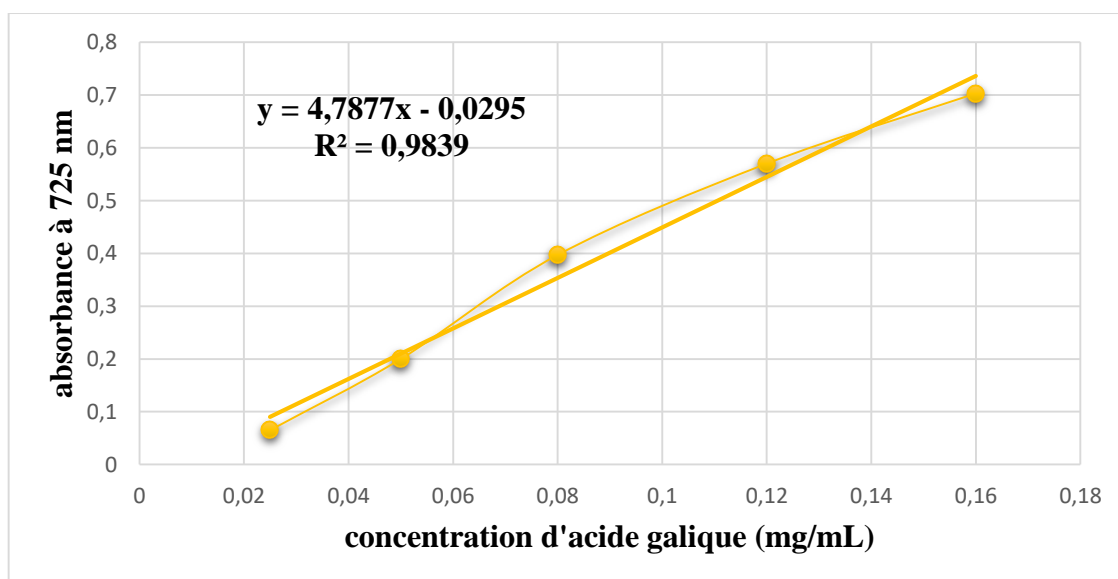


Figure 18b : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique de concentration [0.025-0.16mg/mL] dans le domaine linéaire.

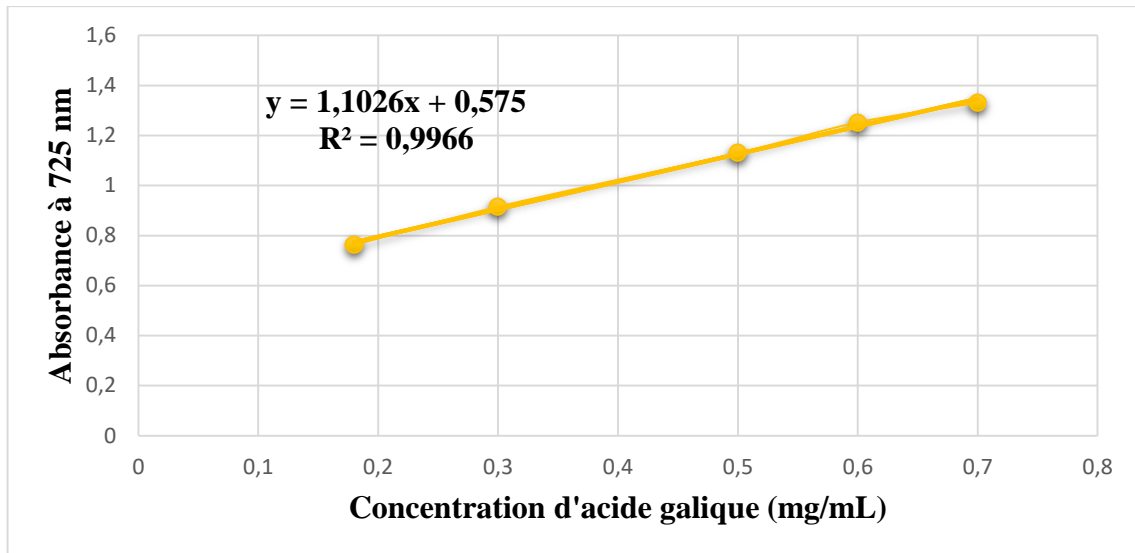


Figure 18c : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique de concentration [0.18-0.7 mg/mL] dans le domaine linéaire.

À partir de la courbe d'étalonnage, les concentrations des composés phénoliques totaux sont calculées et représentées dans la figure 19, la teneur en composés phénoliques est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (**mg EAG/g**) :

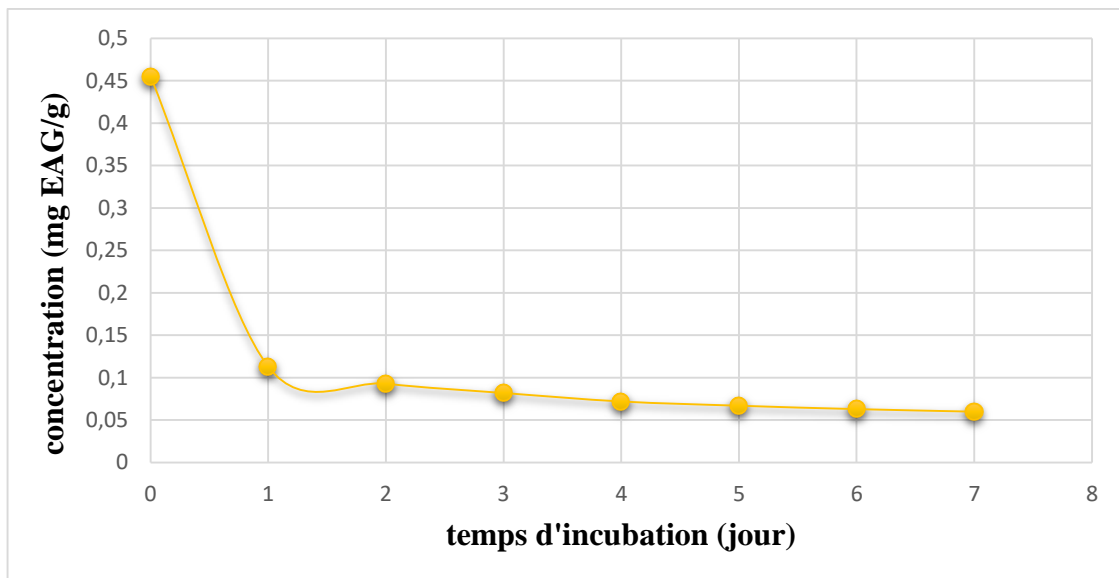


Figure 19 : cinétique de la biodégradation des composés phénoliques CP.

Le profil cinétique de la biodégradation des CP révèle une forte diminution de concentration passant de $T_0 = 0.455 \text{ mg EAG/g}$ à une concentration de T_1 (jour 1) = 0.113 mg EAG/g , qui se stabilise plus ou moins arrivant à 0.060 mg EAG/g au 7eme jour.

Le figure 20 ci-dessous indique le taux d'abattement des composés phénoliques par les souches endogènes.

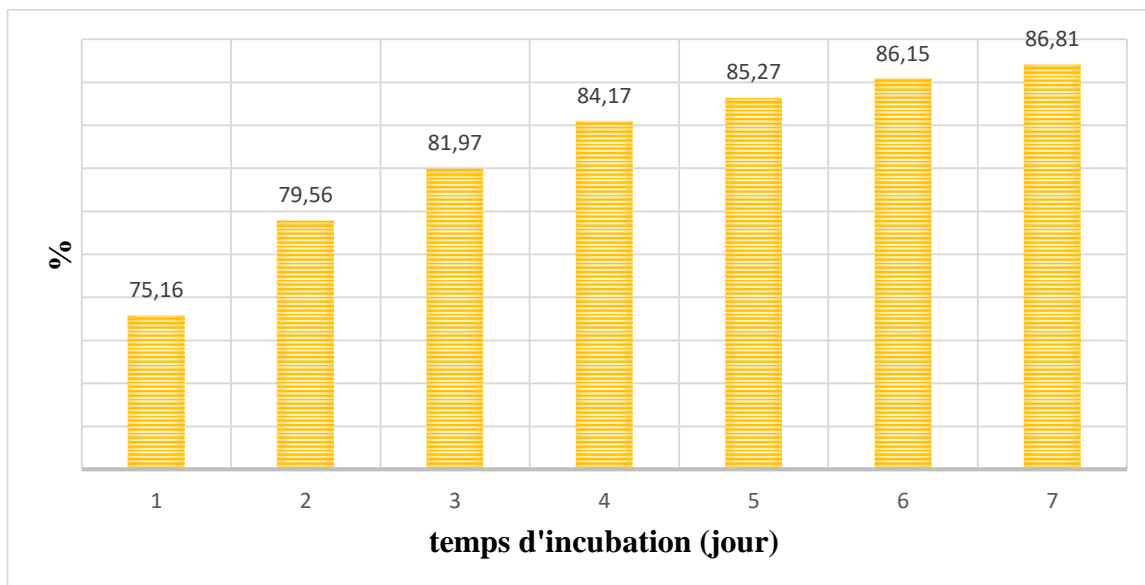


Figure 20 : Le taux d'abattement des CP par la microflore endogène.

I.4.1.1. Analyse du produit de la biodégradation par IR(ATR)

Les extraits obtenues de la margine ce présent sous forme d'un résidu semi-solide, de couleur jaune- marron, et ils sont caractérisés par une forte odeur de concentré d'olive.

Afin de déterminer la nature du produit de biodégradation, une analyse IR a été effectuée sur 3 prélèvement (2, 4 et 7eme jour), ainsi que l'extrait poly phénolique à T_0 , ci-dessous les spectres caractéristiques pour chaque jour (figure 21-22-23).

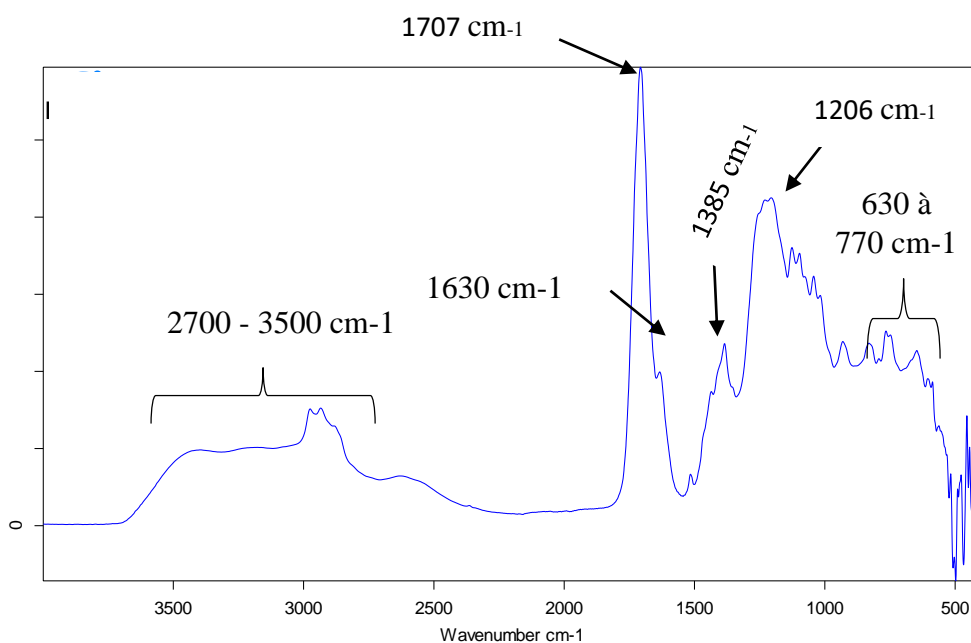


Figure 21 : Spectre IR (ATR) d'absorbance de l'extrait poly phénolique

L'analyse du spectre infrarouge de l'extrait (Figure 24) montre la présence d'une large bande dans la région entre 2700 et 3500 cm^{-1} associée à l'élongation O-H observée pour les acides, il montre aussi une bande à 1707 cm^{-1} liée à la présence de la liaison C=O, une bande liée à la présence de la liaison C=C à 1630 cm^{-1} , dans la région entre 1206 cm^{-1} et 1385 cm^{-1} elle est caractéristique pour l'élongation C-O et la déformation O-H pour les phénols et pour la région allant de 630 à 770 cm^{-1} elle caractérise les liaisons =C-H aromatique.

Cette analyse nous a permis de mettre en évidence le caractère acide de notre extrait lié à la prédominance des acides phénoliques dans la margine [55].

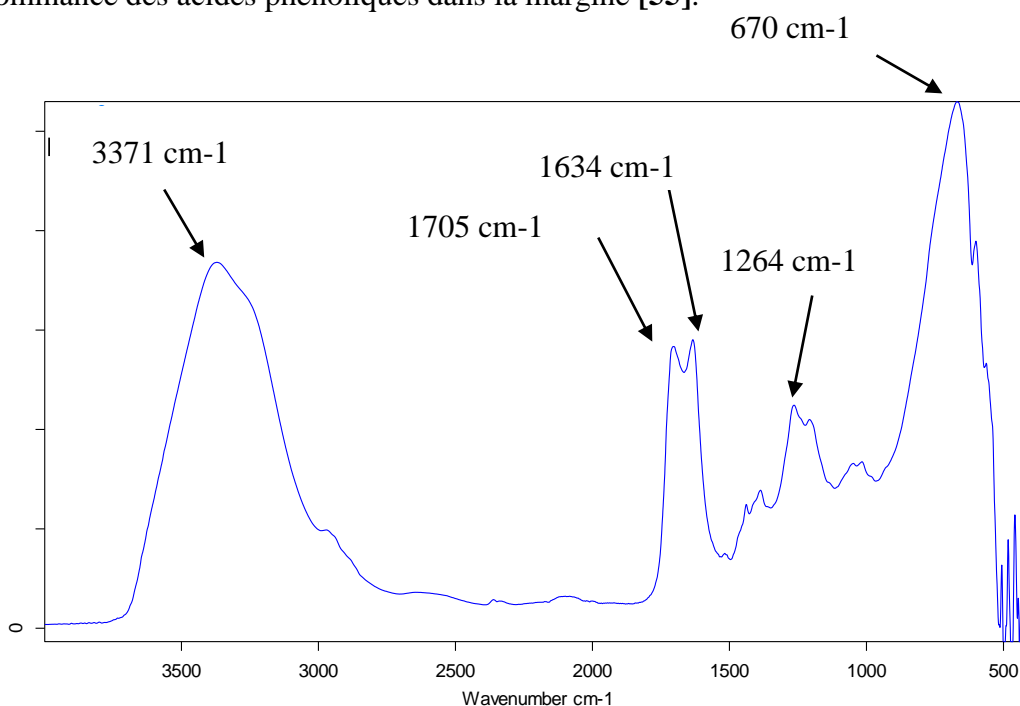


Figure 22 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation Jour 2

La figure 22 représente spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation au Jour 2, d'après les résultats obtenus, on observe :

- Un pic assez large et arrondi entre 3200 et 3400 cm^{-1} qui met en évidence la présence de -O-H (alcool)
- Une bande d'absorption à 1705 cm^{-1} caractéristique de la liaison C=O
- La bande d'absorption autour de 1634 cm^{-1} met en évidence la présence de liaison C=C
- Entre 1206 cm^{-1} et 1385 cm^{-1} une bande caractéristique pour l'élongation C-O et la déformation O-H pour les phénols
- Dans la région allant de 630 à 770 cm^{-1} une intense bande d'absorption caractérise les liaisons =C-H aromatique.

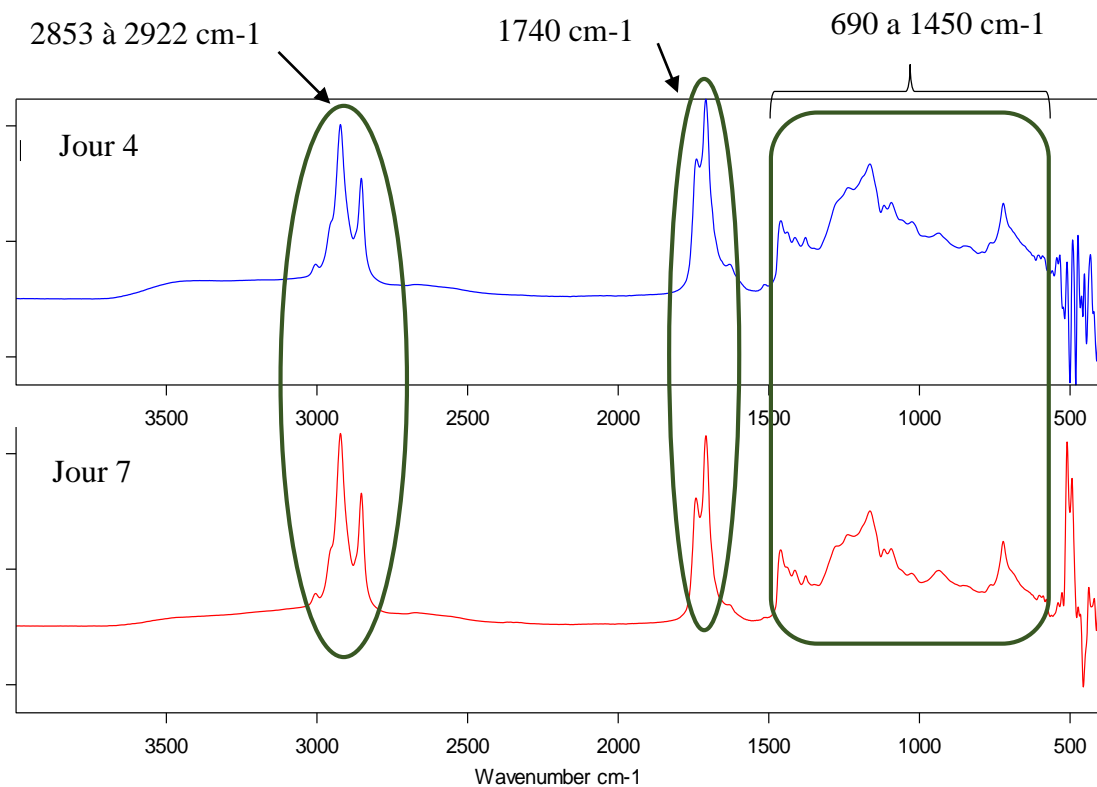


Figure 23 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation Jour 4 et 7

La figure 23 représente spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation au Jour 4 et 7, d'après les résultats obtenus, on observe :

- Deux pic entre 2853 à 2922 cm^{-1} caractéristique de la liaison C-H et un pic à 1740 cm^{-1} lié à l'élongation C=O qui mettent en évidence la présence de la fonction H-C=O (aldéhyde)
- Dans la région allant de 690 à 1450 cm^{-1} des bandes d'absorption caractérise les liaisons =C-H et C=C aromatiques.

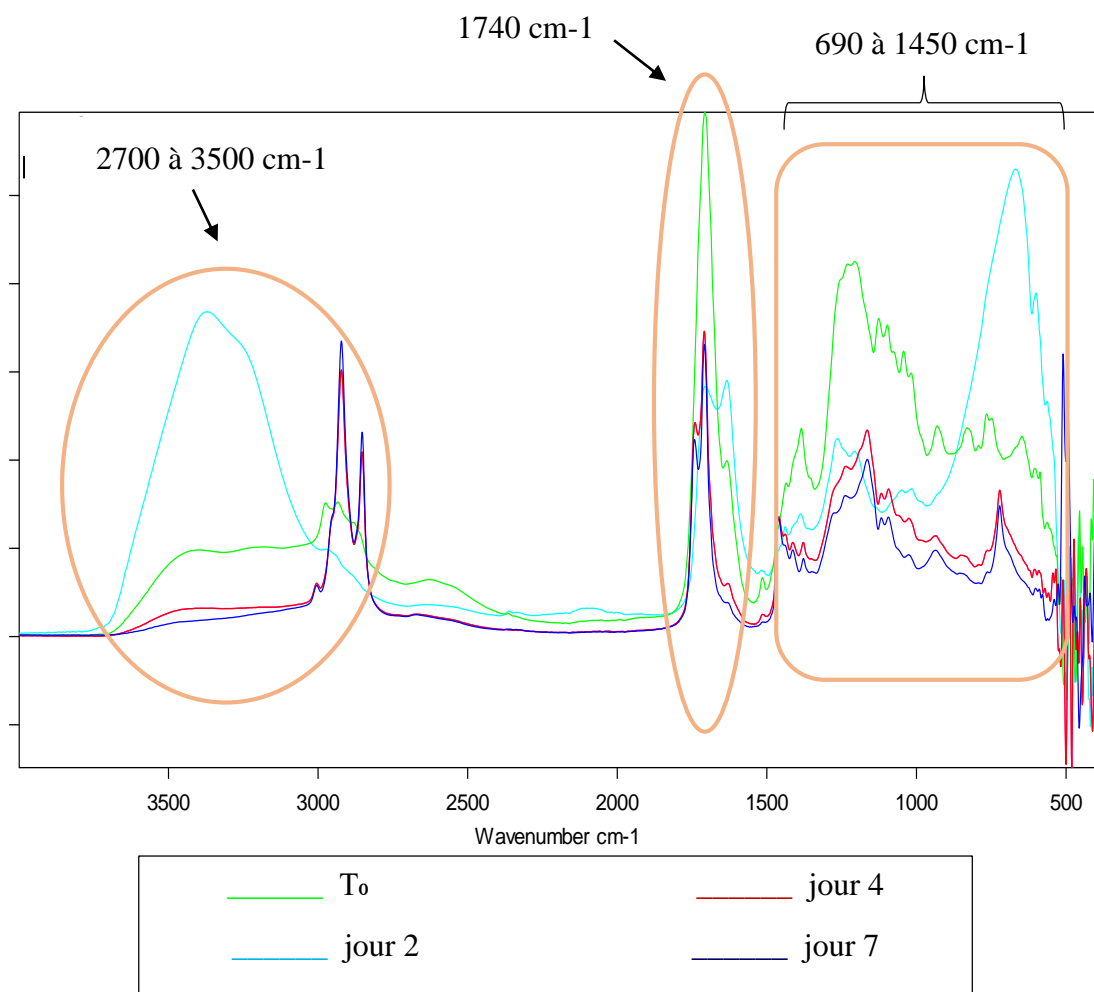


Figure 24 : Spectre IR(ATR) d'absorbance montrant l'évolution de la biodégradation

D'après les résultats rapportés dans la figure 24, on constate que dans la région 2700 - 3500 cm⁻¹ montre la réduction de la fonction acide (T₀) en alcool (jour 2) aboutissant à une oxydation formant la fonction aldéhyde (jour 4/7), une diminution de l'intensité dans la région 1740 cm⁻¹ ainsi que dans la région 690 à 1450 cm.

I.4.2. Par des souches sélectionnées « margine stérile »

I.4.2.1. Suivi cinétique de la biodégradation par dosages des composés phénoliques totaux

À partir de la courbe d'étalonnage, les concentrations des composés phénoliques totaux après dégradation par AZ4, AZ3, 3'R, 17R sont représentées dans la figure 25, la teneur en composés phénoliques est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (**mg EAG/g**) :

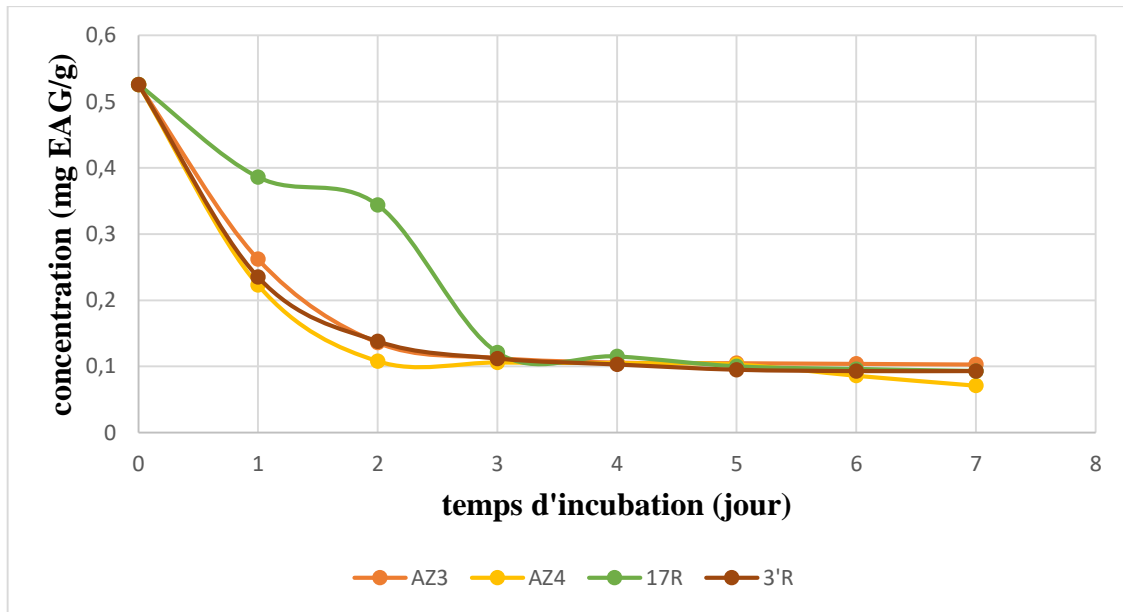


Figure 25 : cinétique de la biodégradation des CP par des souches sélectionnées.

Le profil cinétique de la biodégradation des CP révèle diminution significative de concentration au cours des trois premiers jours pour AZ3, AZ4 et 3'R jusqu'à plus de 70 %, tandis que pour 17R il a fallu un temps d'adaptation (3 jours) pour enfin se stabiliser comme le démontre la figure 26 ci-dessous.

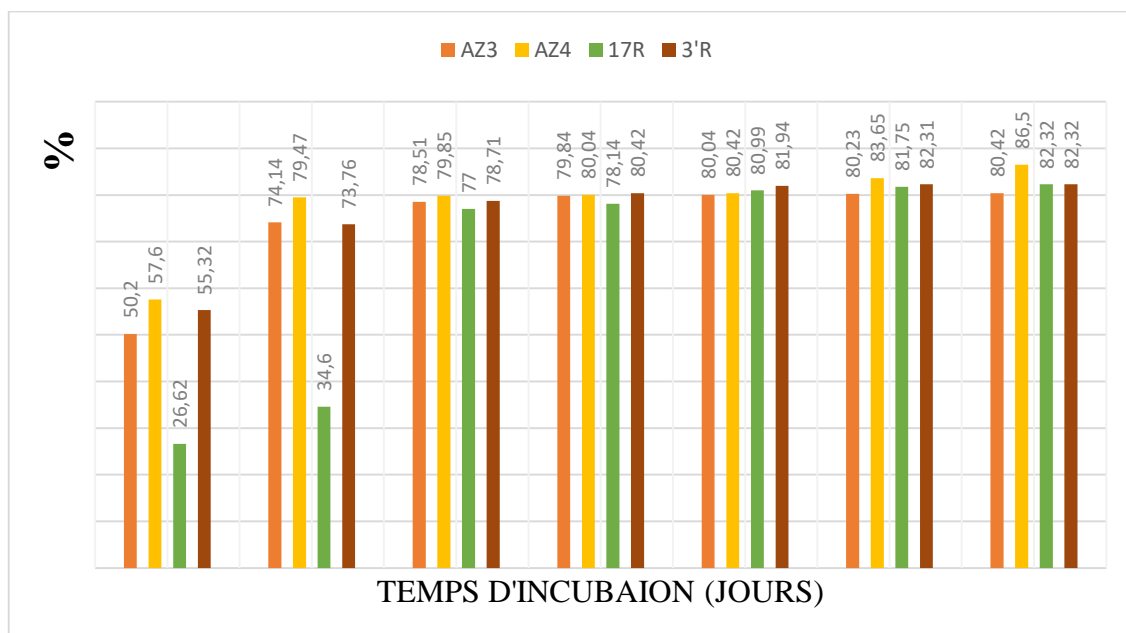


Figure 26 : Le taux d'abattement des CP par des souches sélectionnées.

I.4.2.2. Analyse du produit de la biodégradation par IR(ATR)

L'analyse IR a été effectuée sur 3 prélèvements (2, 4 et 7ème jour) pour chaque souche afin de mettre en évidence la nature du produit de biodégradation.

I.4.2.2.1. La souche 3'R

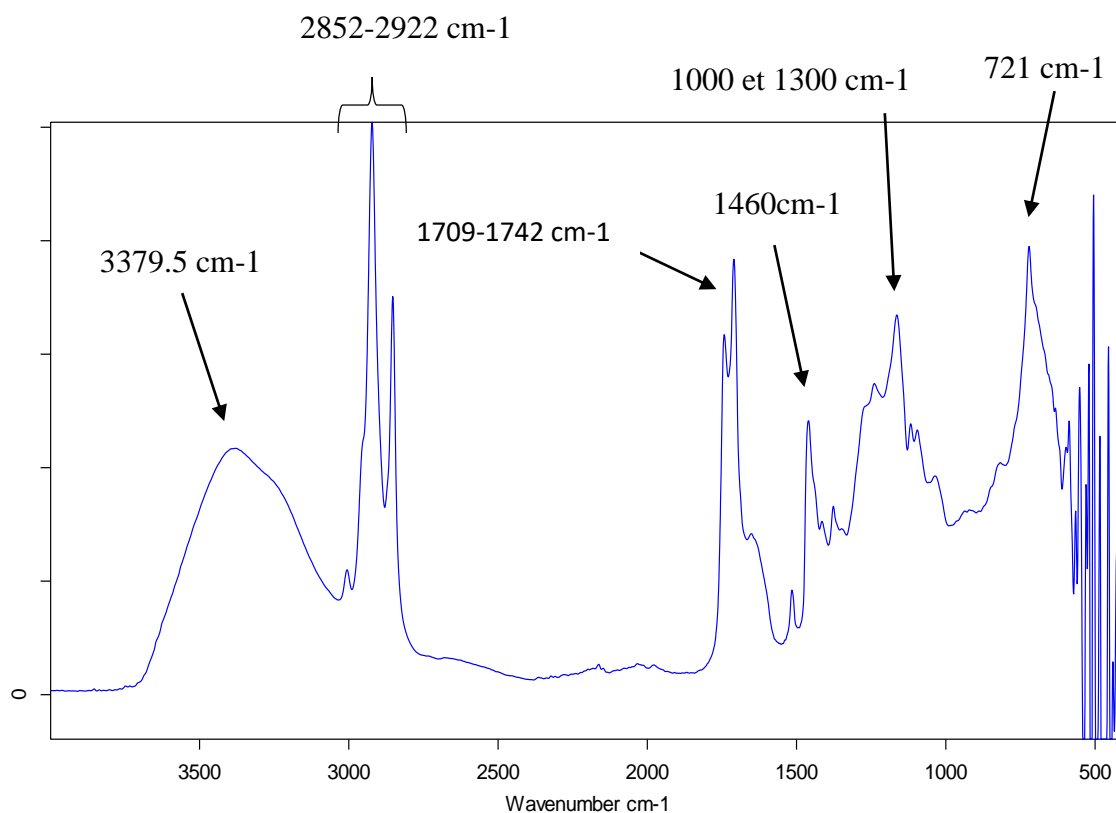


Figure 27 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation par 3'R Jour 2

La figure 27 représente spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation du jour 4 par 3'R, d'après les résultats obtenus, on observe :

- Une large bande forme symétrique dans la région 3379.5 cm⁻¹ associée à l'élongation O-H observée pour les alcools, confirmée par la présence d'une bande C-O entre 1000 et 1300 cm⁻¹
- Deux bandes d'intensité moyenne vers 2852-2922 cm⁻¹ caractéristiques à une liaison C-H aldéhyde ;
- Une bande d'intensité moyenne dans la région 1709-1742 cm⁻¹ liée à la présence de la liaison C=O ;
- Une bande vers 1460 cm⁻¹ et une vers 721 cm⁻¹ caractérisant les liaisons =C-H et C=C aromatiques.

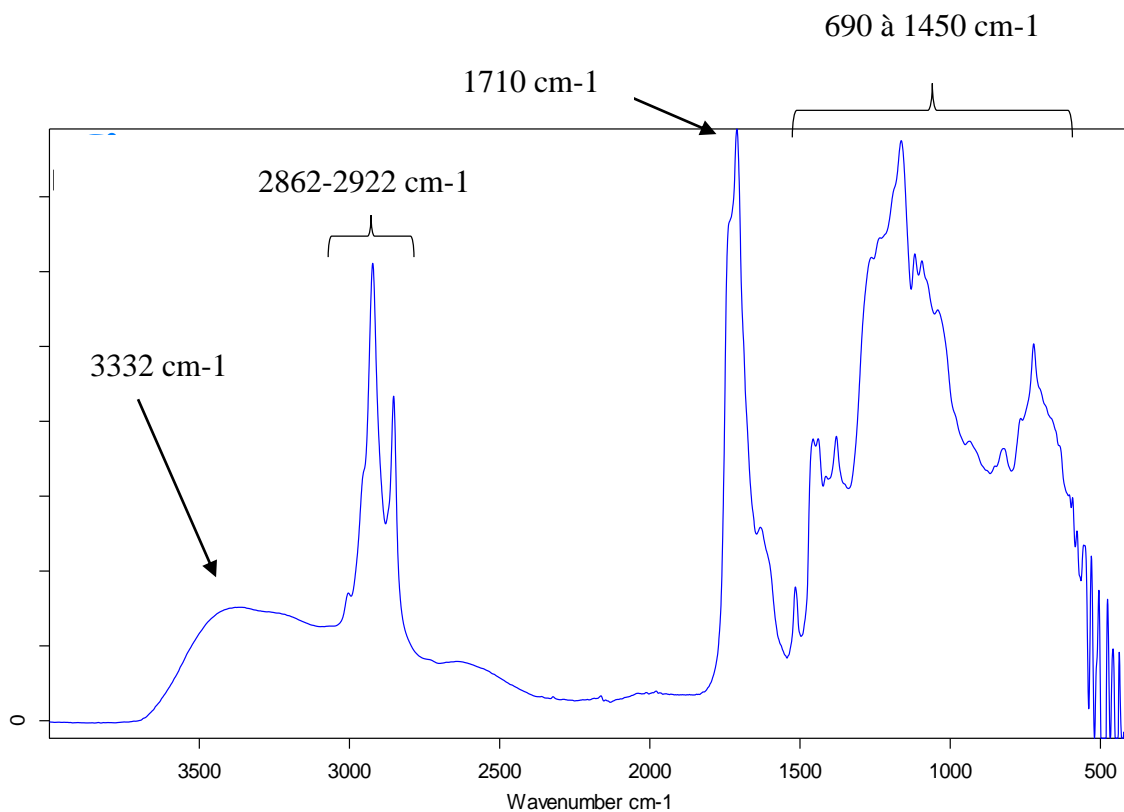


Figure 28 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation par 3'R Jour 4

L'analyse de spectre infrarouge de l'extrait au quatrième jours montre une bande intense vers 1710 cm-1 correspond au liaison C=O, deux bandes vers 2862 et 2922 cm-1 qui caractérisent une liaison C-H aldéhyde, une bande vers 3332 cm-1 correspond un liaison O-H d'un alcool et dans la région allant de 690 à 1450 cm-1 des bandes d'absorption caractérise les liaisons =C-H et C=C aromatiques.

En ce qui concerne le jour 7 (figure 29), on observe la présence des mêmes bandes caractéristique.

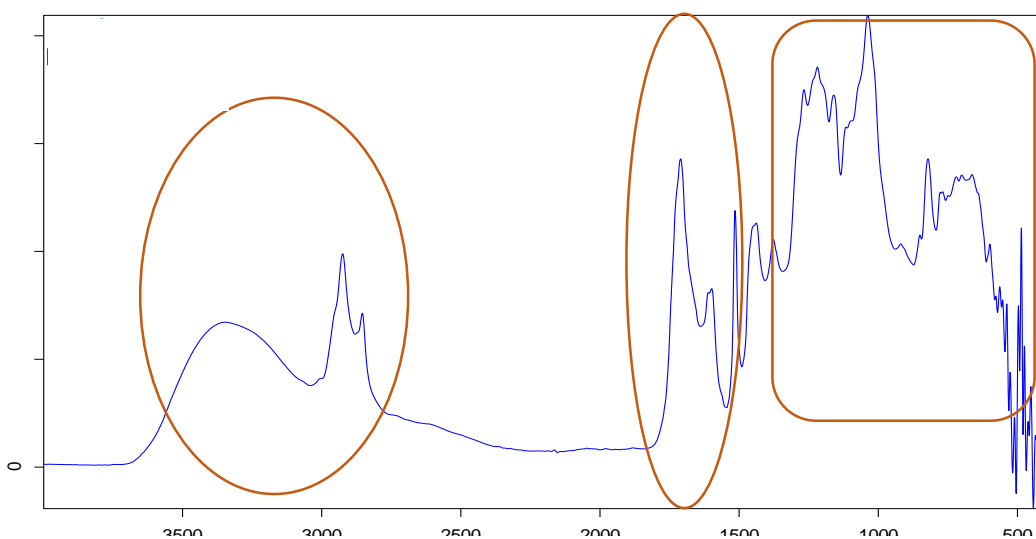


Figure 29 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation par 3'R Jour 7

A l'issue de cette analyse le composé final de la biodégradation par 3'R est constitué d'alcool (phénols) et d'aldéhyde.

I.4.2.2.2. La souche 17R

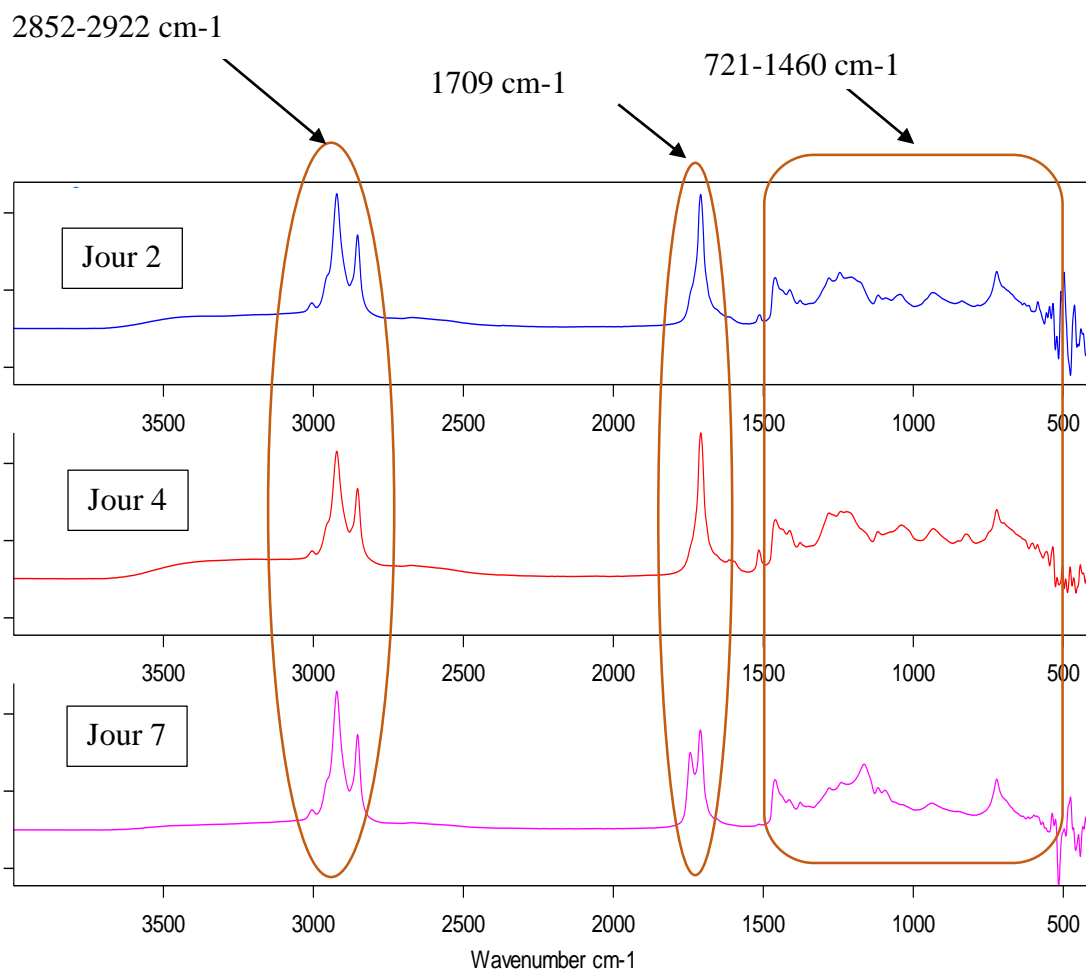


Figure 30 : Spectre IR (ATR) d'absorbance des produits de biodégradation

L'analyse des spectres infrarouge (jour 2 ;4 et 7) montre la présence deux bande intense vers 2852-2922 qui caractérisent la liaison C-H d'un aldéhyde, une bande intense dans la région 1709cm-1 liée à la présence de la liaison C=O, une bande vers 1460cm-1 liée à la présence de la liaison C=C, et une bande vers 721 cm-1 caractéristique de la liaison =C-H aromatique.

Les extraits de biodégradation par 17R sont des extraits aldéhydiques.

I.4.2.2.3. La souche AZ4

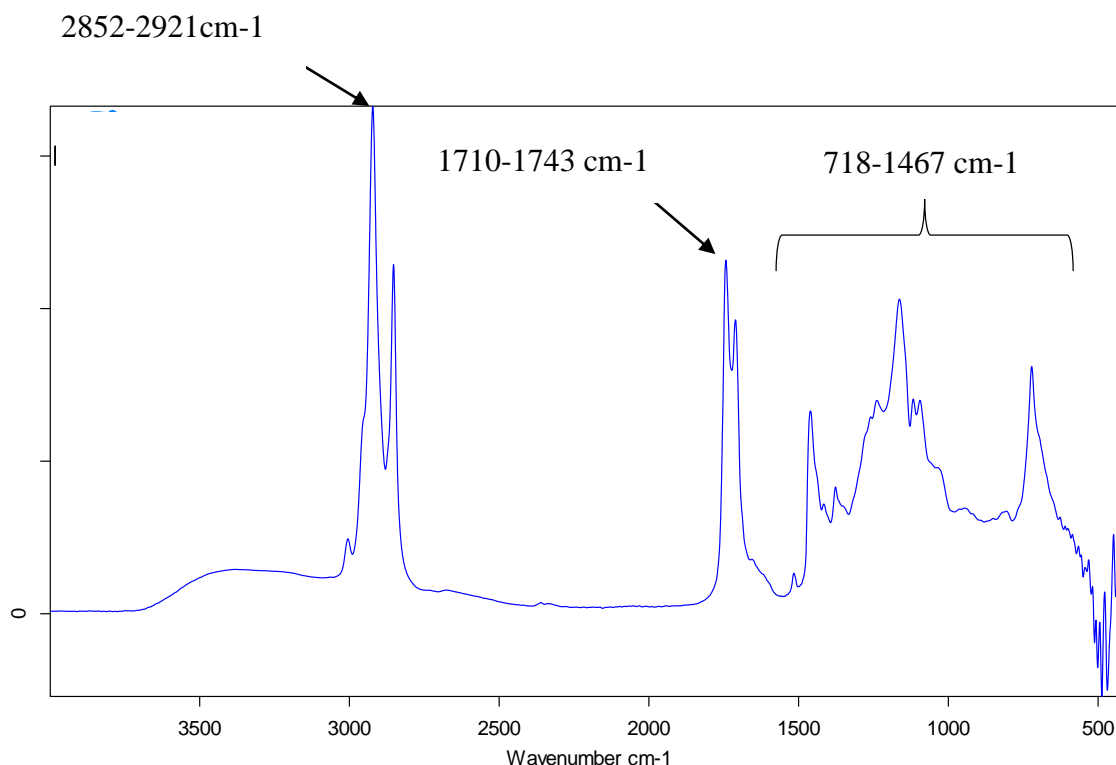


Figure 31 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation par AZ4 Jour 2

L'analyse du spectre infrarouge de l'extrait du deuxième jour montre la présence de deux bandes intenses vers 2852-2921 cm-1 caractéristiques d'une liaison C-H aldéhyde, une bande intense dans la région 1710-1743 cm-1 liée à la présence de la liaison C=O, une bande vers 1460 cm-1 et 721 cm-1 liées à la présence de la liaison C=C et =C-H aromatique.

La figure 32 ci-dessous représente spectre IRTF d'absorbance du produit de biodégradation par AZ4 au Jour 4, d'après les résultats obtenus, on observe :

- une bande large d'intensité moyenne vers 3373 cm-1 qui correspond à la liaison O-H d'un alcool ou phénol
- Deux bandes intenses vers 2852-2922 cm-1 caractéristiques de la liaison C-H aldéhyde,
- Une bande intense dans la région 1709-1741 cm-1 liée à la présence de la liaison C=O,
- Une bande vers 1460 cm-1 et 721 cm-1 liées à la présence de la liaison C=C et =C-H aromatique.

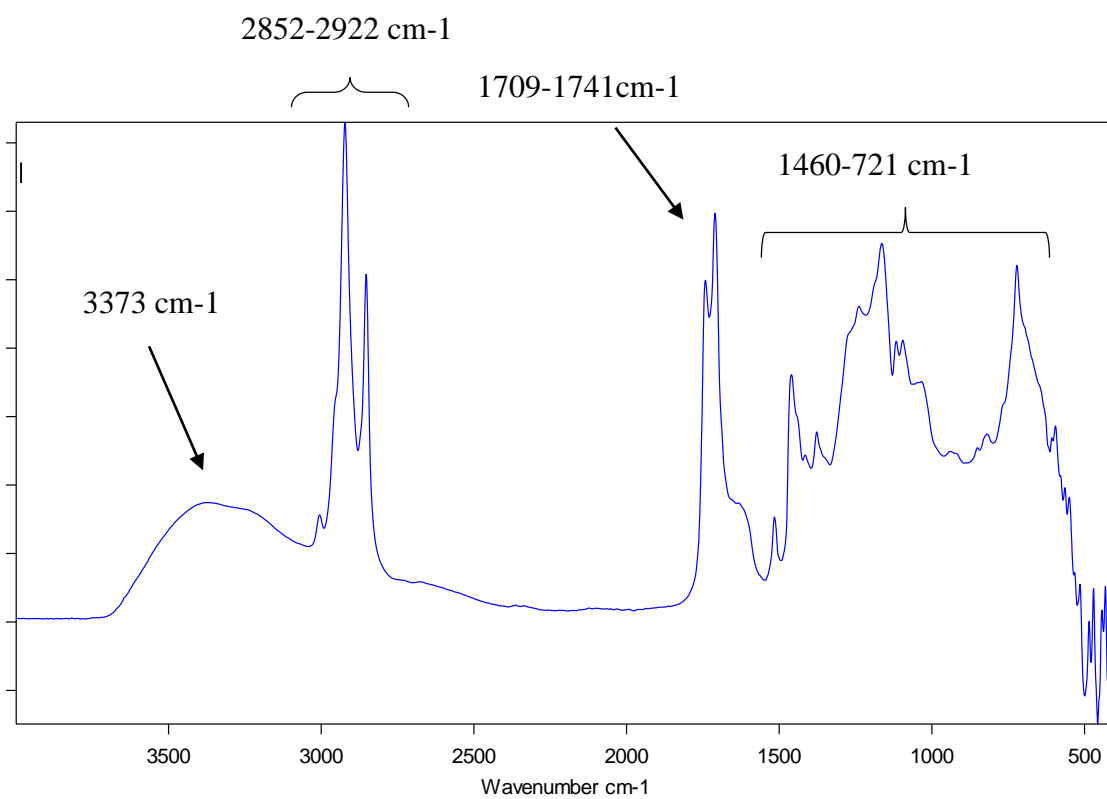


Figure 32 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation par AZ4 Jour 4

I.4.2.2.4. La souche AZ3

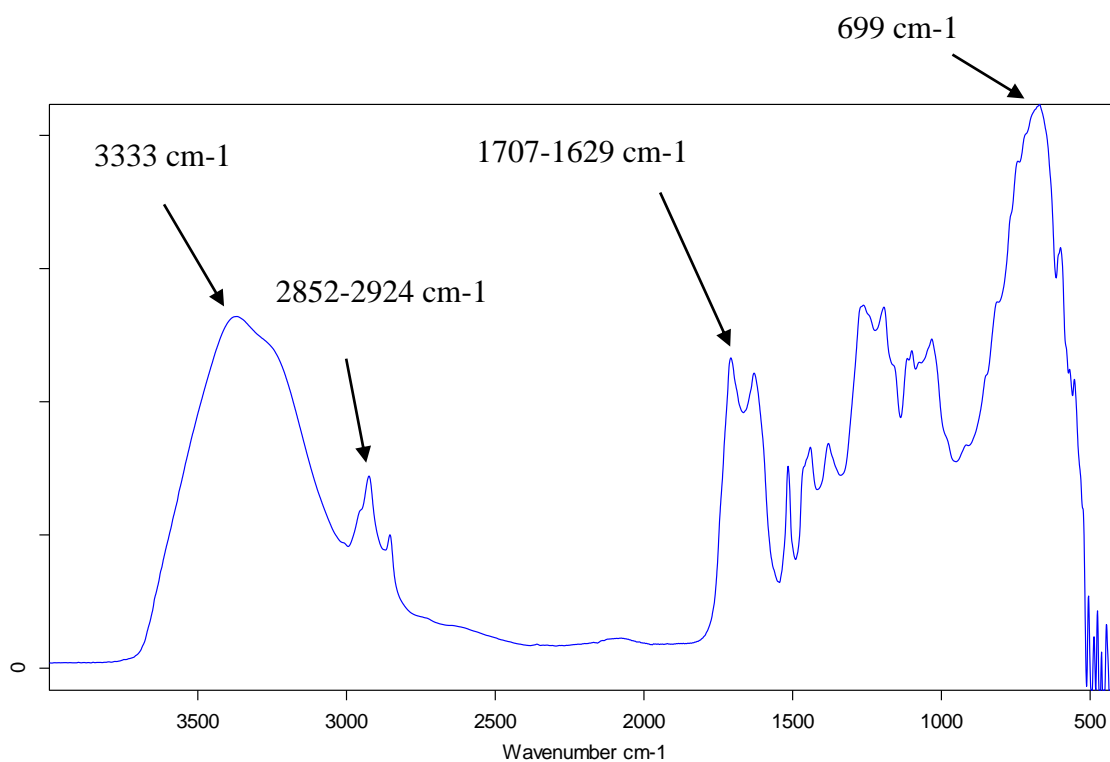


Figure 33 : Spectre IR(ATR) d'absorbance du produit de biodégradation par AZ3 Jour 2

L'analyse du spectre infrarouge de l'extrait du deuxième jour montre la présence d'une large bande dans la région 3333 cm^{-1} qui correspond à la liaison O-H d'un alcool, deux bandes d'intensité moyenne vers 2852-2924 cm^{-1} caractéristiques d'une liaison C-H aldéhyde, une bande d'intensité moyenne dans la région 1707-1629 cm^{-1} liée à la présence de la liaison C=O et vers 699 cm^{-1} une bande qui caractérise les liaisons =C-H aromatique.

Concerant l'analyse des spectres IF(ATR) d'absorbance du jour 4 et 7 (figure 34), on observe deux bandes intenses vers 2852-2922 cm^{-1} qui caractérisent la liaison C-H aldéhyde, une bande d'intensité moyenne dans la région 1709-17423 cm^{-1} liée à la présence de la liaison C=O, et dans la région allant de 699 à 1457 cm^{-1} des bandes qui caractérisent les liaisons =C-H et C=C aromatique.

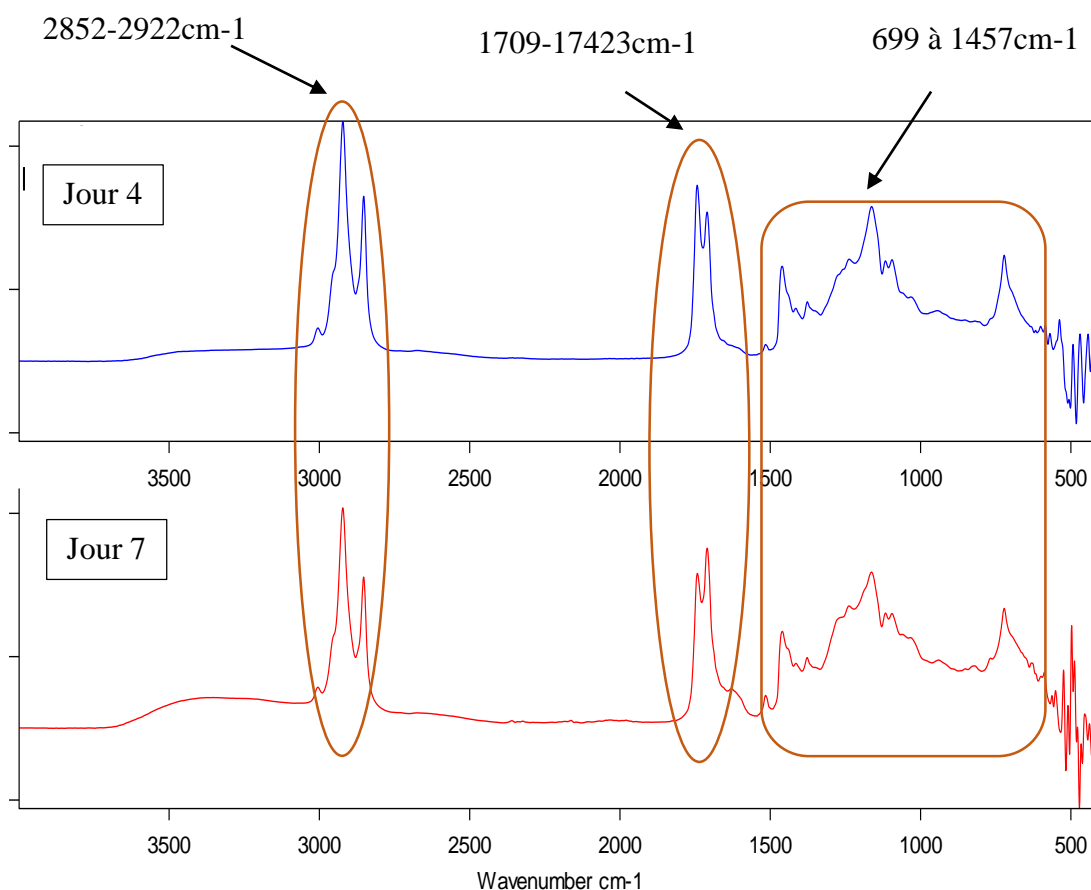


Figure 34 : Spectre IR(ATR) d'absorbance des produits de biodégradation par AZ3 Jour 4, 7

I.5. Étude de la biodégradation de l'extrait poly phénolique

I.5.1. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice

Dans le but de déterminer la concentration assimilable non inhibitrice du substrat, permettant d'estimer la sensibilité des 4 souches AZ3, AZ4, 3'R et 17R vis-à-vis de l'extrait poly phénolique, différentes concentrations ont été testées : 0,5 ; 5 ; 20 ; 50 mg/ml.

Nous avons constaté une absence totale de zones d'inhibition (figure 35) avec toutes les concentrations utilisées. Ceci montre la résistance de la souche 17R vis-à-vis du substrat étudié. Concernant la souche 3'R lorsqu'elle est soumise à des concentrations de 0,5 et 5 mg/ml de l'extrait poly phénolique, elle montre une résistance. Cependant à des concentrations 20 et 50 mg/ml, la souche est légèrement sensible au substrat étudié (Figure 36).

Pour les souche AZ3 et AZ4 on observe une sensibilité aux concentrations 5 ; 20 et 50 mg/ml, et une résistance lorsqu'elles sont soumise à une concentrations de 0,5mg/ml de l'extrait poly phénolique (Figure 37,38).



Figure 35 : Effet de concentration de l'extrait poly phénolique sur la croissance de 17R



Figure 36 : Effet de concentration de l'extrait poly phénolique sur la croissance de 3'R

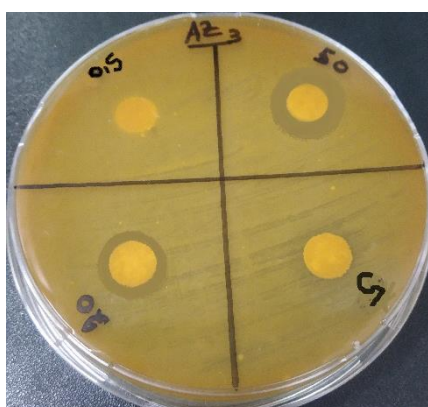


Figure 37 : Effet de concentration de l'extrait poly phénolique sur la croissance de AZ3



Figure 38 : Effet de concentration de l'extrait poly phénolique sur la croissance de AZ4

A partir de sur ces résultats, nous avons choisi la concentration de 0.5 mg/ml pour la suite du travail.

I.5.2. Cinétique de la biodégradation par mesure du culot bactérien

Les résultats sont représentés sur la figure 39.

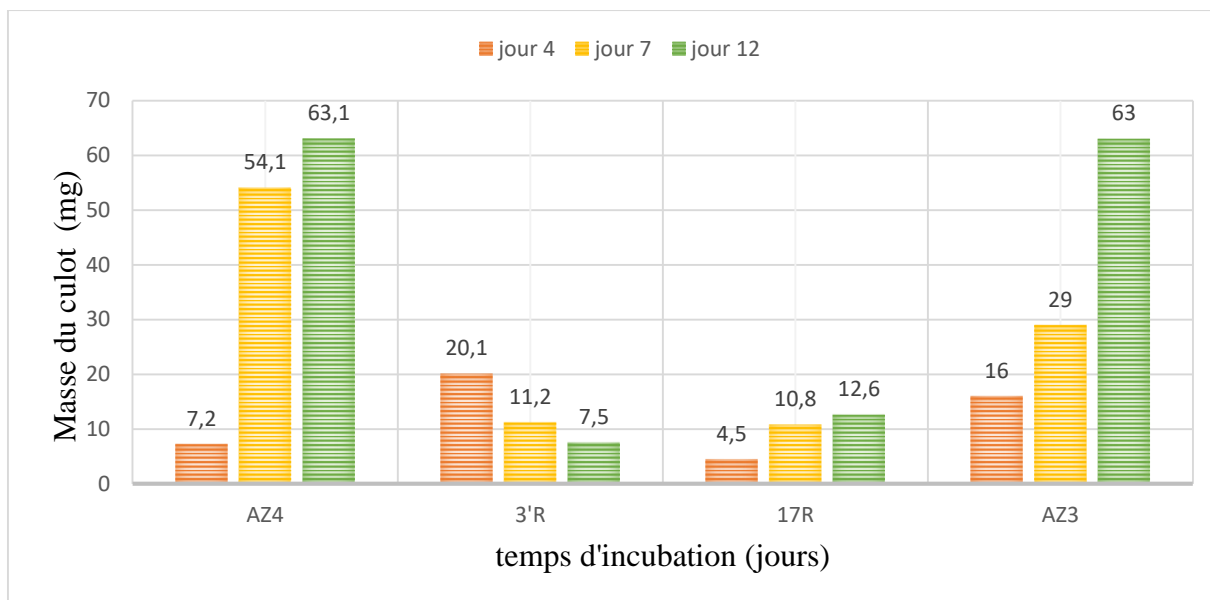


Figure 39 : Evolution du culot bactérien en fonction du temps

La figure ci-dessus montre l'évolution du Culot bactérien au fil des jours, on note que durant le jour 4 le culot de AZ4 était à 7,2 mg et au septième jour il y a eu une nette augmentation jusqu'à 54,1 mg ; au douzième jour la masse du culot a augmenté de 54,1 mg à 63,1 mg.

Quant à la souche AZ3 on a constaté que pour le jour 4 la masse était de 16 mg et durant le jour 7 et 12 on a relevé une grande augmentation de la masse allant de 29 mg à 63 mg.

Pour AZ4 et AZ3 la forte augmentation en culot bactérien confirme la croissance de ces souches utilisant comme seule source de carbone l'extrait poly phénolique. La biomasse était importante avec ces deux souches connues par la formation des mycéliums augmentant la biomasse.

Pour la souche 17R on a relevé une faible augmentation allant de 4,5 mg jusqu'à 12.6 mg au douzième jour, confirmant la faible croissance de la souche.

En ce qui concerne la souche 3'R on a constaté que durant le quatrième jours la masse de la souche était à 20,1mg, au septième jour on note une légère diminution arrivant à 11,2 mg et au jour 12 la masse a encore diminué allant jusqu'à 7,5 mg et cela est dû à la consommation totale de l'extrait engendrant par la suite la mort de la souche.

Les microorganismes de la margines peuvent être considérés comme les plus adaptés et résistants à la toxicité de ces rejets, et cela semble évident dans la figure 20. La diminution des polyphénols totaux est arrivée jusqu'à plus de 86% ce qui montre que les microorganismes dans les margines utilisent pour leur métabolisme, les produits du catabolisme des composés phénoliques. Donc, ces microorganismes empruntent des voies métaboliques secondaires.

Dans l'étude de la biodégradation des composés phénoliques, la dégradation des polyphénols a été mise en évidence par l'utilisation de quatre souches, à savoir :

- La souche 17R à pH=8.2 avec un taux d'abattement de 82% en composés phénoliques.
- La souche 3'R à pH=7.8 avec un taux d'abattement de 82% en composés phénoliques.
- La souche AZ3 à pH =6.8 avec un taux d'abattement 80% en composés phénoliques.
- La souche AZ4 à pH =7.2 avec un taux d'abattement 86% en composés phénoliques.

Ces résultats sont acceptables en termes d'efficacité biodégradative en référant à ceux obtenus par d'autres auteurs [75-76].

Cette situation indique que nos souches (17R, 3'R, AZ4 et AZ3) disposent soit de l'équipement enzymatique indispensable pour la dégradation de ces substances et/ou d'un système de détoxification approprié. Un ralentissement dans la biodégradation de ces composés est noté au-delà du troisièmes jours d'incubation. Ceci pourrait être attribué soit à l'épuisement des composés phénoliques biodégradables dans le milieu de culture, leurs bioconversions en composés phénoliques stables et non biodégradables ou à l'accumulation de produits intermédiaires plus toxiques que les produits d'origines.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le présent travail a été consacré à l'étude de la biodégradation des polyphénols présent dans la margine, cette dernière est caractérisé par une charge organique élevée et par un taux important en composés phénoliques. Trois stratégies ont été réalisés afin de suivre la biodégradation des polyphénols, la première par la microflore endogène de la margine, la secondes par des souches sélectionnées et la dernière stratégie c'est la dégradation des polyphénols de la margine après extraction.

L'analyse préliminaire par Infrarouge a Transformé de Fourier (IRTF) et colorimétrie, a montré la présence des composés phénolique dans la margine avec une teneur de 3.81g/l

La caractérisation physico-chimique de la margine issue de l'huilerie traditionnelle « AMARA ET FRERES » de la région de Tizi Rached a montré que cet effluent est caractérisé par un pH acide 4.84 en raison de la présence des acides organiques, Ceci peut être expliqué aussi par des réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques. Les teneurs en eau correspondent à 88.88% et à 36.7g/l de matière sèche, La teneur en MO était de 3.26/100g de poids frais, Concernant la teneur moyenne en MM des margines collectées était de 0.77g/100g de poids frais, cette valeur est faible à cause de la conservation des olives utilisées dans notre étude qui était faite en dehors de tout ajout de sel. Ceci pourra s'expliquer la valeur très faible de la conductivité électrique 6.2 mS/cm. pour finir la teneur en lipides représente 2.1%.

L'étude microbiologique de ces margines a révélé que les levures et les champignons respectivement de l'ordre de $2.22 \cdot 10^5$ UFC/mL et $7 \cdot 10^8$ UFC/mL se développent mieux que les bactéries, tandis que les bactéries sont de l'ordre de $2 \cdot 10^4$ UFC/mL. Ces microorganismes supportent le pH acide caractéristique de ces effluents, et résistent plus aux substances phénoliques.

Afin de déterminer l'activité antimicrobienne, le test est réalisé en utilisant 9 souches ATCC: un champignon, une levure et 7 bactéries du Gram positive et négative sont respectivement: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobactere sp*, *Enterobacter faecalis*, *Agrobacterium tumefaciens*. Les souches résistantes à l'extrait sont : *Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* , *Enterobactere sp*, *Aspergillus niger*.

La dégradation des polyphénols présents dans la margine par la microflore endogène, incubé pendant 7 jours à 30 °C et dosés ensuite par la méthode Folin-Ciocalteu, montre une diminution pouvant atteindre jusqu'à 86% en polyphénols, l'analyse par l'infrarouge permet de mettre en évidence la nature chimique des extraits qui varie entre l'acide, l'alcool et l'aldéhyde. La dégradation des ces polyphénols en utilisant quatre souches différentes (2 *Streptomyces* et 2 *Bacillus*) isolées à partir de l'algue brune *Asparagopsis armata* incubées pendant 7 jours /30 °C et dosés par la méthode Folin-Ciocalteu, ont montré une nette diminution (degradaton) en polyphenols. L'analyse par l'infrarouge montre la nature chimique des extraits qui sont généralement de nature aldéhydique par fois alcoolique.

Par ailleurs, la dégradation de l'extrait polyphénolique par les souches précédentes est suivi par évolution du culot microbienne et l'augmentation de ce dernier pour certaines souches confirme leur croissance par conséquent la consommation de l'extrait comme une source de carbone.

Les perspectives de recherche liées à cette thématique sont :

1. Identification moléculaire des souches à fort potentiel dégradatif des ployphénols.
2. La mise en évidence des produits intermédiaires issus de la biodégradation des polyphénols extraits des margines.
3. Essaies de biotransformation des produits issus de la biodégradation en d'autres produits à valeur ajoutés tels que les acides coumarique et caféique, connus par leurs roles bioconservateurs fortement employés dans le secteur agroalimentaire.

REFERENCES

REFERENCES

- [1] Mili S. « *Olive oil marketing on non-traditional markets: prospects and strategies* », *New Medit*, 5-27, (2006).
- [2] COI (Conseil Oléicole International), *Amélioration de la qualité de l'huile d'olives*. Madrid-Espagne, 10, (2005).
- [3] Chiofalo B., Liotta L., Zumbo A., Chiofalo V., *Small Ruminant Research*. 55,169-176, (2004).
- [4] Belaid C, Kallel M, et Elleuch B., Identification de nouveaux composés phenoliques present dans kes rejets liquides l'huileries d'olive (margines). *Dechet scientifique & technique*, 27, 30-34, (2002).
- [5] Nefzaoui A., Valorisation des sous - produits de l'olivier, *Options Méditerranéennes*, 101 -108 : Série A. Séminaires Méditerranéens, 16, (1991).
- [6] Rayan D., Robards K., Phenolic compounds in olives, *Analyst*, 123, 31-44, (1998).
- [7] COI, *Le monde oléicole, L'olivier*, Conseil Oléicole International, p1, (2006).
- [8] Alloum D., *L'oléiculture algérienne, l'olivier*, Paris : CIHEAM, *Options Méditerranéennes*, 24, 45-48, (1974).
- [9] Argenson C., Reigis S., Jourdin J.M., et Vaysse P., *L'olivier*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, 204, 07-09, (1999).
- [10] Chalabi A. *L'olivier et l'huile d'olive*. [http : iquebec.ifrance.com/tasacora/huiledolive](http://iquebec.ifrance.com/tasacora/huiledolive).
- [11] Amoretti MC, Comet G, *Le livre de l'olivier*. EDISUD, (1985).

- [12] Khaled R., Caractérisation physico-chimique et organoleptique des huiles d'olive vierges provenant de différentes variétés algériennes, Master 2 en sciences agronomiques, p2, Université Saad Dahleb de Blida, (2013).
- [13] Guignard J.L., Dupont F., *Botanique les familles des plantes*, Editions Masson, Paris, France. P 336, (2004).
- [14] Bianchi G. Lipides and phenols in table olive. *Journal Lipid Science Technology*, 105, 229-242, (2003).
- [15] Maymone B., A. Battaglini, M. Tiberio, Ricerche sul valore nutritivo della sansa diolive. *Alimentazione Animale*. 5, 219-250, (1961).
- [16] COI, Les données du COI conseil oléicole international pour la campagne oléicole 2017/18 montrent une augmentation interannuelle de la production d'huile d'olive, (2018).
- [17] APS (Algérie presse service), Les surfaces agricoles consacrées à l'oléiculture, (2018).
- [18] APS, Oléiculture : une production 6.844.606 quintaux (qx) en 2017, (2017).
- [19] Manel H.K., Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive, Doctorat en biologie, p9, Université de Sfax, (2013).
- [20] Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva- Sanchez M., Ramos-Cormenzana A. et Russell N. J., Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology*, 82, 25-39, (2009).
- [21] Amic A., C. Dalmaso, Unité de valorisation complète de déchets oléicoles par lombricompostage : Production de produits à haute valeur ajoutée : lombricompost, savon, collagène et lombrics. Master en sciences de l'environnement terrestre. Université Aix-Marseille. France p30, (2013).
- [22] Nefzaoui A., Valorisation des sous-produits de l'olivier, *Options Méditerranéennes*, 101-108 : Série A. Séminaires Méditerranéens, 1, 6, (1991).

- [23] Yaakoubi A., Chahlaoui A., Rahmani M., Elyachioui M., Oulhote Y., Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol, *Agrosolutions*, vol20 (1), 35-43, (2009).
- [24] Nefzaoui A., Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. In : M. Allaya (ed.). *L'économie de l'olivier*. Paris : CIHEAM, 1988. p. 153-173 (Options Méditerranéennes : Série Etudes ; n. 1988-V), (1988).
- [25] Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A., Panella A. et Fabio T., Environmental effects caused by olive mill waste waters: Toxicity comparison of lowmolecular- weight phenol compounds. *Journal Agricultural. Food Chemistry*, 51, 1005-1009, (2003).
- [26] Ranalli A., The effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation , *Olivae* ,38, 26-40, (1991).
- [27] Mouncef M., Tamoh S., Faid M., Achkari-Begdouri A., A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco ,*Grasas y Aceites*, Vol 44(6),p335-338], (1993).
- [28] Noubigh A., Abderrabba M., Provost E., Temperature and salt addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water, *Chemical Thermodynamics*, 39 (2), 297-303, (2007).
- [29] Ouabou E., Anouar A., Hilali S., Traitement de la margine brute d'huile d'olive par distillation suivi de neutralisation par la chaux, *Applied Biosciences*, 79, 6867-6872, (2014).
- [30] Fiestas Ros J.A., Borja Padilla R., Use and treatment of olive mill wastewater : current situation and prospects in Spain, *Grasas y Aceites*, vol43 (2), 101-106, (1992).
- [31] Salvemini F., Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercamente le acque di vegetazione delle olive, *Delle Sostanze Grasse*, 112, 559-564, (1985).

[32] Aissam H., Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase, Thèse de Doctorat national, Université sidi mohamed ben abdellah. Fes, 18, (2003).

[33] Capasso R., De Martino A., Arienzo M., Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters. *JAgric Food Chem*, 50 (10), 28-46-55, (2002).

[34] Fernandez Diaz M.J., Olives. In Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, 5, 379-397, (1983).

[35] Fiestas Ros J.A., Différentes utilisations des margines. Actes du Séminaire International sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). 93-110. Tunisie, (1981).

[36] Obied H., Allen M., Bedgood D., Prenzler P., Robards K., Stockmann R., Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste, *agricol. Food Chem.*, 53, 823-837. Doctorat national, Université sidi mohamed ben abdellah. Fes, 156, (2005).

[37] Aissam H., Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase, Thèse de doctorat national, Université sidi mohamed ben abdellah, Fes, 156. (2003).

[38] Aissam H., Errachidi F., Merzouki M., Benlemlih M., Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase, *Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé*, 7, 23-30, (2002).

[39] Aissam H., Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase, Thèse de doctorat national, Université sidi mohamed ben abdellah. Fes, 34, (2003).

[40] Morisot A., Tournier J.P., Répercussions agronomique de l'épandage d'effluents et déchets de moulins à huile d'olive, *Agronomie*, 6, 235-241, (1986).

- [41] Niaounakis M., Halvadakis CP., Olive processing waste management : literature review and patent survey. Typothito-George Dardanos. Athènes, Grèce, 430, (2006).
- [42] Oumaima G., Traitement des margines de la région du Fès, thèse de Master, 20, universite Sidi Mohamed Ben Abdellah, (2015).
- [43] Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis G., Antibacterial polyphenols from Olive Oil Mill Waste Waters, *Appl. Bacteriol*, 79, 393-398, (1995).
- [44] Zenjari B., El Hajjouji H., Ait Baddi G., Bailly JR., Revel JC., Nejmeddine A., Hafidi M., Reduction of toxic compounds during the composting of olive mill wastewater straw mixture, *Hazardous Materials* 138, 433-437, (2006).
- [45] Hamdi M., Future prospects and constraints of olive mill waste waters use and treatment: A. Review. *Bioprocess Engineering*, 8, 209-214, (1993).
- [46] M. Hamdi, Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry*, 31,105-110, (1996)
- [47] Karray Hamza M., Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive : une voie prometteuse de valorisation par la production de l'hydroxytyrosol naturel. Thèse de doctorat Université de Sfax, 94-95, (2008).
- [48] Ben Rouina B., Gargouri K., Taâmallah, H., L'utilisation des margines comme fertilisants en agriculture, Journées méditerranéennes de l'olivier, France, 16, (2002).
- [49] Sbai G., Loukili M., *Traitement des margines par un procédé couplant la coagulation floculation et la voie électrochimique*, *European Scientific Journal (ESJ)*, 11(9), 158-169, (2015).
- [50] Jail A., Boukhoubza F., Nejmeddine A., Duarte J.C., Sayadi S., Hassani L., Traitement des effluents d'huileries par un procédé combinant un traitement intensif (Jet-Loop Reactor) suivi d'un traitement extensif (bassins de stabilisation), *Environmental Technology*, 31(5), 533-543, (2010).

[51] Hamdi M., Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olives : l'utilité de la microbiologie industrielle. *Olivae*, 46, 20-24, (1993).

[52] Ranalli A., L'effluent des huiles d'olives : propositions en vue de son utilisation et son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. *Olivae*, 39, 18-34, (1991).

[53] Fki Ines, Allouche Nouredinne, Sayadi Sami, The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93, 197–204, (2005).

[54] Rayan D., Robards K. & Lavee S, Determination of phenolic compounds in olives by reverse-phase chromatography and mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 832, 87–96, (1999).

[55] Borja R., Banks C.J., Alba J., A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture. *Environ. Sci. Health., A*, 30 (3), 607-626, (1995).

[56] De Marco Elena, Maria Savarese, Antonello Paduano, Raffaele Sacchi, Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 104, 858–867, (2007).

[57] Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P.J., Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine*. 34(2), 243-253, (2003).

[58] Noipa T., Srijaranai S., Tuntulani T., Ngeontae W., New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*. 44, 798–806, (2011).

[59] Ghedira K., Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôle prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3 (04), 162-169, (2005).

- [60] Karamać M., Pegg R.B., Limitations of the tetramethylmurexide assay for investigating the Fe (II) chelation activity of phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(14), 6425-6431, (2009).
- [61] Macheix J.J., Fleuriet A. et Jay–Allmend C., Les composés phénoliques des végétaux. Collection biologie. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne, 192, (2005).
- [62] Wagner H., Bladf S., Zgainski E.M., plant drug analysis. Translated by Scott Th.A. Springer-Verlag, (1984).
- [63] Crozier A. Del Rio D. et Clifford M.N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 446–467, (2010).
- [64] Manach C., Mazur A. et Scalbert A., Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16, 1–8. (2005).
- [65] Bahorun T., Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne. Une source D’approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritia*, 83-94, (1997).
- [66] Zbakh H., El Abbassi A., Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: a review. *J Funct Foods*, 4, 53-65, (2012).
- [67] Obied H.K., Prenzler P.D., Konczak I., Rehman A.U., Robards K., Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative *in vitro* bioassays. *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 227-234, (2009).
- [68] Vissers M.N., Zock P.L., Roodenburg A.J., Leenen R. & Katan M.B., Apparent absorption of olive oil phenols in humans. *J. Nutr.*, 132, 409–417, (2002).
- [69] Berset C Bondini L., Rôles des polyphénols en alimentation et santé humaine. Compte rendu de la journée ACIA de 14 décembre 1999 IAA (12), 20-24, (2000).

[70] Mesbaiah F., « Etude de la biodégradation d'un hydrocarbure aromatique polycyclique "Naphtalène" et optimisation de la performance bacterienne en milieu PCN », Mémoire de MAGISTER, Université Blida 1, Algérie, (2011).

[71] Kurola J., « Microbial activities in boreal soils: Biodegradation of organic contaminants at low temperature and ammonia oxidation » Academi Dissertation in Environmental Ecology, (2006).

[72] Allen, R. C., Kotz, A. L., Carlson, L. W., Nevitt, T. J. et coll., Optical film with co-continuous phase, US Patent 7057816, (2006).

[73] Tsai C.C., Shih, H.H., Lai, H.M., Biodegradable Porous Devices for Tissue Engineering, US patent 20030072790, (2003).

[74] Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G., Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.*, 36 (19), 4735-44, (2002).

[75] Kissi M., Mountadar M., Assobhei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P., Sanna G., Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **57** (1-2), 221-6, (2001).

[76] Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi A., Zaid A., Borja R., Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International biodeterioration & biodegradation*, 51, 37-41, (2003).

[77] Ranalli A., The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 37, 30-39, (1991).

[78] Tovar J. Romo P. Girona J. et Motilva M.J., L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L cv Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes, *Journal of the science of food and Agriculture*. 82, 892-898, (2002).

- [79] De Marco Elena., Maria Savarese., Antonello Paduano., Raffaele Sacchi. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 104, 858–867, (2007).
- [80] Bcherrawi, N., Extraction des polyphénols des margines. Mémoire de fin d'études d'Ingénieur Agronome. Université Libanaise. 111, (2002).
- [81] Macheix J.J., Fleuriet A., Billo J.A., Fruit phenolics. Boca Raton Florida : CRC Press Inc., 378, (1990).
- [82] Ouabou E., Anouar A. et Hilali S., Traitement de la margine brute d'huile d'olive par distillation suivi de neutralisation par la chaux. *Journal of Applied Biosciences*. 79 :6867 – 6872, (2014).
- [83] Belaid C., Kallel M., Khadhraou M., Lalleve G., Elleuch B. & Fauvarque J-F. Electrochemical treatment of olive mill wastewaters: Removal of phenolic compounds and decolourization. *Journal of Applied Electrochemistry*, 36, 1175–1182, (2006).
- [84] Zimbalatti G., A new and alternative technology to reduce the pollution caudes by oil mills; Seventh International Symposium on Agricultural and Food Processing Wastes (ISAFPW 95). American Society of Agricultural Engineers, 420-428, (1995)
- [85] Singleton V.L., Rosi J.A., *Am. J., Oenol. Vitic.* 16 -144, (1965).

ANNEXES

ANNEXE 1



pH mètre type HANNA



Evaporateur rotatif



Conductimètre de type
MARTINI instruments



Spectromètre UV/Visible
type Pharmacia Biotech

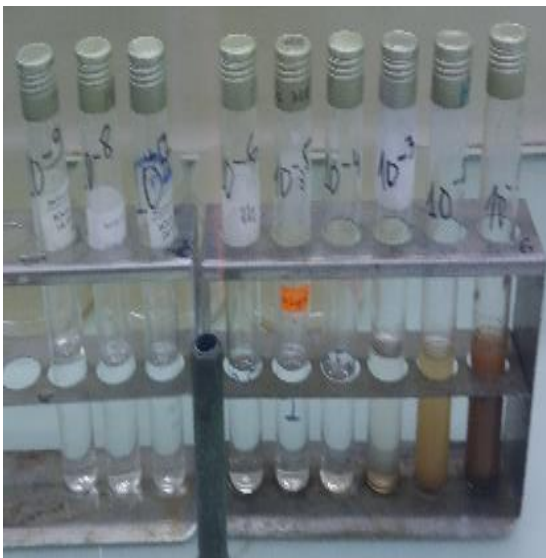
ANNEXE 2



Centrifugeuse type SIGMA



Etuve type BINDER



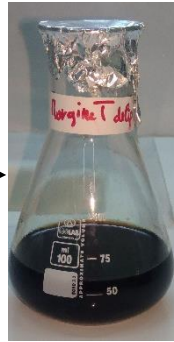
Fourre a moufle type Nabertherm

ANNEXE 3

Extraction des composés phénolique



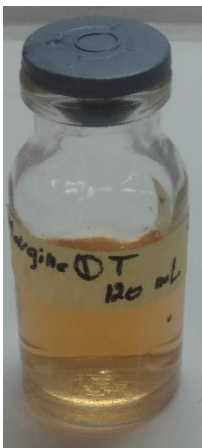
Délipidation à l'hexane



Margines délipidées



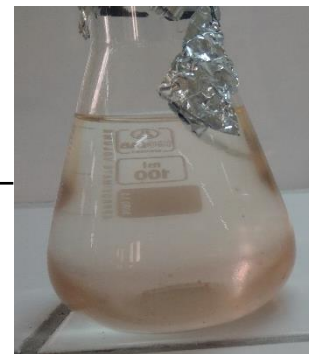
Extraction à l'acétate d'éthyle



Récupération du résidu sec dans 3ml de méthanol



Evaporation sous vide de l'acétate d'éthyle recueilli 40°C



Récupération du surnageant

ANNEXE 4

Composition chimique des milieux de culture utilisés

Microorganismes	Désignation	Composition
Champignons	Sabouraud solide	Peptone 10g, Glucose 20g, Agar 15g
Bactéries Levure 3'R 17R	Milieu Luria Bertani (LB)	Sa composition est : 10 g peptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g NaCl. Et pour LB solide On ajoute 20g Agar dans 1L d'eau distillé.
AZ3 AZ4	ISP2(Solide/liquide)	4g d'extrait de levure, 10g d'extrait de malte, 4g du glucose, et 20g d'agar bactériologie, dans 1L d'eau distille.
	Milieu Minimum (MM)	Ce milieu est à base de sels minéraux, sa composition (g/l) est : NH ₄ Cl (0,4), K ₂ HPO ₄ (0,3), KH ₂ PO ₄ (0,3), NaCl (10), MgCl ₂ (0,33), CaCl ₂ (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 ml de la solution d'oligoéléments.

La composition de la solution d'oligoéléments ETM est : 0,64 g CuSO₄·5H₂O ; 0,11g FeSO₄·7H₂O ; 0,79g MgCl₂·4H₂O et 0,15 g ZnSO₄·7H₂O dans 1L d'eau distillé.

ANNEXE 5



Incubateur agitateur

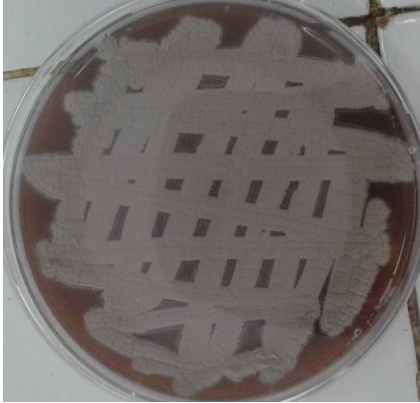


Autoclave

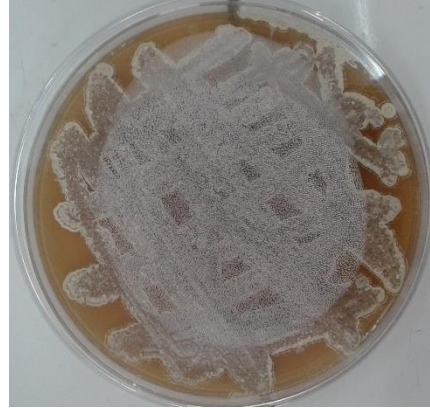


Incubateur statique

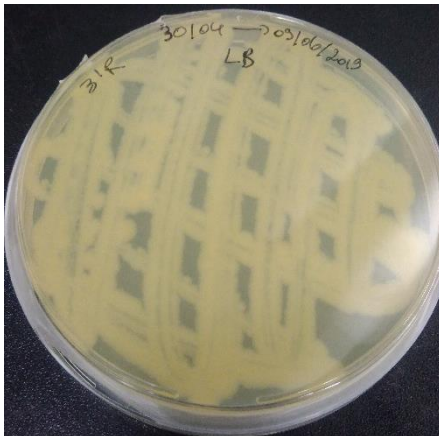
ANNEXE 6



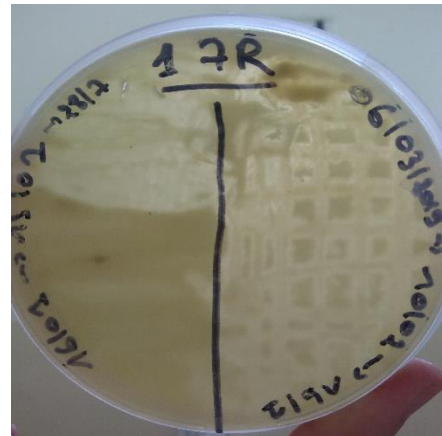
Repiquage de la souche AZ3



Repiquage de la souche AZ4



Repiquage de la souche 3'R

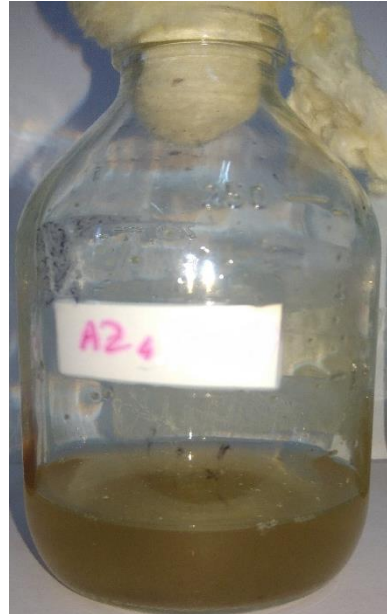


Repiquage de la souche 17R

ANNEXE 7



Préculture de la souche 17R



Préculture de la souche AZ4



Préculture de la souche 3'R



Préculture de la souche AZ4