

**UNIVERSITE BLIDA 1**

**Faculté des sciences**

**Département de Chimie**

**THESE DE DOCTORAT**

Chimie

Spécialité : Chimie des substances naturelles et de biomolécules

ETUDE CHIMIQUE ET VALORISATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES  
POLYPHENOLS DES MARGINES

Par

**Chahinez AIT SI SAID**

Devant le jury composé de :

O. BOURAS	Professeur, Université Blida 1	Président
H. BOUTOUMI	Professeur, Université Blida 1	Examineur
D. MEZIANE	Professeur, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou	Examineur
M. EL HATTAB	Professeur, Université Blida 1	Directeur de thèse
O. TOUAFEK	MCA, Université Blida 1	Codirecteur de thèse

Blida, 2024

## ملخص

يتعلق الجزء الأول لهذا العمل بالعمل بالتحليل الكيميائي وتقييم النشاط المضاد للميكروبات، المضاد للأكسدة و النشاط الوقائي الضوئي للزيت الأساسي والكسر المتبخر الذي تم الحصول عليه من المرج الخام ومستخلص أسيتات الإيثيل من بقايا معاصر الزيتون السائلة (المرج)، على التوالي، عن طريق التقطير المائي. كشف التحليل الكيميائي بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بقياس الطيف الكتلي عن غلبة المركبات الفينولية (25.71%، 60.36%) والأحماض الدهنية (37.62%، 38.25%) للزيت الأساسي والكسر المتبخر على التوالي. تم إختبار إثني عشر سلالة ميكروبية لمعرفة نشاطها المضاد للميكروبات. أظهرت النتائج التي تم تقييمها من حيث الحد الأدنى للتركيز المثبط ضد جميع السلالات أن الكسر المتبخر كان أكثر نشاطاً من الزيت الأساسي. تم التعبير عن النشاط المضاد للأكسدة بالتركيز المثبط ب 50% حيث أظهر عامل تركيز الزيت الأساسي (218 مكغم/مل) نشاطاً مضاداً أفضل من عامل تركيز الكسر المتبخر (244 مكغم/مل). لم يظهر تقييم عامل الحماية من أشعة الشمس أي قوة وقائية ضوئية.

يتناول الجزء الثاني فصل إثنين من مستخلصات أسيتات الإيثيل لنوعين من المرج التقليدي والحديث في عمود هلام السيليكا باستخدام خليط من الكلوروفورم والميثانول كوسيط متدرج مما أنتج سبعة كسور جزئية لكل مستخلص. تم إجراء تحاليل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المقترنة بقياس الطيف الكتلي وفوق البنفسجي على المستخلص الثاني وكسوره، لتحديد التركيب الكيميائي. وكانت المركبات الرئيسية هي الاحماض الفينولية والفلافونويدات. أظهر النشاط المضاد للميكروبات أعلى قيم تتراوح بين 1.56 إلى 6.25 ملغم/مل من المستخلص الأول، وأظهر الكسر الجزئي الرابع أفضل نشاط ضد البكتيريا *B. subtilis* و السلالات الفطرية *C. albicans* و *S. cerevisiae*. أظهر المستخلص الأول أعلى محتوى الفينولات، الفلافونويدات والنشاط المضاد للأكسدة في تثبيط الجذر 2،2- ثنائي الفينيل 1- بيكريل هيدرازيل، يليه الكسر الخامس بقيم تبلغ  $2.29 \pm 34.69$  و  $2.57 \pm 72.42$  (مكغم/مل)، على التوالي. من ناحية أخرى، أظهر المستخلص الثاني أقل نشاط مضاد للأكسدة وكان كسره الرابع الأفضل من حيث محتوى الفينولات، الفلافونويدات والنشاط المضاد للأكسدة في تثبيط الجذر 2،2- ثنائي الفينيل 1- بيكريل هيدرازيل ( $0.24 \pm 20.59$  مكغم/مل). أظهرت اختبارات مضادات الأكسدة من حيث تثبيط جذر أكسيد النيتروجين واختزال معادن النحاس والحديد للمستخلص الثاني وكسوره أن الكسر السابع كان الأفضل مع أنشطة قريبة من المعايير المستخدمة. بالإضافة إلى ذلك فإن كسور المستخلص الأول وتركيباتها الثنائية والثلاثية تتمتع بعامل حماية من الشمس عالي جداً.

حُصص الجزء الثالث للتحويل الحيوي لثلاثة أحماض فينولية، البيروجاليك، حمض الكينيك وحمض الفانيليك بواسطة 2 من الكائنات الحية الدقيقة، من السلالتين 3R و AZ3 من جنسي العصيات والعصيات الشحمية على التوالي، عن مركبات فينولية مختلفة ذات أنشطة بيولوجية مثيرة للاهتمام للغاية.

الكلمات المفتاحية : المرج، المركبات الفينولية، CG/SM، CL/SM، الأنشطة البيولوجية، التحويل الحيوي.

## ABSTRACT

The first part of this work concerns the chemical analysis and evaluation of the antimicrobial, antioxidant and photoprotective activity of the essential oil (EO) and the volatile fraction (VF) obtained from crude and ethylacetate extract of olive mill wastewater (OMW), respectively, by hydrodistillation. Chemical analysis by GC/MS and GC/FID revealed the predominance of phenolic compounds (25.71 %, 60.36 %) and fatty acids (62.37 %, 38.25 %) for VF and EO, respectively. The results evaluated in terms of minimum inhibitory concentration (MIC) against 12 souches microbiennes showed that, overall, VF was more active than EO, where EO (218  $\mu\text{g/mL}$ ) showed better antioxidant activity than VF (244  $\mu\text{g/mL}$ ) and no photoprotective power.

In the second section, two ethyl acetate extracts ( $\text{Ex}_1$  and  $\text{Ex}_2$ ) from two traditional and modern OMW are fractionated using a chloroform/methanol mixture as the eluent in gradient mode on a silica gel column. This results in seven distinct fractions of each extract. Two HPLC/DAD-UV and UPLC/ESI/MS/MS analyses of  $\text{Ex}_2$  and its fractions were carried out to identify the chemical composition. The main compounds were phenolic acids and flavonoids. The antimicrobial activity showed the highest MIC values ranging from 1.56 to 6.25 mg/mL for the total extract  $\text{Ex}_1$  and  $\text{Fr}_4$  showed the best activity against *B. subtilis* and the two fungal strains tested. The  $\text{Ex}_1$  showed the highest total phenols, flavonoids contents (TPT, TFT) and antioxidant activity for DPPH scavenging, followed by  $\text{Fr}_5$  with  $\text{IC}_{50}$  values of  $34.69 \pm 2.29$  and  $72.42 \pm 2.57$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), respectively. On the other hand,  $\text{Ex}_2$  showed the lowest antioxidant activity and  $\text{Fr}'_4$  was the best fraction in terms of TPT, TFT and antioxidant activity against DPPH ( $20.59 \pm 0.24$  ( $\mu\text{g/mL}$ )). The antioxidant tests in terms of inhibition of nitric oxide and reduction of copper and iron for  $\text{Ex}_2$  and its fractions showed good properties, particularly  $\text{Fr}'_7$ , which obtained very good results, close to the standards used. In addition, the  $\text{Ex}_1$ , its fractions and their combinations presented a very high sun protection factor.

The third part is reserved for the bioconversion of pyrogallol, quinic and vanilic acids by 2 microorganisms, a 3R bacterium and an AZ3 actinomycete, belonging to the *Bacillus* and *Streptomyces* genders, respectively. Biotransformation gave a mixture of phenolic compounds which present very interesting biological activities.

Keywords: Olive mill wastewater, Phenolic compounds, GC/MS, LC/MS, Biological activities, Bioconversion.

## RESUME

La première partie de ce travail concerne l'analyse chimique et l'évaluation de l'activité antimicrobienne, antioxydante et photoprotectrice de l'huile essentielle (HE) et de la fraction volatile (FV) obtenues à partir de la margine brute et de l'extrait d'acétate d'éthyle de margine, respectivement, par hydrodistillation. L'analyse chimique par CG/SM et CG/DIF a révélé la prédominance des composés phénoliques (25.71 %, 60.36 %) et des acides gras (62.37 %, 38.25 %) pour la FV et l'HE, respectivement. Les résultats évalués en termes de concentration minimale inhibitrice (CMI) contre 12 souches microbiennes ont montré que, dans l'ensemble, le FV était plus actif que l'HE, où l'HE (218 µg/mL) a montré une meilleure activité antioxydante que la FV (244 µg/mL) et ils n'ont montré aucun pouvoir photoprotecteur.

Dans la deuxième section, deux extraits d'acétate d'éthyle (Ex<sub>1</sub> et Ex<sub>2</sub>) provenant de deux margines traditionnelle et moderne sont fractionnés en utilisant un mélange chloroforme/méthanol comme éluant en mode gradient sur une colonne de gel de silice. Il en résulte sept fractions distinctes pour chaque extrait. Deux analyses CLHP/DAD-UV et CLUP/ESI/SM/SM de l'Ex<sub>2</sub> et ses fractions, ont été effectuées pour l'identification de la composition chimique. Les principaux composés appartiennent aux acides phénoliques et flavonoïdes. L'activité antimicrobienne a montré les valeurs de CMI les plus élevées pour l'Ex<sub>1</sub> allant de 1.56 à 6.25 mg/mL et la Fr<sub>4</sub> a montré la meilleure activité contre *B. subtilis* et les deux levures testées. L'Ex<sub>1</sub> a montré la teneur en phénols, en flavonoïdes (TPT, TFT) et l'activité antioxydante la plus élevée pour l'inhibition du radical DPPH, suivi par la Fr<sub>5</sub> avec des valeurs CI<sub>50</sub> de 34.69 ± 2.29 et 72.42 ± 2.57 (µg/mL), respectivement. D'autre part, l'Ex<sub>2</sub> a montré l'activité antioxydante la plus faible et la Fr'<sub>4</sub> était la meilleure fraction en termes de TPT, TFT et d'activité antioxydante contre le DPPH (20.59 ± 0.24 (µg/mL)). Les tests antioxydants en termes d'inhibition de l'oxyde nitrique et de réduction du cuivre et du fer pour l'Ex<sub>2</sub> et ses fractions ont montré de bonnes propriétés notamment la Fr'<sub>7</sub> qui a affiché de grandes performances proches de celles des standards utilisées. En outre, l'Ex<sub>1</sub>, ses fractions et leurs combinaisons présentent un facteur de protection solaire très important.

La troisième partie est réservée à la bioconversion du pyrogallol, des acides quinique et vanillique par 2 microorganismes, une bactérie 3R et une actinomycète AZ3, appartenant respectivement, aux genres *Bacillus* et *Streptomyces*. La biotransformation a conduit à un mélange de composés phénoliques dotés d'activités biologiques très intéressantes.

Mots clés : Margine, Composés phénoliques, CG/SM, CL/SM, Activités biologiques, Bioconversion.

## REMERCIEMENT

Louange à Dieu, le Tout-Puissant, de m'avoir accordé la force, le courage et la patience pour accomplir ce travail.

Tout d'abord, j'exprime mes profonds remerciements et ma gratitude à mes parents. Je suis sincèrement redevable à ma mère ZAHRA, à mon père SAID et à mes frères NABIL et Nassim de m'avoir donné la chance de m'améliorer, ainsi que pour leur amour inconditionnel, leur courage inépuisable et leur soutien inestimable. J'espère que les bénédictions de mes parents m'accompagneront toujours et je prie Allah Tout-Puissant de leur accorder santé, bonheur et longue vie afin qu'un jour je puisse leur rendre hommage pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma sincère gratitude à mon directeur de thèse, le Professeur Mohamed El Hattab, Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules à l'Université de Blida 1, qui m'a encadré tout au long de ce travail et m'a fait bénéficier de ses brillantes expériences. Je tiens particulièrement à le remercier pour ses conseils avisés, sa rigueur scientifique et les encouragements qu'il m'a apportés en me faisant confiance et en me permettant de m'épanouir tant sur le plan personnel que professionnel.

J'adresse également mes sincères remerciements à ma Co-promotrice, Mme Ouassila Touafek pour son encadrement rigoureux durant ces années.

Je remercie sincèrement toute l'équipe de recherche présente dans notre laboratoire, Abdelmalek Badis, Mohamed Réda ZAHY, Smain SABOUR, Zakia Zeffouni, Mzyene Fatima et Nacéra RIAD pour les conseils, l'aide et les encouragements continus qu'ils m'ont prodigués. Mes remerciements vont également au Professeur S. AKKAL pour son aide, son guide et ses encouragements.

Mes vifs remerciements vont aux Professeurs Yasmine Daghbouche, Naima Bouzidi et Souad Ouir pour leur gentillesse, conseils constructifs, encouragements et leur soutien scientifique.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse :

Monsieur Hocine Boutoumi, Professeur à l'Université Blida 1, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail de thèse. J'exprime également ma gratitude pour ses encouragements, sa modestie et sa gentillesse.

Monsieur Omar Bouras, Professeur à l'Université Blida 1, pour l'honneur et le privilège qu'il m'a accordé en acceptant d'être président et juge de ma thèse.

Madame Dalila Meziane, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinatrice et de juger ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à madame Professeur Ilkay Ordogan, Doyenne de la faculté de pharmacognosie à l'université de Gazi-Ankara - Turquie et ses docteur et doctorante Oresanya Ibukun et Nurten Abaci Kaplan pour leur accueil, encouragements et partage d'expériences.

J'adresse un merci tout particulier à mes collègues Mohamed Fekhar et Rania Larouci pour leur présence, aide et soutient dans le laboratoire et aux techniciennes de laboratoire également pour leur précieuse contribution.

Enfin, que tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

**La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information.**

**Albert Einstein.**

## TABLE DES MATIERES

ملخص	1
RESUME	2
Abstract	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	8
LISTE DES ABBREVIATIONS	13
INTRODUCTION GENERALE	15
1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	18
1.1. Généralités sur l'olivier	18
1.2. Généralités sur l'industrie oléicole nationale et internationale	18
1.3. Production et consommation nationale et mondiale	20
1.4. Systèmes d'extraction d'huile d'olive	22
1.5. Sous produits d'extraction d'huile d'olive	26
1.6. Valorisation des margines	28
1.7. Etude chimique des margines	32
1.8. Polyphénols des margines	35
1.9. Application de la bioconversion sur les margines	49
2. PREPARATION DE L'HUILE ESSENTIELLE ET LA FRACTION VOLATILE DE MARGINE, ANALYSE CHIMIQUE ET DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNE, ANTIOXYDANTE ET PHOTOPROTECTRICE	54
2.1. Méthodologie expérimentale	55
2.2. Résultats et discussion	67
3. EXTRACTION, FRACTIONNEMENT ET POTENTIALITES PHOTOPROTECTRICE, ANTIOXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS ET DES DIFFÉRENTES FRACTIONS DE MARGINES	85

3.1. Méthodologie expérimentale	86
3.2. Résultats et discussion	94
4. BIOCONVERSION DE TROIS COMPOSES PHENOLIQUES A L'AIDE DE DEUX SOUCHES ( <i>BACILLUS</i> ET <i>STREPTOMYCES</i> )	115
4.1. Etude de la bioconversion des acides phénoliques par des souches sélectionnées	116
4.2. Résultats et discussion	119
CONCLUSION	128
REFERENCES	132
APPENDICES	160

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1</b>	Répartition de l'olivier dans le monde	19
<b>Figure 1.2</b>	Carte de l'industrie oléicole d'Algérie	20
<b>Figure 1.3</b>	Répartition de la production d'olive en Algérie.	21
<b>Figure 1.4</b>	Principaux systèmes d'extraction de l'huile d'olive	24
<b>Figure 1.5</b>	Structure générale du noyau des flavonoïdes	37
<b>Figure 1.6</b>	Structures des éléments de la principale sous-classe des flavonoïdes	38
<b>Figure 1.7</b>	Structure de base des tannins	38
<b>Figure 1.8</b>	Structures chimiques de quelques stilbènes	39
<b>Figure 1.9</b>	Structure chimique de l'entérodiol	39
<b>Figure 1.10</b>	Exemple d'alcools phénoliques de margine	42
<b>Figure 1.11</b>	Structure des principaux sécoiridoïdes de margine	42
<b>Figure 1.12</b>	Quelques structures chimiques des flavonoïdes de margines	43
<b>Figure 1.13</b>	Pénétration des rayonnements solaires en fonction de la longueur d'onde	47
<b>Figure 2.1</b>	Organigramme de l'extraction des polyphénols de margine	58
<b>Figure 2.2</b>	Organigramme de l'obtention de l'HE et la FV de margine	59
<b>Figure 2.3</b>	Principe de l'activité antioxydante du DPPH	64
<b>Figure 2.4</b>	Spectres ATR-IRTF de la FV et l'HE extraite de margine	69
<b>Figure 2.5</b>	Teneur des différentes classes chimiques dans l'HE et la FV de margine	73
<b>Figure 2.6</b>	Interconnexion des voies de biosynthèse des différentes classes chimiques présentes dans l'HE et la FV.	75
<b>Figure 2.7</b>	Voies de bioconversion du limonène et du linalool à l'aide	77

d'*Aspergillus niger* et voies plausibles proposées (VP) menant au camphre et à l'isomenthol.

<b>Figure 2.8</b>	Variation du taux de piégeage du DPPH• par l'HE, la FV et l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations	81
<b>Figure 2.9</b>	Spectres UV de l'HE et la FV de margine à 2 mg/mL	83
<b>Figure 3.1</b>	Spectres ATR-IRTF de l'extrait de margine (M1) et de ses fractions	95
<b>Figure 3.2</b>	Profil chromatographique CLHP de l'extrait de margine Ex <sub>2</sub>	97
<b>Figure 3.3</b>	Profil chromatographique CLUP de l'extrait de margine Ex <sub>2</sub>	98
<b>Figure 3.4</b>	Courbes d'étalonnage de l'acide gallique	100
<b>Figure 3.5</b>	Courbes d'étalonnage de la quercétine	101
<b>Figure 3.6</b>	Comparaison des valeurs de TPT et TFT des extraits de margines et de leurs fractions	101
<b>Figure 3.7</b>	Diamètres d'inhibition de l'extrait de margine Ex <sub>2</sub>	104
<b>Figure 3.8</b>	Comparaison des valeurs de CI <sub>50</sub> des extraits de margines, de leurs fractions [2-7] et des antioxydants standards par la méthode du piégeage du DPPH•	107
<b>Figure 3.9</b>	Variation des FPS <sub>S</sub> en fonction des différentes concentrations de l'extrait phénolique de margine (Ex <sub>1</sub> )	110
<b>Figure 3.10</b>	Variations de FPS des fractions combinées	113
<b>Figure 4.1</b>	Extraction des produits de valeur par la bioconversion des acides phénoliques	118
<b>Figure 4.2</b>	Cinétique de croissance bactérienne des deux souches 3R et AZ3	119
<b>Figure 4.3</b>	Voies de biosynthèse du phénylpyruvate et 4-hydroxyphénylpyruvate proposées	122
<b>Figure 4.4</b>	Voies de bioconversion du pyrogallol proposées	123
<b>Figure 4.5</b>	Voies de bioconversion du pyrogallol au flavonoïde (10) proposées	124
<b>Figure 4.6</b>	Voies de bioconversion de l'acide quinique proposées	125
<b>Figure 4.7</b>	Voies de bioconversion de l'acide vanillique proposées	126

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1</b>	Comparaison entre les trois systèmes d'extraction	25
<b>Tableau 1.2</b>	Caractéristiques des grignons dans les trois systèmes d'extraction	26
<b>Tableau 1.3</b>	Principaux caractéristiques physicochimiques des margines	27
<b>Tableau 1.4</b>	Effets environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel	29
<b>Tableau 1.5</b>	Teneurs des sels minéraux des margines	35
<b>Tableau 1.6</b>	Classes de composés phénoliques selon le squelette des carbonés	36
<b>Tableau 1.7</b>	Représentation des groupes d'acides phénoliques présent dans les margines dérivants de l'acide hydroxybenzoïque	41
<b>Tableau 1.8</b>	Représentation des groupes d'acides phénoliques présent dans les margines dérivant de l'acide hydroxycinnamique	41
<b>Tableau 1.9</b>	Principaux radicaux libres et leur structure chimique	45
<b>Tableau 1.10</b>	Composés à haute valeur ajoutée obtenus par la bioconversion des margines	51
<b>Tableau 1.11</b>	Bio-composés obtenus après la bioconversion des produits phénoliques	52
<b>Tableau 2.1</b>	Souches microbiennes utilisées	62
<b>Tableau 2.2</b>	Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la FPS	66
<b>Tableau 2.3</b>	Propriétés organoleptiques de la fraction volatile et l'huile essentielle de margine	68
<b>Tableau 2.4</b>	Composition chimique de l'HE et la FV de margine	70
<b>Tableau 2.5</b>	Répartition des composés par classe chimique	72
<b>Tableau 2.6</b>	Valeurs des concentrations minimales inhibitrices de l'HE et la FV	79
<b>Tableau 2.7</b>	Activité antioxydante de l'HE et la FV de margine	81
<b>Tableau 2.8</b>	Activité antioxydante de l'acide ascorbique	81

<b>Tableau 2.9</b>	Valeurs des absorbances [290-320 nm] et FPS de l'HE et la FV de margine	83
<b>Tableau 3.1</b>	Rendement de fractions regroupées	94
<b>Tableau 3.2</b>	Comparaison de groupements fonctionnels dans les spectres ATR-IRTF entre l'extrait de margine Ex <sub>1</sub> et ses fractions	96
<b>Tableau 3.3</b>	Composés phénoliques identifiés dans l'extrait de margine Ex <sub>2</sub> et ses fractions par CLHP/DAD-UV	97
<b>Tableau 3.4</b>	Composés identifiés dans l'extrait de margine Ex <sub>2</sub> par UPLC-ESI/MS/MS	98
<b>Tableau 3.5</b>	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'Ex <sub>1</sub> et ses fractions	102
<b>Tableau 3.6</b>	Variation des taux de piégeage du DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'Ex <sub>1</sub> et ses fractions	105
<b>Tableau 3.7</b>	Variation des taux de piégeage du DPPH• en fonction des - différentes concentrations de l'Ex <sub>2</sub> et ses fractions	106
<b>Tableau 3.8</b>	Variation de l'activité antioxydante de l'Ex <sub>2</sub> et ses fractions par les tests de piégeage du NO• et de réduction du cuivre et du fer	109
<b>Tableau 3.9</b>	Variation des absorbances de l'extrait de margine Ex <sub>1</sub> à différentes concentrations	110
<b>Tableau 3.10</b>	Valeurs du FPS des fractions de colonne de l'extrait phénolique (Ex <sub>1</sub> ) à différentes concentrations	111
<b>Tableau 3.11</b>	Valeurs du FPS des fractions combinées à deux et à trois	112
<b>Tableau 4.1</b>	Produits obtenus par la bioconversion des 3 acides en utilisant les souches 3R et AZ3	120

## LISTE DES ABBREVIATIONS

ATCC :	American Type Culture Collection
ATR :	Attenuated Total Reflection (Réflectance totale atténué)
BHA :	Butyl- HydroxyAnisole
BHT :	Butyl-HydroxyToluène
CI :	Concentration inhibitrice
CID :	Collision-Induced Dissociation
CM :	Chorismate mutase
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
COI :	Conseil Oléicole International
CUPRAC :	Capacité antioxydante réductrice du cuivre
CG :	Chromatographie en phase gazeuse
CLHP :	Chromatographie liquide à haute performance
CLSI :	Institut des standards cliniques et de laboratoire
CLUP :	Chromatographie liquide à ultra performance
DAD :	Détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector)
DIF :	Détecteur à ionisation de flamme
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DPPH :	2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
DO :	Densité optique
DTGS :	Deuterated-TriGlycine Sulfate (Sulfate de triglycine deutéré)
EPS :	Exopolysaccharides
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène
ERN :	Espèces réactives de l'azote
ESI :	Electrospray Ionization (Ionisation par électronébuliseur)
FPS :	Facteur de protection solaire
FV :	Fraction volatile
FRAP :	Potentialité antioxydante réductrice du Fer
HE :	Huile essentielle
IRL :	Indice de rétention linéaire
IRTF :	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

ISP2 :	International Streptomyces Project
ITAFV :	Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne
LB :	Lauria Bertani
LOX :	Voie de la lipoxygénase
MADR :	Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
MEPS :	Micro-extraction en phase solide
MES :	Matière en suspension
MG :	Matière grasse
MS :	Matière sèche
NCTC :	National Collection of Type Cultures
NO :	Nitric Oxyde (Oxyde nitrique)
OMW :	Olive Mill Wastewater (Eaux usées du moulin à huile)
PDH :	Préphénate déshydrogénase
PI :	Pourcentage d'inhibition
PPS :	Produits de protection solaire
SM :	Spectrométrie de masse
TH :	Taux d'humidité
UFMS :	Ultra-Fast Mass Spectrometry
UV :	Ultra-Violet
VP :	Voie plausible

## INTRODUCTION GENERALE

Les produits naturels d'intérêt thérapeutique constituent une source potentielle pour le développement de nouveaux médicaments en raison de leur diversité chimique et biologique. Ces métabolites peuvent être utilisés pour lutter contre des pathologies diverses à cause de leur large spectre d'activités biologiques pouvant être valorisés dans le secteur de l'industrie pharmaceutique, parapharmaceutique et cosmétique.

Récemment, la recherche sur les substances naturelles s'est concentrée sur les déchets industriels, principalement les effluents liquides d'huileries d'olive (margines), qui sont les principales sources de pollution générées de manière saisonnière par le processus d'extraction de l'huile d'olive. La saison oléicole ne dure que 3 à 4 mois, d'octobre à février et la production rapide de grandes quantités de déchets liquides et solides représentent un défi environnemental majeur en raison de sa charge polluante élevée.

Il y a environ 900 millions d'oliviers dans le monde avec une capacité de production d'huile d'olive d'environ 3.379.000 tonnes par an, dont 850 dans la région méditerranéenne, ce qui représente plus de 95% de toutes les oliveraies [1]. La production de margine a été estimée à 30 millions de tonnes par an, dont 90 % sont produits dans le bassin méditerranéen et déversés dans les cours d'eau sans aucun prétraitement [2]. Cela représente en moyenne 100 litres de margine issus de la transformation de 100 kg d'olives, soit 1 mètre cube de margine équivalent à la pollution générée par 1 200 personnes [3].

Il est recommandé d'envisager une mesure préventive efficace et pratique avant d'éliminer ces résidus industriels afin de minimiser les dommages qu'ils causent. La forte concentration d'acides gras à longue chaîne et de composés phénoliques constitue une menace sérieuse pour les organismes marins et terrestres ainsi que pour les micro-organismes [4, 5].

L'Algérie est l'un des principaux pays méditerranéens avec l'un des climats les plus favorables à la culture des olives. Durant la saison oléicole (2019/2020), la production d'huile d'olive a augmenté de 15 % et elle est consommée pratiquement dans sa totalité dans les zones de production, avec 92 mille tonnes en 2019 car elle a été classée 6<sup>ème</sup> en comparaison avec les autres pays en termes d'approvisionnement [6].

Il y a trois principaux procédés pour produire de l'huile d'olive. L'un d'eux est la méthode traditionnelle, connue sous le nom d'extraction par pression, tandis que les autres sont les procédés à deux et trois phases. Tous ces procédés impliquent des étapes telles que le lavage des olives, le broyage, la centrifugation horizontale et la centrifugation verticale. Dans le procédé à deux phases, la centrifugation horizontale est effectuée sans ajout d'eau. Les résultats du procédé à trois phases sont une phase huileuse, un résidu solide et les eaux usées du moulin à huile (OMW) en tant que phase aqueuse.

Les margines sont notamment dommageables en raison de la charge en matière organiques, particulièrement, la présence de forte teneurs en polyphénols qui ne sont pas facilement biodégradables par la nature [7]. Il est donc essentiel de traiter ces effluents avant leur rejet, afin de limiter les dégâts environnementaux. Cet état de fait a conduit un certain nombre de chercheurs nationaux et internationaux à développer des modes de traitement et de valorisation des margines pour limiter leur pollution. La tendance actuelle est orientée sur des médicaments à base de produits naturels qui ont des propriétés fortes intéressantes et un large spectre d'activités contre les maladies microbiennes.

Cependant, ces résidus, riches en composés phénoliques, ont un grand potentiel pour une variété d'applications biologiques et industrielles. Plus de 99 % des composés phénoliques importants présents dans l'olivier sont présents dans les margines dont plus de 40 et 50 composés ont été isolés et caractérisés dans l'huile d'olive et la margine, respectivement. Les plus courants sont les acides phénoliques, les alcools phénoliques, les sécoiridoïdes, les tanins et les principaux constituants sont les flavonoïdes [8]. La composition complexe des composés

phénoliques présents dans la margine sont liées à certains facteurs tels que le type d'espèce et sa culture, l'origine et la localisation, la maturité des olives, le temps de stockage, les conditions climatiques et la procédure d'extraction, qui ont tous un impact direct sur les caractéristiques et la composition chimique totale de la margine [9]. Les extraits phénoliques de margine sont bien connus pour leur efficacité médicinale, car ils ont des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et antiprolifératives, ce qui traduit leur richesse en principes actifs [10-15]. La forte activité antioxydante des composés phénoliques leur confère une très bonne activité photoprotectrice, ce qui explique leur utilisation dans les formulations cosmétiques [16-18]. La bioconversion constitue une autre méthode de valorisation fort intéressante des effluents de margine, d'une part pour réduire la charge organique (biodégradation) et d'autre part pour améliorer la teneur en métabolites souhaités ou pour obtenir de nouveaux composés de valeur [19].

Cette étude s'intègre à cette large thématique et se fixe comme objectif la valorisation des margines et d'en extraire des produits à haute valeur ajoutée, mais aussi de les transformer via des réactions de bioconversion susceptibles d'améliorer la teneur en métabolites bioactifs. A cet effet, cette étude a s'est intéressée dans un premier temps à la caractérisation physico-chimique d'une margine récupérée d'une huilerie située à Larbaa- Blida et à la détermination de la composition chimique et à l'évaluation des propriétés bioactives en termes d'activités antimicrobienne, antioxydante et photoprotectrice de son huile essentielle (HE) et de sa fraction volatile (FV). La deuxième partie de ce travail a porté à déterminer les mêmes activités biologiques *in vitro* que celles des deux huiles, de deux extraits de deux margines différentes provenant d'huileries traditionnelle et moderne, ainsi que de leurs fractions. En outre, une étude de l'activité photoprotectrice des fractions de colonne combinée à deux et trois a été réalisée. La troisième partie consiste en l'étude de la bioconversion de trois acides phénoliques présents dans les extraits de margine par deux souches marines différentes, une bactérie et une actinomycète, isolées d'algues marines au niveau de notre laboratoire.

## CHAPITRE 1

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

#### 1. Généralités sur l'olivier

L'olivier (*olea europaea. L*) est un arbre spécifique de la région méditerranéenne. C'est une espèce qui occupe une place importante dans l'arboriculture fruitière. Il appartient à la famille des oléacées du genre "*Olea*". Il comporte 30 espèces différentes réparties et largement cultivées dans le monde pour la production de l'huile d'olive [20]. Il est généralement taillé à une hauteur de 5 à 8 m pour faciliter la récolte. Il est également caractérisé pour sa durabilité et sa longévité, ce qui lui permet de germer dans des conditions climatiques différentes.

Sur le plan botanique, l'olive est une drupe au mésocarpe charnu de forme ellipsoïdale ou ovoïde riche en matière grasse dont on extrait l'huile. Il est recouvert d'un péricarpe doux et renferme un noyau extrêmement dur et fusiforme qui protège l'amande. Du point de vue variétal, la forme et la taille du fruit sont des caractéristiques typiques de la variété dont il faut compter plus d'une centaine d'oliviers dans chacun des pays producteurs. Sa couleur est d'abord verte et elle vire au noir à maturité complète qui est atteinte entre octobre et décembre. Son fruit ainsi que son huile retiennent de plus en plus l'attention des scientifiques et des économistes pour leur haute valeur diététique associée à leur richesse en composés phénoliques ayant une bonne activité antioxydante.

#### 2. Généralités sur l'industrie oléicole nationale et internationale

##### 2.1. Industrie oléicole internationale

L'industrie oléicole est une activité importante dans le monde où l'extraction de l'huile d'olive s'effectue dans différents types d'huileries qui produisent en plus de l'huile comme produit principal, une grande quantité de sous-produits constitués de grignons (rejets solides) et de margines (effluents liquides).

La culture de l'olivier s'est répartie des Amériques (Californie, Mexique, Brésil, Argentine, Chili) à l'Australie et à la Chine, en passant par le Japon et l'Afrique du Sud, dans toutes les régions du monde situées entre 26° et 45° degrés de latitude nord et sud. En effet, 53 % de la surface totale de production mondiale d'olives est destinée aux pays de l'Union européenne, 27 % à ceux du Maghreb, 18 % à ceux du Moyen-Orient et 2 % à ceux d'Amérique et d'autres pays [21] (Figure 1.1).

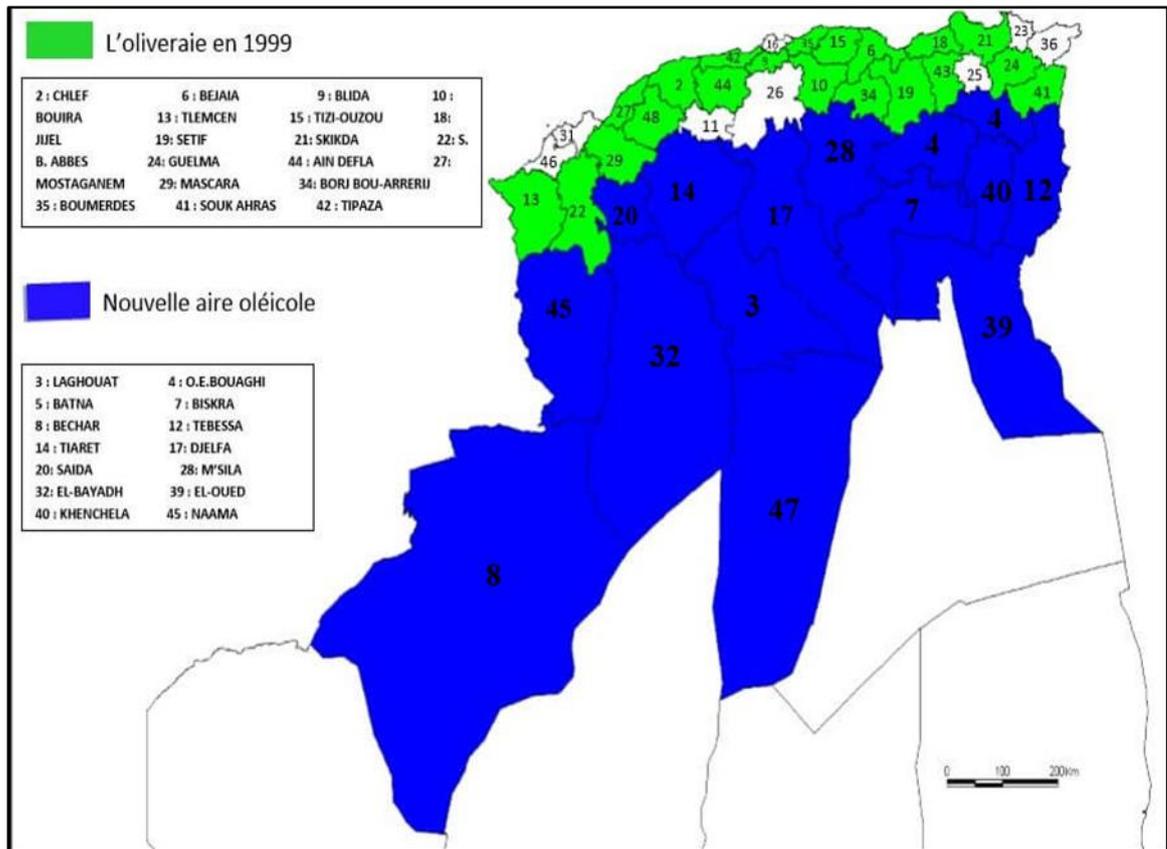


**Figure 1.1** : Répartition de l'olivier dans le monde  
<http://www.internationaloliveoil.org>

## 2.2. Industrie oléicole nationale

Selon le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (MADR), les vergers arboricoles couvraient au cours de la décennie 2000-2009 une superficie moyenne de 396 480 ha dont 39% ont été réservées aux vergers oléicoles. Ainsi, cette superficie a connu une progression de 256,7% et des augmentations de la production d'olive et la production d'huile d'olive de 400 % et 316 %, durant la période 2000-2019, respectivement [22].

L'Algérie dispose de nombreux moyens pour soutenir et développer l'industrie oléicole, notamment dans le cadre du plan de développement agricole, qui a permis d'étendre les surfaces agricoles consacrées à l'oléiculture dans les zones steppiques, présahariennes et sahariennes (Msila, Biskra, Ghardaïa, etc.) [19] (Figure 1.2).



**Figure 1.2 :** Carte de l'industrie oléicole d'Algérie (<http://www.itafv.dz/>)

### 3. Production et consommation nationale et mondiale

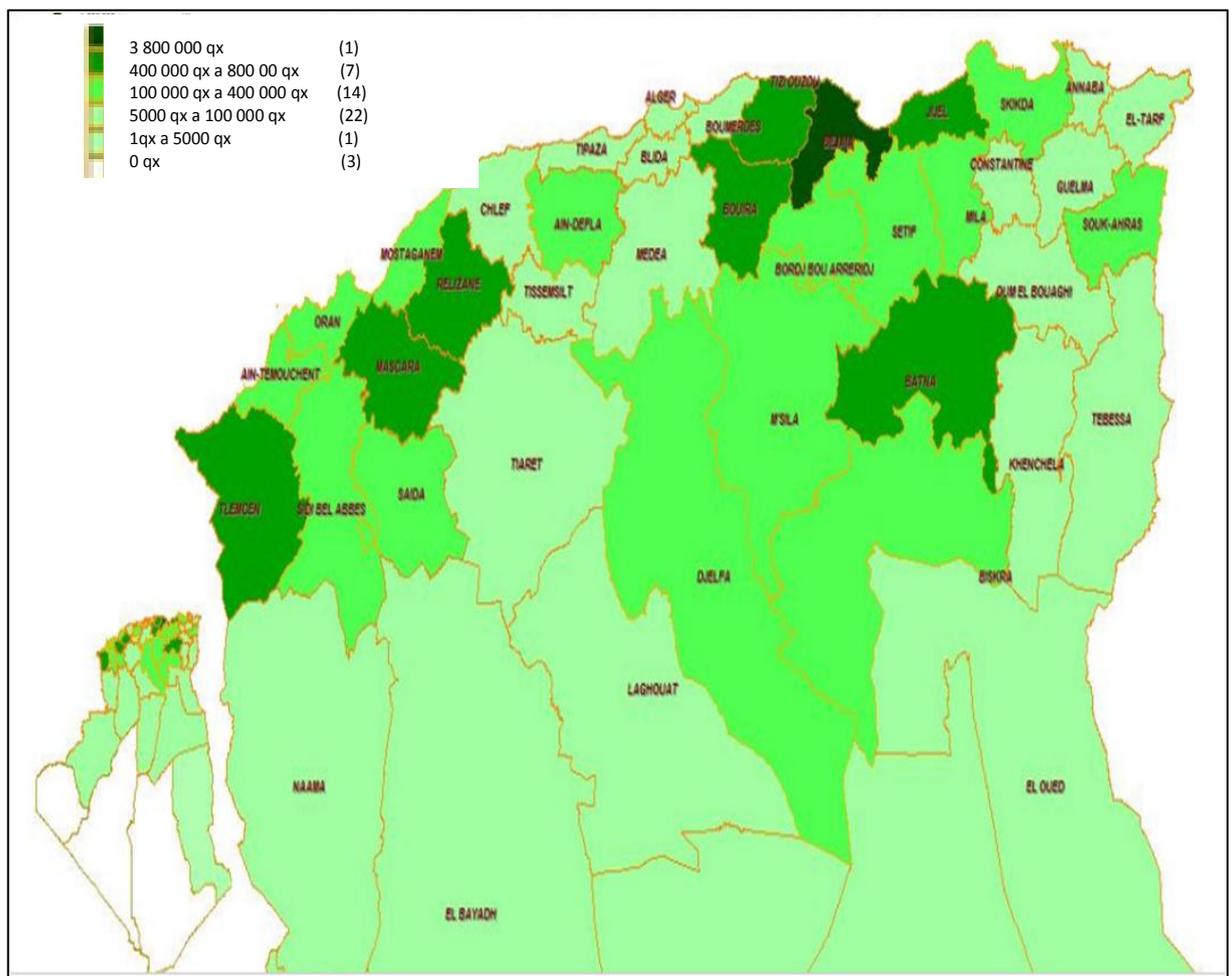
#### 3.1. Production et consommation mondiale

Le Conseil Oléicole International (COI) prévoit pour la campagne 2020-2021, une production mondiale de 3 034 000 t et une consommation de 3 211 000 t, soit les pays membres de l'accord international sur l'huile d'olive et les olives de table produisent 2 834 000 t (93,4 % du total mondial) et le groupe des pays européens, dont la production est estimée à 2 057 000 t, occupent la première place en termes de production pour la campagne 2020-2021. Les importations mondiales d'huile d'olive proviennent à près de 54 % des États-Unis et de l'Union Européenne (33 % et 21 % respectivement), les autres importateurs étant le Brésil (9 %), le Japon (6 %), le Canada (5 %), la Chine (4 %), l'Australie (3 %), la Russie (2 %) et le Mexique (2 %) [23].

### 3.2. Production et consommation nationale

La quantité d'huile d'olive produite pour la saison 2018/2019 a augmenté pour atteindre 569 010 t, sur la base de quelque 1 650 huileries de l'industrie algérienne de l'huile d'olive où seuls 165 sont modernes [24]. À cet égard, l'Algérie souhaite moderniser et développer l'industrie oléicole afin d'augmenter le calibre et la production d'huile d'olive.

La répartition et le taux de production d'olives dans l'ensemble des wilayas algériennes en 2019 sont présentés dans la figure 1.3. Béjaïa vient en tête avec une production de 3 800 000 qx, suivie de sept wilayas (Tizi-Ouzou, Boumerdes, Bouira, Jijel, Batna, Relizane, Mascara et Tlemcen) avec une production allant de 400 000 à 800 000 qx.



**Figure 1.3 :** Répartition de la production d'olive en Algérie [22]

#### 4. Système d'extraction d'huile d'olive

L'ancien système de pressage, le système de centrifugation à trois phases et le système de centrifugation à deux phases sont les trois systèmes utilisés dans le monde pour l'extraction de l'huile d'olive à l'échelle industrielle. Les systèmes de centrifugation les plus utilisés à l'heure actuelle sont les systèmes à deux phases et à trois phases [25].

##### 4.1. Système d'extraction discontinue

L'extraction traditionnelle en discontinue ou par presse est la plus ancienne et elle est encore utilisée dans certaines unités de trituration des olives. Après le broyage des olives dans des moulins à pierres, la pâte est étalée sur des sacs filtrants empilés appelés scourtins, puis placée dans la presse hydraulique pour exercer une pression sur les disques et compacter la phase solide de l'olive tandis que la phase liquide (huile et eau de végétation) s'écoule dans la colonne de la presse. Les scourtins utilisées étaient fabriqués en chanvre ou en noix de coco, mais à notre époque, ils sont fabriqués en fibres synthétiques, permettant un nettoyage et un entretien plus facile [26]. Ce procédé génère une fraction solide (grignon d'olive) et une émulsion contenant de l'huile d'olive avec une phase aqueuse. L'huile d'olive est finalement séparée du grignon restant par décantation ou par centrifugation verticale. Le système traditionnel est connu pour la production d'une huile d'olive de grande qualité.

##### 4.2. Système d'extraction continue

En raison de la nécessité de traiter de grandes quantités d'olives et d'obtenir des rendements plus élevés en huile d'olive, l'évolution du processus d'extraction de l'huile a conduit au remplacement des moulins à pression traditionnels par l'extraction centrifuge moderne, selon les étapes présentées dans la figure 1.4. L'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec de l'eau chaude et malaxées pour former la pâte d'olive qui est ensuite diluée. Les phases liquides et solides sont séparées par centrifugation donnant les grignons et le moût. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des effluents d'huileries d'olive [27].

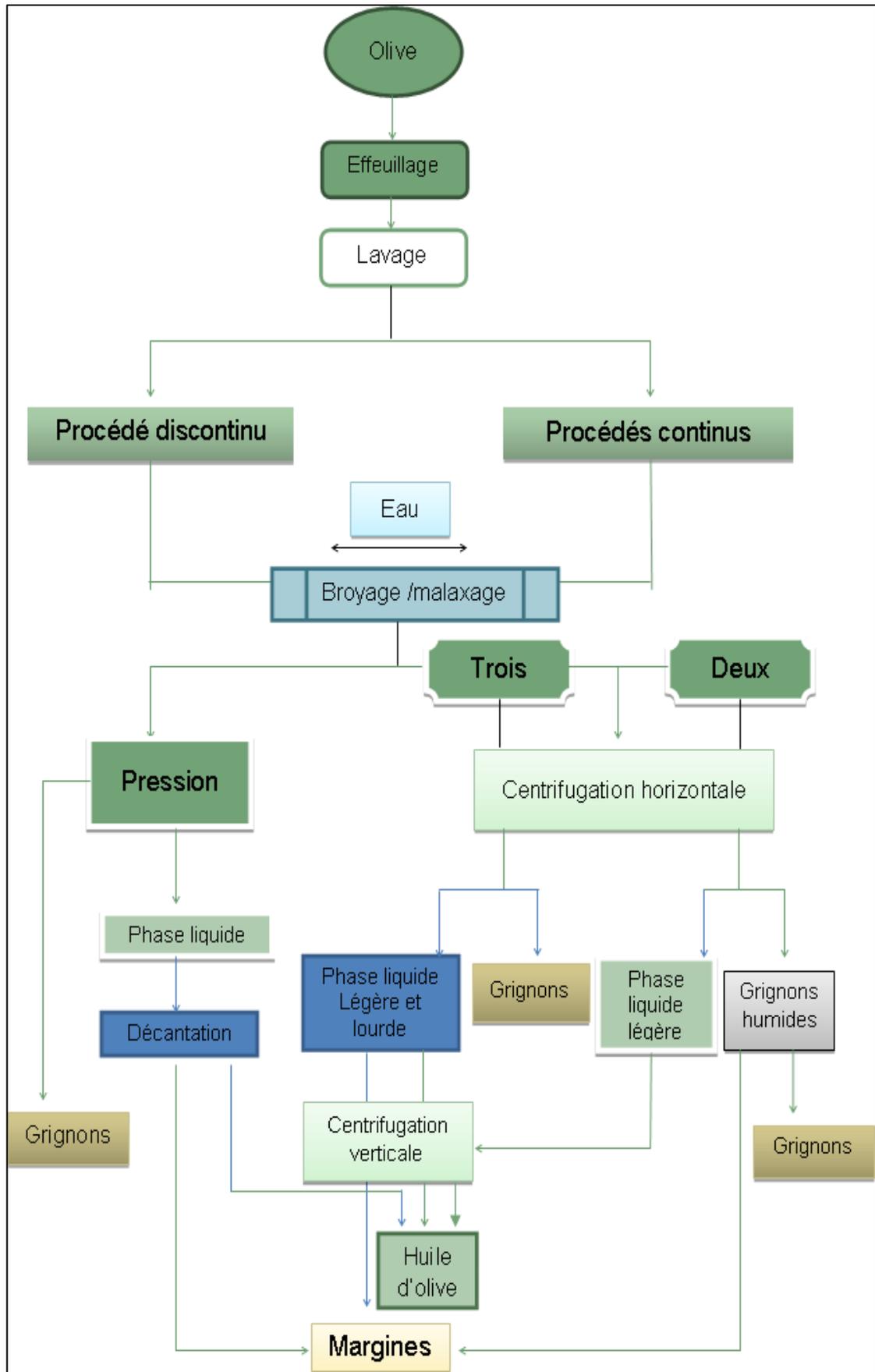
#### 4.2.1. Système d'extraction à deux phases

Le décanteur centrifuge biphasé sépare l'huile et mélange les grignons et les eaux de végétation en une unique phase pâteuse appelée grignon humide (grignon à deux phases). Ce système permet d'extraire une huile d'olive de bonne qualité sans production de margines. Son seul inconvénient est la production de grignons humides. En effet, les grignons résultant de ce procédé contiennent 8 à 10% plus d'eau que ceux du procédé à trois phases. Il est donc indispensable d'équiper les huileries travaillant selon le procédé écologique d'une installation de séchage des grignons. Ce système écologique ne nécessite aucune dilution ou seulement une petite dilution pendant la phase de malaxation. L'huile provenant du décanteur est ensuite traitée avec une centrifugeuse verticale qui sépare l'eau résiduelle et les impuretés solides pour obtenir une huile claire.

#### 4.2.2. Système d'extraction à trois phases

Variante du système précédent, dans le décanteur centrifuge triphasé, la pâte est divisée en huile, grignon et margine d'olive. Le résidu solide est séparé des deux autres phases dans le décanteur. Les phases liquides sont soumises ensuite à une centrifugation verticale afin de séparer l'huile d'olive des margines (Figure 1.4). La phase solide est beaucoup plus sèche et beaucoup plus facilement récupérable. Dans tous les cas, la consommation d'eau et, par conséquent, les margines sont plus élevés que dans le processus biphasé.

Un grand inconvénient de ce processus est la grande quantité de margines produites qui sont dues à la forte consommation d'eau, 1,25 à 1,75 fois plus d'eau que l'extraction sous presse [28].



**Figure 1.4 :** Principaux systèmes d'extraction de l'huile d'olive

#### 4.3. Comparaison des systèmes d'extraction de l'huile d'olive

Le tableau 1.1 présente une comparaison des trois procédés - traditionnel, triphasé doux et biphasé - car aucune méthode n'est idéale et chacune présente des avantages et des inconvénients.

**Tableau 1.1** : Comparaison entre les trois systèmes d'extraction [29]

Système à presse	Système à 3 phases	Système à 2 phases
Nécessite une importante main d'œuvre	Réduit les dépenses de main-d'œuvre	
Altération des huiles après exposition de la pâte des olives à l'air libre durant environ 1 heure de trituration parfois plus	Les opérations de transformation se passent en clos, ce qui protège l'huile de l'altération par l'oxygène de l'air	
Consommation moyenne d'eau	Consommation élevée d'eau	Très faible consommation d'eau
L'huile est riche en antioxydants	L'huile est pauvre en antioxydants	L'huile extraite est riche en antioxydants
L'huile est généralement assez acide	L'huile est moins acide	
Faible production	Grande production	
Grand risque de contamination	Faible risque de contamination	
En raison des acides gras libres, l'huile présente une faible résistance à l'oxydation	En raison de sa faible concentration en antioxydants, l'huile présente une résistance limitée à l'oxydation	Stabilité de l'huile à l'oxydation
Quantité moyenne de margines	Très grande quantité de margines	Pas de margines
Faible quantité de grignons	Quantité moyenne de grignons	Grande quantité de grignons

## 5. Sous produits d'extraction d'huile d'olive

### 5.1. Grignons d'olive

Les sous-produits solides générés lors de l'extraction de l'huile d'olive sont les grignons. Ils sont composés de la pulpe, du noyau et du tégument de l'olive. Les caractéristiques physicochimiques des grignons varient selon le mode d'extraction (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2** : Caractéristiques des grignons dans les trois systèmes d'extraction  
[30]

Procédés	Extraction par presse	Extraction à trois phases	Extraction à deux phases
Taux d'humidité	27,2	50,23	56,8
Huile (%)	8,72	3,89	4,65
Composés Phénoliques (%)	1,14	0,326	2,43
Sucre totaux (%)	1,38	0,99	0,83
Protéines (%)	4,77	3,43	2,87
Cellulose (%)	24,1	17,37	15,54

La composition des grignons dépend étroitement de la variété d'olives, le degré de maturation des olives et le système employé lors de l'extraction de l'huile d'olive.

### 5.2. Margines

La marge ou l'eau de végétation est appelée *alpechín* en Espagne; *aqua reflue* en Italie; *katsigaros* en Grèce et *zebra* dans les pays arabes [31]. Dans les unités de trituration modernes, le processus de production génère plus de 1500 kg de margines par tonne d'olive traitée. Tandis que dans les huileries traditionnelles, il est de 400 kg de margines par 1 tonne d'olive traitée [32]. C'est un liquide foncé d'aspect trouble et de coloration brun à brun-rougeâtre consistant en une émulsion d'eau végétale stable, d'eau de traitement de fruits d'olives, de résidus d'huile et de fragments de pulpe d'olive [5]. Son odeur est agréable, à l'état frais, rappelant celle des olives, mais un goût amer et est relativement riche en matières organiques. Les différentes techniques d'extraction de l'huile d'olive conduisant à

la formation de margine sont les principaux facteurs influençant la qualité et la quantité de margine.

### 5.2.1. Caractéristiques physicochimiques des margines

Les margines ont un pH acide avec des valeurs comprises entre 4,7-5,7, avec un fort pouvoir tampon et une odeur fétide qui se développe au fur et à mesure que les margines vieillissent. Elles ont généralement une forte salinité due à l'ajout important de sel pour la conservation des olives [33]. La caractérisation physico-chimique des margines est généralement tributaire des techniques et des systèmes retenus pour l'extraction d'huile d'olive et diffère d'un pays à l'autre.

Le tableau 1.3 montre les analyses menées sur les margines qui peuvent nous renseigner sur les intervalles de variation de leurs principales caractéristiques physico-chimiques de pH, conductivité, demande biologique en oxygène (DBO), demande chimique en oxygène (DCO), matière organique et azote totale.

**Tableau 1.3** : Principales caractéristiques physicochimiques des margines [33]

	Valeurs	
	Minimum	Maximum
pH	4,7	5,7
Conductivité (ms/cm)	5	41
DBO (g /L)	41,3	46
DCO (g/L)	16,5	190
Matière organique (g /L)	16,7	81,6
Azote totale (g /L)	0,06	0,95

### 5.2.2. Caractéristiques biologiques des margines

Dans la majorité des cas, les margines qui ont été soumis à des tests microbiologiques ont prouvé l'absence de micro-organismes pathogènes. Par conséquent, ces effluents ne posent aucun problème d'ordre hygiénique ou sanitaire. La flore bactérienne est représentée par les bactéries qui résistent aux polyphénols particulièrement les bactéries à gram négatif ; du genre

*Pseudomonas* et *Bacillus* et elles ne se développent pas aussi bien que les levures et les champignons qui se composent essentiellement de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium negrican* et *alternari* ainsi que *Trichosporium cutaneium*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula sp*, *Candida sp* et *Saccharomyces sp* [34-36]. Ces micro-organismes sont plus résistants aux substances phénoliques que les bactéries et peuvent supporter la salinité élevée et le pH acide des effluents [37].

## 6. Valorisation des margines

### 6.1. Impact des margines sur l'environnement

La marge est un problème environnemental important pour les pays producteurs d'olives, car il n'existe pas d'options de traitement pour ce résidu, ce qui oblige les propriétaires de moulins à huile à rejeter cette eau sans précaution dans l'environnement ou dans le système d'égouts. Cela dégrade l'environnement récepteur en raison de la charge organique élevée, qui peut causer de graves dommages à l'eau, au sol, à l'air et aux plantes.

#### 6.1.1. Impact sur le sol

De nombreux auteurs ont montré que les margines utilisées directement comme engrais organique avaient des effets néfastes sur les qualités des plantes et des sols [38]. En effet, les composés toxiques de ces effluents, comme les phénols, s'infiltrèrent dans le sol et inhibent son activité microbologique [39]. De plus, sa richesse en minéraux, acides et molécules organiques détruit la capacité d'échange cationique du sol et/ou sa fertilité [40].

#### 6.1.2. Impact sur les eaux

La qualité de l'eau potable peut être affectée par des déversements mineurs d'hydrocarbures sur le sol, car ils peuvent contaminer la nappe phréatique et les eaux souterraines [41]. Les margines sont extrêmement riches en matières azotées ; par conséquent, lorsqu'elles se répandent, les eaux souterraines situées à l'intérieur ou à proximité de la zone d'épandage peuvent être contaminées par des nitrates [42]. La pollution des margines a également un impact négatif sur la vie aquatique et les populations de poissons [43].

La margine contient également de grandes quantités d'hydrates de carbone et de lipides, qui forment ensemble une couche impénétrable empêchant la lumière et l'oxygène de pénétrer [43]. De même, l'accumulation de phosphore entraîne l'eutrophisation de l'eau, ce qui favorise le développement de maladies.

### 6.1.3. Impact sur les plantes

Les margines appliquées sans précaution peuvent empêcher la croissance des plantes et la germination des graines [44] (Tableau 1.4). D'autre part, ces effluents étant très riches en matière organique et en nutriments, l'application de margines à des doses appropriées peut être bénéfique pour la croissance des plantes [45].

**Tableau 1.4** : Effets environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel [45]

Milieu	Causes	Conséquences
Sols	Composés phénoliques - Acidité - Huiles et matières grasses (MG) - Matières en suspension (MES)	- Sols obturés et suffoqués. - Mauvaise odeur. - Pollution de l'aquifère. - Coloration des eaux naturelles. - Effet phytotoxique sur la population microbienne.
Air	- Fortes teneurs en sels - Acidité - Forte charge organique	- Dégagements d'odeurs désagréables Formation d'hydrogène sulfureux (H <sub>2</sub> S)
Espèces Aquatiques	- Matières organiques - Huile et MG - MES Composés phénoliques	- Augmentation de la demande en oxygène. - Formations des croûtes. - Toxicité de la microflore
Station d'épuration des eaux usées	- Acidité - MES - Huile et MG - Matières organiques - Polyphénols	- Perturbation de l'activité des digesteurs des boues
Égouts	- Acidité - MES	- Corrosion des matériaux. - Putréfaction

## 6.2. Traitement des margines

Ces dernières années, plusieurs techniques de traitement des margines ont été utilisées et sont divisées en trois grandes classes qui peuvent être utilisées seules ou combinées, les procédés physiques (Processus thermique, technique membranaire), les procédés chimiques (évaporation, oxydation, coagulation, floculation, adsorption) et les procédés biologiques (traitement anaérobie, traitement aérobie) [46-50].

## 6.3. Méthodes de valorisation des margines

### 6.3.1. Valorisation des margines

La margine peut être un substrat pour le développement de micro-organismes, une source d'énergie et un moyen de produire des engrais, des biomolécules et des aliments pour animaux. Les nutriments minéraux et organiques sont abondants dans les margines. Dans cette situation, la recherche chercherait à faire progresser leur valorisation à l'échelle industrielle et au laboratoire [51]. Afin d'exploiter les margines dans les secteurs de la biotechnologie, de la chimie et de l'agriculture et de réduire leurs effets néfastes sur l'environnement, cette valorisation vise à éradiquer les produits chimiques à caractère phénolique [52].

### 6.3.2. Obtention de biomolécules

#### 6.3.2.1. Antioxydants naturels

Les industries pharmaceutiques et cosmétiques peuvent utiliser les composants importants présents dans les margines, comme les antioxydants. Le tyrosol, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine sont les trois principaux antioxydants commercialement viables présents dans la pulpe d'olive [53]. Les antioxydants sont des molécules phénoliques qui ont le pouvoir de contrecarrer et de combattre les agressions chimiques des radicaux oxydants sur l'ADN cellulaire. Ils peuvent ensuite être utilisés dans le secteur pharmaceutique [28, 54].

#### 6.3.2.2. Enzymes

La capacité des champignons, en particulier des lignolytiques, à éliminer les composés récalcitrants par la production d'enzymes oxydantes non spécifiques comme les phénol-oxydases, les polyphénol-oxydases et les peroxydases a été

démontrée pour la détoxification et la dégradation des margines [55, 56]. En traitant les margines avec des champignons, d'autres enzymes, notamment des pectinases et des lipases, peuvent également être produites [57, 58].

#### 6.3.2.3. Polysaccharides

Les polysaccharides constitue une classe potentielle dans les margines; par exemple, le xanthane est une substance polymérique extracellulaire microbienne à valeur commerciale. La première fabrication de xanthane a été décrite à partir de margines [59]. Un certain nombre d'études ont également été menées sur d'autres bactéries productrices des exopolysaccharides (EPS) qui peuvent se développer dans les margines en raison de leur structure complexe et de leur large éventail d'activités biologiques, ce qui leur permet d'être exploitées dans les industries alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et de biorestauration [60, 61].

#### 6.3.2.4. Biosurfactants

Les margines sont une source potentielle de carbone pour la formation de biosurfactants sous forme de rhamnolipides (biosurfactants glycolipidiques) ou de surfactines (biosurfactants lipopeptidiques) car elles contiennent encore des huiles résiduelles et des polysaccharides [62, 63].

#### 6.3.2.5. Fibres

Les margines sont un exemple de sous-produit oléique qui contient des fragments de polysaccharides provenant de la paroi cellulaire de l'olive et qui a été suggéré comme source de pectines, d'hémicelluloses, de cellulose et de lignine [64], ainsi que l'utilisation de fibres provenant de margines pour l'alimentation animale semble être une alternative compétitive [65].

#### 6.3.2.6. Production de compost

Le compostage est un processus qui transforme les matières organiques en composés humiques tout en éradiquant les parasites et les micro-organismes dangereux. Contrairement aux déchets solides urbains, le compost fertilisant pour les sols fabriqué à partir de margines présente l'avantage d'être dépourvu de

micro-organismes pathogènes et d'avoir des concentrations élevées de phosphate et de potassium [66].

## 7. Etude chimique des margines

### 7.1. Composition chimique des margines

Les margines représentent une matrice complexe constituée approximativement d'eau (83 à 96%), d'une fraction organique (3,5 à 15%) et autre minérale (0,5 – 2%) [67].

#### 7.1.1. Fraction aqueuse

Les margines sont des effluents aqueux avec une teneur en eau qui peut atteindre 90 %. La quantité d'eau des margines dépend principalement du procédé d'extraction, elle résulte des eaux de lavages des olives en utilisant un volume qui varie entre 80 et 120 litre par tonne d'olives, des eaux de rinçage des trémies de stockage, l'eau ajoutée au cours du malaxage, les eaux ajoutée pendant la centrifugation de l'huile pour optimiser la séparation centrifuge des phases (procédé de trois phases) et l'eau de végétation contenue dans le fruit d'olive qui constitue 40 à 50% d'eau des margines [67, 68].

#### 7.1.2. Fraction organique

La fraction organique des margines est subdivisée en deux parties :

- La partie insoluble contient les MES et les colloïdes provenant des débris et des fractions de pulpe d'olive.

- La partie soluble dans la phase aqueuse qui est la plus importante, elle comprend des composés phénoliques divers, des sucres, des acides organiques, des composés azotés et des vitamines.

##### 7.1.2.1. Lipides

Le procédé d'extraction utilisé a un impact significatif sur la concentration en lipides résiduels dans les margines. À cet égard, le procédé de pressage conventionnel produit des margines à teneur en huile plus élevée, jusqu'à 9.8 g/L

[33]. Grâce à la séparation efficace assurée par les décanteurs centrifuges utilisés, le processus continu à trois phases permet toutefois d'appauvrir les margines en lipides. La teneur en huile des margines est actuellement faible dans le monde entier, allant de 0,03 à 1,1 %, en raison de l'augmentation récente des processus continus utilisés par les tritrateurs et l'acide oléique, qui représente 65 % de l'huile totale, est toujours présent en fortes concentrations [68].

#### 7.1.2.2. Acides organiques

Leur concentration dans les margines varie de 0,78 à 1 g/L et se compose de molécules organiques à chaîne courte de trois à quatre atomes de carbone. Citons notamment les acides fumarique, glycérique, lactique, malique et malonique [33, 69].

#### 7.1.2.3. Glucides

Les hydrocarbures, en particulier la cellulose, l'hémicellulose et les pectines, sont abondants dans les margines, entre 5 et 10% des polysaccharides solubles de l'olive migrent différemment dans les margines [65]. En conséquence, la teneur en sucres totaux des margines varie de 1,3 à 8,79 g/L [33]. Les monomères saccharidiques représentent 1 à 4,5 g/100 g et se composent principalement de glucose, rhamnose, fructose, de galactose, de mannose, de l'acide galacturonique et d'une petite quantité de saccharose [70].

Ces substances peuvent être utilisées comme gélifiants dans l'industrie alimentaire. La composante glucidique des margines a démontré une bonne activité antioxydante par piégeage du radical DPPH (2,2-diphényle-1-pikrylhydrazyle) ainsi qu'une bonne capacité de fermentation des lactobacilles [71].

#### 7.1.2.4. Composés azotés

Les niveaux d'azote total dans les margines sont très variables, allant de 0,06 à 0,95 mg/L [33]. Les protéines constituent la majorité de la fraction azotée, avec des concentrations allant de 1,2 à 2,4 % et les acides aminés tels que l'acide

aspartique, l'acide glutamique, la proline et la glycine sont les plus répandus [45, 72]. Ces deux classes constituent la majorité des substances azotées présent dans les margines.

#### 7.1.2.5. Vitamines

Les margines peuvent occasionnellement contenir des caroténoïdes et des tocophérols (Vitamines liposolubles), qui seraient liés à la fois aux débris d'olives en suspension et aux restes d'huile issus du processus d'extraction. Cela explique pourquoi il n'y a pas beaucoup d'études axées sur l'identification ou la quantification de ces composés dans les margines, car les chercheurs sont plus intéressés à les trouver dans l'huile d'olive [70].

#### 7.1.2.6. Composés phénoliques

Les composés phénoliques des margines sont très variés et présentent une large gamme de formes monomériques et polymériques [73]. Leur teneur volumétrique peut atteindre 24 g/L [68]. Les polyphénols d'olive sont très polaires donc ils passent dans la phase aqueuse (la margine) plutôt que dans la phase organique (l'huile). De ce fait, ils sont 10 fois plus concentrés dans les margines que dans l'huile d'olive.

#### 7.1.3. Fraction minérale

La quantité de la fraction minérale des margines est significative Le type de sol, la fertilisation utilisée sur l'olivier, la qualité de l'eau utilisée lors du broyage et la méthode d'extraction utilisée affectent la concentration de chaque élément minéral [74]. Les valeurs minimales et maximales des minéraux et des métaux lourds basées sur les margines sont présentées dans le tableau 1.5.

**Tableau 1.5 :** Teneurs des sels minéraux des margines [33]

Elément minéraux	Teneurs (g/L)	
	Minimum	Maximum
Cadmium (Cd)	0,03	$10 * 10^{-6}$
Calcium (Ca)	0,03	0,29
Chlore (Cl)	0,76	1
Cuivre (Cu)	0,49	$2,96 * 10^{-3}$
Fer (Fe)	0,45	$20 * 10^{-3}$
Magnésium (Mg)	0,03	0,17
Manganèse (Mn)	0,46	$20 * 10^{-3}$
Plomb (Pb)	6,7	$10 * 10^{-6}$
Potassium (K)	0,73	6,1
Sodium (Na)	0,03	0,13
Zinc (Zn)	1,7	$4,98 * 10^{-3}$

## 8. Polyphénols des margines

### 8.1. Généralités sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont les constituants les plus importants de la margine. Ce sont des métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal, caractérisés par la présence d'au moins un motif phénolique (cycle aromatique sur lequel viennent se greffer un ou plusieurs groupements hydroxyles), pouvant être libre, acylés ou glucosylés, allant de molécules phénoliques simples de faible poids moléculaire comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés (polyphénols) comme les tanins.

Actuellement, on dénombre plus de 8000 composés phénoliques tels que les acides phénoliques, les coumarines, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes et les tannins, dont 5000 pour la sous classe des flavonoïdes [75]. Ces métabolites permettent aux plantes de résister et se défendre aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes et environnementales [76]. Un nombre croissant d'études suggère que la consommation de polyphénols peut avoir un impact

significatif sur la santé à travers le contrôle du métabolisme, du poids, des maladies chroniques et de la prolifération cellulaire [77].

## 8.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être classés en différentes catégories (Tableau 1.6) en raison de la complexité de leur squelette de base, qui peut varier d'un simple C6 à des formes hautement polymérisées, de l'ampleur des modifications apportées à ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation, etc.) et des connexions potentielles entre ces molécules de base et d'autres molécules (glucides, lipides, protéines et autres métabolites secondaires qui peuvent être ou non des composés phénoliques, etc.) [78]

**Tableau 1.6** : Classes de composés phénoliques selon le squelette des carbones  
[75, 78, 79]

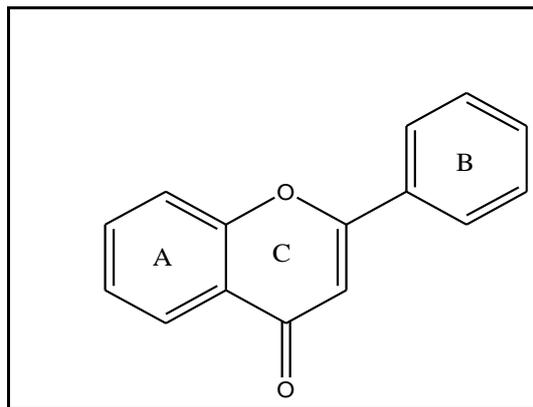
Classe	Squelette carboné	Exemples	Origine
Alcool phénolique	C6	Catéchol	Raisins et vin
Acides hydroxybenzoïque	C6-C1	Acide vanillique	Epices et fraise
Acides hydroxycinnamiques Coumarines, Isocoumarines	C6-C3	Acide caféique Scopolétine, esculétine.	Pomme de terre et pomme  Citrus
Naphtoquinones	C6-C4	Juglone	Noix
Stilbènes	C6-C2-C6	Resvératrol	Vin
Flavonoïdes  Isoflavonoïdes	C6-C3-C6	Kaempférol, quercétine.  Daidzéine	Pomme, raisin et citrus  Soja et pois
Lignanes, néolignanes	(C6-C3) <sub>2</sub>	Pinorésinol, Laricirécinol	Graines de sésame
Lignines	(C6-C3) <sub>n</sub>	Lignine	Bois
Tannins	(C <sub>15</sub> )	Catéchine	Raisin rouge

### 8.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des phénols simples largement répandus chez les plantes. Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique [80]. Ils sont présents sous forme libre ou sous forme de combinaison de type ester avec des hétérosides comme l'acide (E) 4-O- $\beta$ -D-glucosyl *p*-coumarique [81].

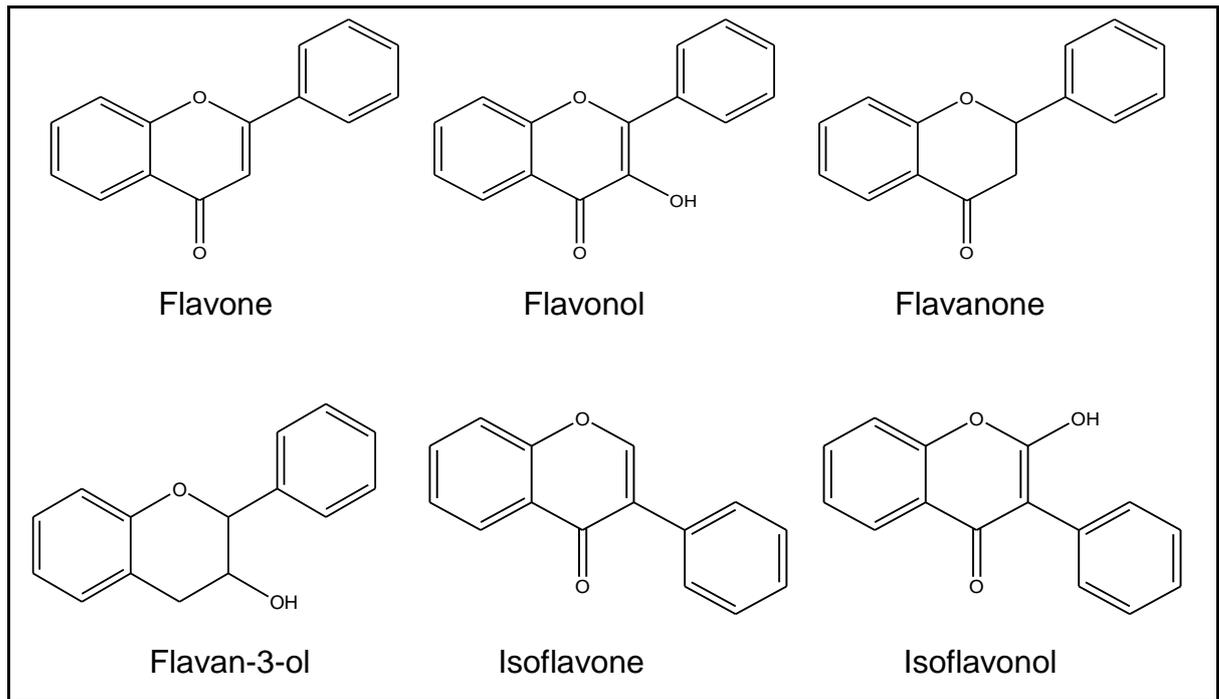
### 8.2.2. Flavonoïdes

Cette catégorie comprend plusieurs milliers de molécules a une structure générale en C15 (C6-C3-C6) contenant une grande importance biologique (Figure 1.5) [82]. La grande variété de ces composés peut être attribuée au fait que les flavonoïdes existent généralement dans la nature sous des formes hydroxylées couplées à différentes molécules.



**Figure 1.5** : Structure générale du noyau des flavonoïdes [83]

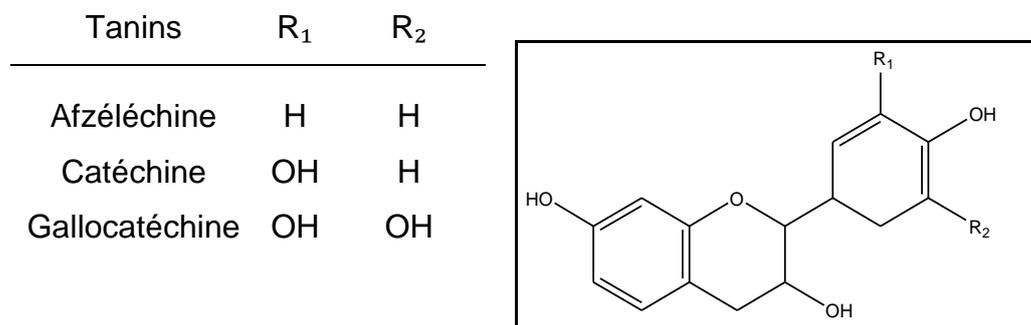
Les flavonoïdes sont structurellement séparés en différentes classes de molécules en fonction du niveau d'oxydation et du type de substituants sur l'anneau C [84]. Six de ces groupes - flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols et anthocyanidines - sont particulièrement bien caractérisés. Les structures de bases des sous-classes de flavonoïdes sont décrites dans la figure 1.6.



**Figure 1.6 :** Structures des éléments de la principale sous-classe des flavonoïdes [83]

### 8.2.3. Tannins

Les tannins sont des produits chimiques polyphénoliques solubles dans l'eau et sont communes aux plantes, bien que leur nature et leur quantité varient en fonction de l'espèce. Leur structure est assez complexe et ils sont généralement divisés en tanins hydrolysables et en tanins condensés [78].

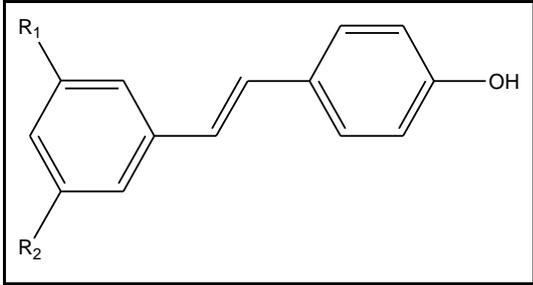


**Figure 1.7 :** Structure de base des tannins [78]

#### 8.2.4. Stilbènes

Contrairement aux flavonoïdes, qui sont bien accueillis par les plantes, il s'agit d'un type de métabolites phénoliques que l'on trouve dans une variété de plantes alimentaires, notamment les raisins, les baies et les arachides [85]. Le resvératrol et le ptérostilbène sont des substances chimiques de la famille des stilbènes que la plante produit en réponse au stress; Ils comprennent généralement au moins deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison [86].

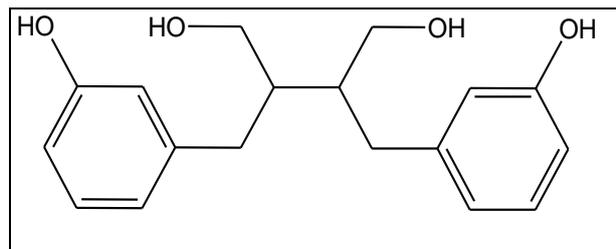
Stilbènes	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ptérostilbène	O-CH <sub>3</sub>	O-CH <sub>3</sub>
Resvératrol	OH	OH
Picéide	OGlc	OH



**Figure 1.8** : Structures chimiques de quelques stilbènes [86]

#### 8.2.5. Lignanes

Les lignanes sont traditionnellement définis comme une classe de métabolites secondaires dérivés de la fusion de deux unités phénylpropanoïdes (monolignol) par couplage oxydatif, qui peuvent également être utilisées pour synthétiser le polymère de lignine à longues ramifications. Ils sont souvent présents dans les graines du lin et du sésame et présentent une grande diversité structurale ainsi qu'une série d'activités biologiques puissantes, telles que l'entérodiol (Figure 1.9), qui joue un rôle dans la prévention et le traitement de certains cancers [87].



**Figure 1.9** : Structure chimique de l'entérodiol [87]

### 8.3. Biosynthèse des composés phénoliques

Les voies du shikimate et de l'acétate, deux voies métaboliques importantes, sont celles par lesquelles les polyphénols obtiennent leur(s) anneau(x) aromatique(s) [88]. En raison de leur double origine synthétique, les composés phénoliques présentent un large éventail de propriétés structurales.

La phénylalanine et la tyrosine sont deux acides aminés aromatiques, elles sont également à l'origine de la majorité des composés phénoliques des plantes. Ils se trouvent tous deux dans les protéines. Ils sont produits à partir des sucres simples du métabolisme primaire par la voie bien connue de l'acide shikimique. Il en résulte la synthèse de la phénylalanine, qui est ensuite convertie en acide cinnamique, précurseur immédiat des phénols. Les principaux acides hydroxycinnamiques sont les acides coumarique, caféique, férulique et sinapique. Ces acides se trouvent généralement dans le matériel végétal sous forme d'esters (esters quiniques comme l'acide chlorogénique, esters de glucose, etc.). Le processus de biosynthèse, connu sous le nom de séquence phénylpropanoïde, permet la formation de ces acides. Les esters d'acides hydroxycinnamiques sont les formes métaboliquement actives qui réagissent avec le coenzyme A et permettent d'accéder aux principales classes de composés phénoliques. La production de composés mixtes est souvent facilitée par l'engagement simultané du shikimate et de l'acétate (flavonoïdes, stilbènes, xanthones, etc.) [89].

### 8.4. Composition phénolique des margines

Les produits phénoliques (ou biophénols) présents dans les margines sont très divers et leur composition structurale varie considérablement. Les biophénols sont transmis de la pâte d'olive lors du broyage et du malaxage à l'huile et à divers sous-produits, en particulier aux margines, au cours de la fabrication de l'huile d'olive. Ce sont des substances hydrophiles, dont leur solubilisation dans l'huile est nettement inférieure à celle de la phase aqueuse. En réalité, seulement 2 % des substances chimiques phénoliques des olives sont transmises à l'huile, 53 % à la margine et 45 % au grignon d'olive [90]. Cependant, certaines de ces molécules sont nouvellement synthétisées via diverses voies de biotransformation enzymatique [91, 92]. Les groupes de biophénols les plus significatifs dans les margines sont les acides phénoliques, les alcools phénoliques, les flavonoïdes et

les sécoiridoïdes [8]. Plusieurs composés phénoliques ont été identifiés dans les margines, On peut diviser les phénols en deux grandes catégories :

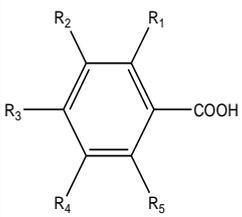
#### 8.4.1. Phénols libres de margines

La formation des phénols libres est principalement assurée par l'hydrolyse enzymatique des composés de la pulpe, cette catégorie regroupe les acides et les alcools phénoliques [65].

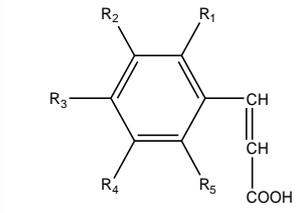
##### 8.4.1.1. Acides phénoliques de margines

Les acides phénoliques sont représentés par l'acide-coumarique, cinnamique, caféique, férulique, gallique, sinapique, chlorogénique, protocatéchique, syringique et vanillique. Ces acides dérivent de deux acides précurseurs, l'acide hydroxybenzoïque et l'acide hydroxycinnamique (Tableau 1.7 ; Tableau 1.8) [8, 12].

**Tableau 1.7 :** Représentation des groupes d'acides phénoliques présent dans les margines dérivants de l'acide hydroxybenzoïque

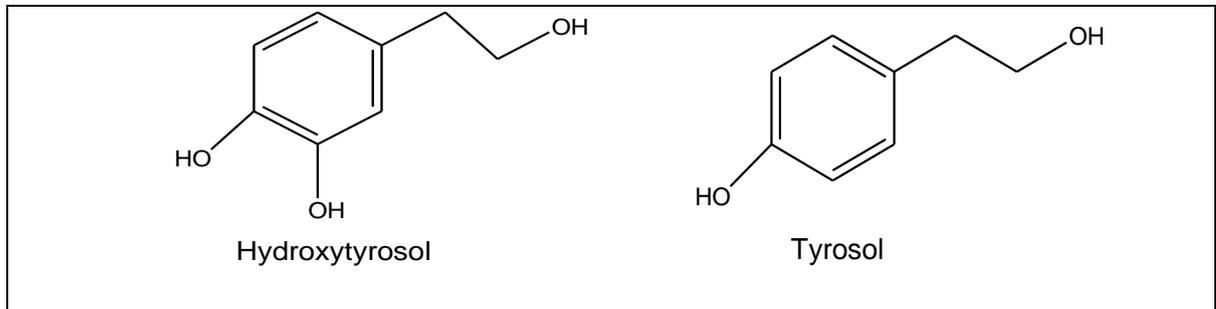
Structure	R1	R2	R3	R4	R5	Dénomination
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	Ac. syringique
	H	H	OH	H	H	Ac. P-hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	H	Ac. protocatéchique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	Ac. vanillique
	H	OH	OH	OH	H	Ac. Gallique

**Tableau 1.8 :** Représentation des groupes d'acides phénoliques présent dans les margines dérivant de l'acide hydroxycinnamique

Structure	R1	R2	R3	R4	R5	Dénomination
	H	H	H	H	H	Ac. Cinnamique
	H	H	OH	H	H	Ac. P-coumarique
	H	OH	OH	H	H	Ac. Caféique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	Ac. Férulique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	Ac. Sinapique

#### 8.4.1.2. Alcools phénoliques de margines

D'autre part, beaucoup d'alcool phénoliques ont été trouvés dans les margines, l'hydroxytyrosol et le tyrosol étant les plus répandus dans les margines (Figure 1.10) [8, 93].



**Figure 1.10 :** Exemple d'alcools phénoliques de margine

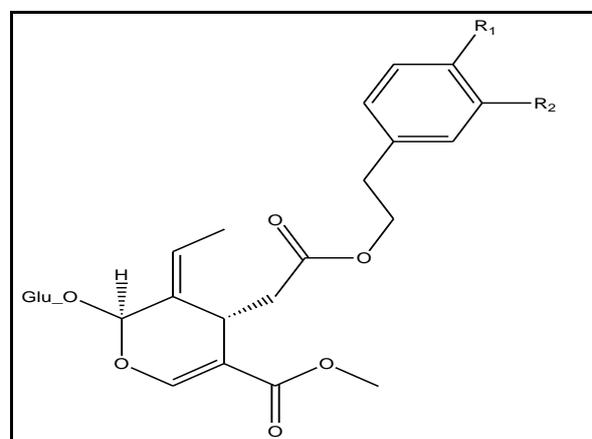
#### 8.4.2. Polyphénols de margines

Les polyphénols ont des masses moléculaires élevées comprises entre 500 et 3000 Da. Différentes substances de nature phénolique sont concernées, notamment, les sécoiridoïdes, les flavonoïdes et les tannins.

##### 8.4.2.1. Sécoiridoïdes de margines

Les principaux sécoiridoïdes des margines sont le ligustroside et l'oleuropéine (Figure 1.11), tous deux provenant de la pulpe d'olive. Plusieurs dérivés de l'oleuropéine ont également été signalés, notamment la diméthyleoleuropéine, l'aglycone d'oleuropéine et le verbascoside [93, 94].

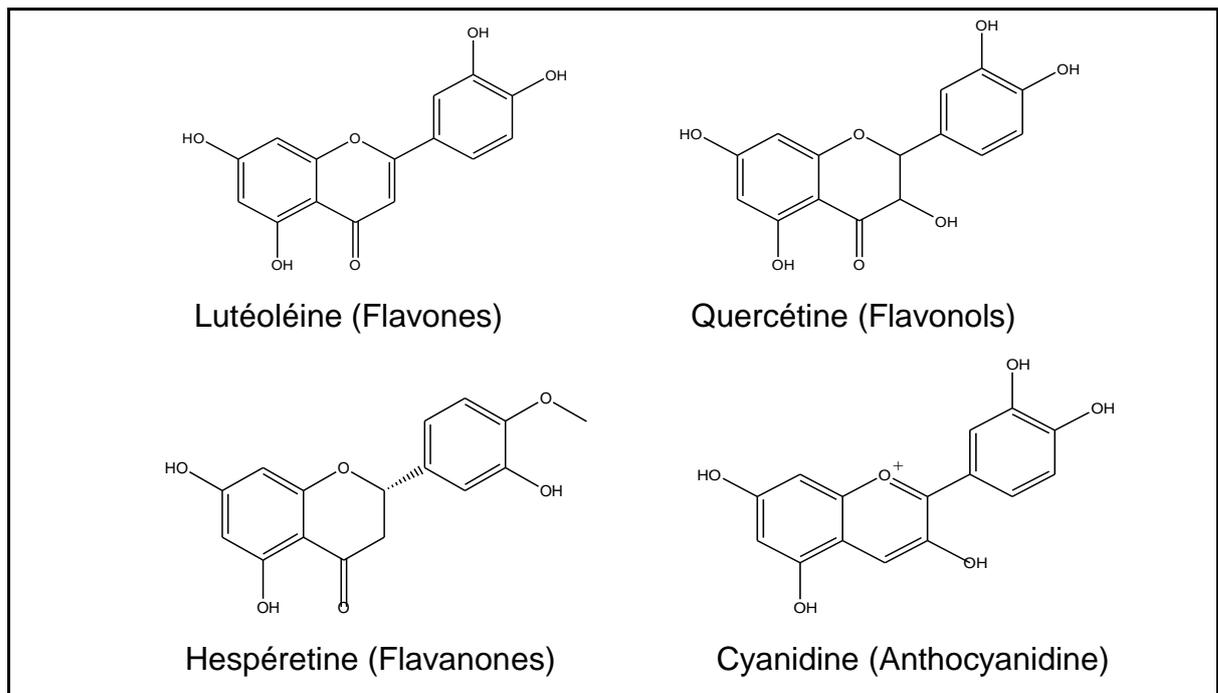
Sécoiridoïdes	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Oleuropéine	OH	OH
Ligustroside	OH	H



**Figure 1.11 :** Structure des principaux sécoiridoïdes de margine

#### 8.4.2.2. Flavonoïdes de margines

Les flavonoïdes les plus signalés dans les margines et l'olivier sont la lutéoline, l'hespéridine, la quercétine, la rutine, la cyanidine, comme le montre la figure 1.12, ainsi que des flavonoïdes glycosylés (lutéoline 7-O-glucoside, apigénine 7-O-glucoside, cyanidine 3-O-glucoside et cyanidine 3-O-rutinoside) [12, 95].



**Figure 1.12 :** Quelques structures chimiques des flavonoïdes de margines

#### 8.4.2.3. Tannins de margine

Dans les petites poches des cellules de l'olive, les tanins constituent une classe dominante de polyphénols [96] dont la concentration peut atteindre 12 g/L [97]. Le catécholmélanique est un flavotannin, il est le plus répandu et le plus abondant dans les margines [93].

### 8.5. Activités biologiques des polyphénols

#### 8.5.1. Généralités

De nombreux chercheurs s'intéressent aux polyphénols marginaux en raison de leur large éventail d'activités biologiques. De nombreuses études suggèrent que ces substances jouent un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires

[98], ainsi que des maladies inflammatoires, bactériennes, virales et allergiques [99-101].

### 8.5.2. Activité antimicrobienne

Les infections microbiennes sont des maladies provoquées par la prolifération de bactéries ou de levures nocives chez l'homme ou l'animal. L'étude des micro-organismes a récemment fait l'objet d'une grande attention d'un point de vue biologique et médical. L'augmentation de la résistance des souches aux traitements [102, 103] et les complications que ces microbes provoquent chez les individus présentant un certain profil clinique [104] sont les raisons pour lesquelles la recherche sur les maladies microbiennes a pris une telle importance. A titre d'exemple, environ, 95% de souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline et dans les pays asiatiques 70- 80% de ces mêmes souches sont résistantes à la méticilline [105].

#### 8.5.2.1. Composés phénoliques antimicrobiens

Les produits chimiques antibactériens sont ceux qui ont la capacité de tuer ou d'arrêter la croissance des bactéries. L'évaluation des capacités antibactériennes des polyphénols a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. L'oleuropéine, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et d'autres phénols ont été étudiées pour leur activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries, champignons, virus et protozoaires [106-113].

#### 8.5.2.2. Mécanisme d'action antimicrobienne des polyphénols

Le mécanisme de l'effet antimicrobien est très complexe et peut impliquer plusieurs modes d'action, notamment l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration du substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien, la dégradation de la paroi cellulaire, la rupture de la membrane cytoplasmique (entraînant la fuite de composants cellulaires) et l'influence sur la synthèse des protéines et des lipides, de l'ADN et de l'ARN [114, 115]. Les phénols sont typiquement classés parmi les agents de surface et ont un effet antibactérien lié à leur capacité à dénaturer les protéines [116, 117]. Sous l'effet de leur activité, ils

provoqueraient la fuite des composants biologiques des bactéries, notamment les protéines, le potassium et le phosphate. Ces conséquences peuvent résulter de la rupture du peptidoglycane ou d'une atteinte à la membrane cellulaire.

### 8.5.3. Activité antioxydante

#### 8.5.3.1. Généralités

Toutes les créatures aérobies ont besoin d'oxygène pour survivre car il permet l'oxydation des matières organiques dans leurs mitochondries, ce qui produit la majorité de l'énergie chimique. Mais pour ces organismes, l'oxygène peut être une source d'agression car ils en utilisent une partie pour créer des composés extrêmement réactifs appelés radicaux libres.

Un antioxydant est un produit chimique qui, lorsqu'il est présent en faible concentration par rapport à un substrat oxydable, ralentit ou arrête de manière significative l'oxydation de ce substrat [118]. Les glucides, l'ADN, les protéines et les lipides sont des exemples de substrats oxydables.

#### 8.5.3.2. Stress oxydatif et radicaux libres

Les radicaux libres ou les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN) [119] qui peuvent être des molécules ou des atomes ayant un ou plusieurs électrons non appariés, sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, etc. (Tableau 1.9).

**Tableau 1.9 :** Principaux radicaux libres et leur structure chimique [120]

Nomenclature	Structure chimique
Radical hydroxyle	$OH\bullet$
Radical hydroperoxyde	$HO O\bullet$
Radical peroxyde	$RO O\bullet$
Radical alkoxyde	$RO\bullet$
Peroxyde d'hydrogène*	$H_2O_2$
Peroxynitrite	$ONO O\bullet$
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$

\* Espèce active de l'oxygène, non radicalaire

#### 8.5.3.3. Mécanisme d'action des antioxydants

Tous les composés qui protègent les systèmes biologiques des conséquences potentiellement néfastes des procédures ou des réactions qui entraînent une oxydation excessive peuvent être classés dans la catégorie des antioxydant [121]. Ils peuvent être d'origine synthétique comme le butyl- hydroxyanisole (BHA), butyl-hydroxytoluène (BHT), gallate propylée et le tétra-buty- lhydroquinone, ou d'origine naturelle comme l'acide ascorbique (Vitamine C), tocophérols et la  $\beta$ -carotène.

Une étude a montré qu'il y a 5 modes d'intervention des antioxydants [122] :

- Interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires.
- Chélation des métaux de transition.
- Désactivation des ERO.
- Inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation.
- Abaissement de la pression partielle en oxygène.

#### 8.5.3.4. Polyphénols antioxydants

La majorité des effets biologiques des flavonoïdes, y compris leur activité anti-inflammatoire et anti-tumorale, sont partiellement attribués à leurs propriétés antioxydantes, qui se manifestent comme suit : piégeage direct des ERO, suppression de leur formation par inhibition de certaines enzymes ou par chélation des ions métalliques impliqués dans leur production (propriétés chélatrices), sauvegarde des mécanismes de défense antioxydants de l'organisme [123].

#### 8.5.4. Activité photoprotectrice

Le niveau de rayonnement ultraviolet (UV) qui atteint la surface de la terre a augmenté de façon spectaculaire ces dernières années [124]. Ce phénomène, en plus de la surexposition de la peau au rayonnement UV, a contribué à une augmentation constante des troubles liés à la peau chez l'homme.

##### 8.5.4.1. Définition de l'activité Photoprotectrice

Le terme "photoprotection" fait référence à toutes les méthodes organiques et/ou artificielles qui peuvent lutter contre les effets nocifs du soleil. Le port de

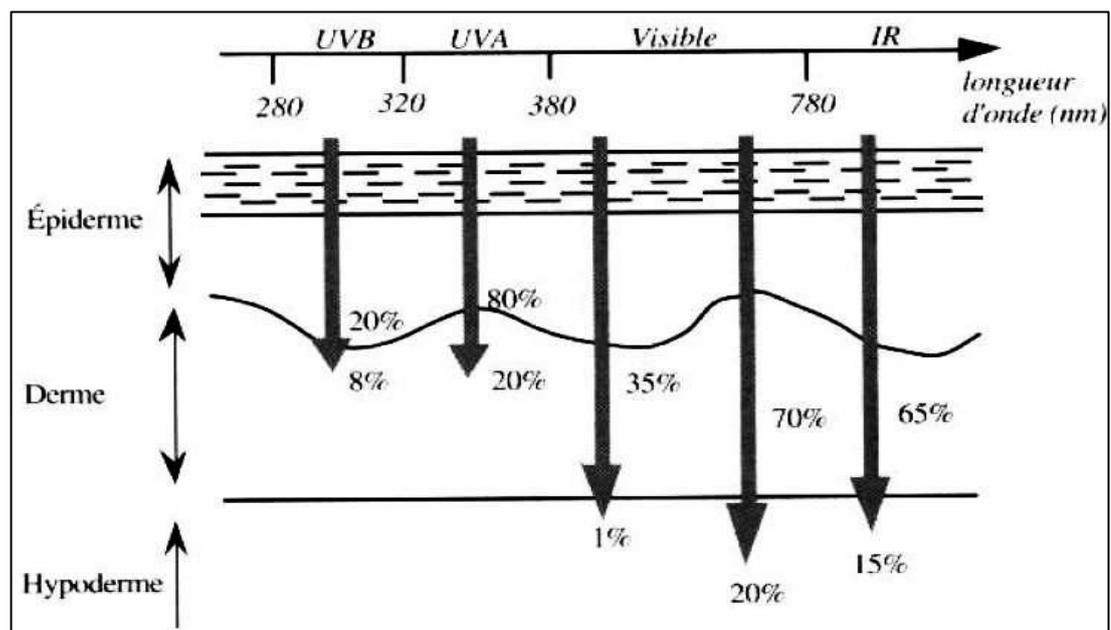
vêtements et l'utilisation de produits de protection solaire (PPS) sont les fondements de ce système [125].

#### 8.5.4.2. Effet des radiations UV sur la peau

Les dommages cutanés causés par les rayons UV peuvent prendre de nombreuses formes différentes. Plusieurs variables influencent la façon dont le rayonnement solaire affecte la peau.

- La quantité d'énergie absorbée.
- La profondeur de pénétration, qui est inversement corrélée à la longueur d'onde.

Les rayons infrarouge (IR) atteignent la jonction dermo-épidermique, les UVA le milieu du derme et les UVB l'hypoderme (Figure 1.13).



**Figure 1.13 :** Pénétration des rayonnements solaires en fonction de la longueur d'onde [126].

On estime qu'un million de personnes reçoivent chaque année un diagnostic de cancer de la peau et qu'environ 10 000 d'entre elles développent un mélanome malin. Les parties du corps les plus exposées au soleil, telles que le visage, le cou, la tête et le dos des mains, sont celles où se développent la majorité des

tumeurs malignes de la peau [127]. La partie UV du spectre électromagnétique est à l'origine de la majorité des effets néfastes du rayonnement solaire.

Le spectre du rayonnement solaire a un intervalle de 100 nm à 1 mm qui peut être divisée en cinq régions :

- UVC (de 100 nm à 290 nm);
- UVB (de 290 nm à 320 nm);
- UVA (de 320 nm à 400 nm);
- Champ visible (de 380 nm à 780 nm);
- L'infrarouge (de 780 nm à 1600 nm) [128].

Ces faits ont conduit à l'inclusion d'ingrédients de protection solaire dans des produits courants tels que les crèmes hydratantes, les lotions, les shampooings, les mousses et d'autres préparations pour les cheveux et la peau. L'utilisation régulière de ces produits peut contribuer à réduire la possibilité d'effets négatifs des rayons UV [127]. Par conséquent, les coups de soleil, le photovieillissement, l'érythème et l'inflammation peuvent être provoqués par les UVA, les UVB et les UVC. Pour prévenir tous les effets négatifs susmentionnés, nous devons utiliser des produits de protection solaire sur notre peau [129].

#### 8.5.4.3. Détermination de l'efficacité des produits solaires

##### 8.5.4.3.1. Notion de Facteur de Protection Solaire (FPS)

Le Facteur de Protection Solaire (FPS) ou Indice de Protection, est proportionnel à l'effet photoprotecteur d'un produit contre les rayons UVB. L'efficacité d'une crème solaire est mesurée par son FPS. Ce facteur est déterminé en contrôlant la sensibilité de chaque personne aux systèmes solaires par le biais du rayonnement UV, avec ou sans produit solaire [130]. La crème est d'autant plus efficace pour prévenir les coups de soleil que son FPS est élevé.

##### 8.5.4.3.2. Produits de protection solaire (PPS)

Un PPS est composé de molécules actives s'opposant à la pénétration des photons dans la peau, qui peuvent être des filtres ou des écrans [125]. Ils sont différents par leur mécanisme d'action et leur composition [131]. Les formulations

disponibles dans le commerce comprennent une combinaison de ces agents pour couvrir un large spectre de rayonnement UV. L'action de cet écran solaire peut varier du blocage, de la réflexion et de la diffusion de la lumière solaire. Les écrans solaires chimiques absorbent les rayons UV, tandis que les écrans solaires physiques réfléchissent ou diffusent la lumière. Un agent solaire idéal doit être sûr, chimiquement inerte, non irritant, non toxique, photo-stable et devrait fournir une protection complète à la peau [129, 132].

#### 8.5.4.4. Polyphénols photoprotecteurs

La recherche a permis de découvrir de nombreux produits capables de bloquer les rayons UV et d'atténuer leurs effets sur la peau. Aujourd'hui, les composés naturels ont fait l'objet d'une attention considérable en tant qu'agents photoprotecteurs en raison de leurs activités biologiques étendues telles que l'absorption des UV, les antioxydants et les anti-inflammatoires [133]. Plusieurs études ont démontré que les acides phénoliques et les flavonoïdes fournissent une photoprotection en réduisant le stress oxydatif et l'inflammation. Dans les tissus épidermiques des plantes, les rayons UV provoquent l'accumulation de flavonoïdes et d'autres substances chimiques phénoliques. Par exemple, l'olivier et ses fruits contiennent des substances chimiques phénoliques spécifiques qui agissent comme des protecteurs contre les rayons UV [134]. En raison de leurs similitudes structurelles et fonctionnelles avec les filtres UV chimiques, qui améliorent leur action synergique et augmentent leur résistance à l'eau, ces substances sont utilisées comme ingrédients actifs naturels dans les formulations d'écrans solaires [8]. Par exemple, l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol, le tyrosol, le verbascoside et l'acide caféique d'olive ont réduit la peroxydation des lipides après une exposition au soleil et ils agissent aussi comme des inhibiteurs de la photocarcinogénèse en raison de leur forte activité antioxydante et de leur faible absorption des UV [18].

## 9. Biotransformation des margines

### 9.1. Généralités sur la biotransformation

La biotechnologie a révolutionné la façon dont les composés naturels sont transformés et utilisés dans divers domaines. La biotransformation (bioconversion)

est un aspect essentiel de la biotechnologie qui utilise des micro-organismes, des enzymes ou des voies métaboliques pour convertir des substrats naturels en produits souhaités. Elle offre une alternative durable aux procédés chimiques traditionnels en minimisant les déchets et en utilisant des conditions de réaction plus douces.

Les micro-organismes, tels que les bactéries, les levures et les champignons, jouent un rôle crucial dans la bioconversion des produits naturels. Leur diversité métabolique permet la production de divers métabolites secondaires à partir de substrats naturels. Les voies métaboliques spécifiques de ces organismes sont exploitées pour produire des composés d'intérêt commercial, tels que des antibiotiques, des enzymes, des pigments et d'autres produits chimiques [135-138]. Plusieurs stratégies sont employées pour la bioconversion des produits naturels. Elles comprennent l'utilisation d'enzymes isolées ou produites par des micro-organismes pour catalyser des réactions spécifiques, la manipulation génétique pour améliorer les voies métaboliques des micro-organismes et l'ingénierie métabolique pour optimiser la production de composés cible [139, 140].

## 9.2. État des connaissances de la biotransformation des margines

Les margines sont considérées comme une ressource exploitable qui pourrait être valorisée comme substrat dans divers bioprocédés à cause de la diversité en sources de carbone, des composés organiques et des minéraux [141]. Les microorganismes non-pathogènes qui se développent dans les margines ont la capacité de produire divers produits à haute valeur ajoutée (enzymes, acides organiques, EPS, etc, [142-145], parallèlement à la détoxification et 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* [55, 139, 146].

Plusieurs recherches ont été effectuées sur la biotransformation des margines et ou de l'extrait phénolique de margine afin de libérer ou bien concentrer de grandes

quantités de composés phénoliques simples ayant une valeur antioxydante élevée ainsi que des bio-alcools, vitamines, biosurfactants, EPS, bioplastiques.Etc. (Tableau 1.10).

**Tableau 1.10** : Composés à haute valeur ajoutée obtenus par la bioconversion des margines

Microorganismes	Produits	Réf
<i>Candida tropicalis</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ethanol	[144, 145]
<i>Clostridium</i> spp	Butanol	[147]
<i>Arthobacter</i> spp	Acide Indolacétique	[148]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biosurfactant : Rhamnolipide	[149]
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> et <i>Trametes trogii</i>	Hydroxytyrosol	[150]
<i>Funalia trogii</i> ATC00800 <i>Trametes versicolor</i> ATC00801	Acide Gibberellique, Acide abscisique, indolacetique et cytokinine	[151]
<i>Paenibacillus jamilae</i> CP-7	EPS	[152]
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSM 20205, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 1333 et <i>Aspergillus niger</i> DSM 2466	Hydroxytyrosol et tyrosol	[140]
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Bioplastiques: Homopolymères de 3-hydroxybutyrate et 3-hydroxyvalérate	[153]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Mannitol, acide citrique	[144]

### 9.3. Bioconversion des produits phénoliques

L'hydroxytyrosol est le composé phénolique le plus étudié et qui a constitué l'intérêt de plusieurs recherches en raison de ses remarquables activités pharmacologiques [154]. De plus, l'hydroxytyrosol est présent sous deux formes, libre et associé à d'autres molécules telles que l'oleuropéine, la diméthyloléuropéine, le verbascoside et les glucosides d'hydroxytyrosol [155-157]. L'hydroxytyrosol conjugué ne peut être récupéré par la technologie des membranes ou l'extraction par solvant. En outre, l'hydrolyse des margines nécessite une grande quantité de produits chimiques. Dans ce dernier cas, le label

"BIO" disparaîtrait. Par conséquent, les méthodologies appliquées pour hydrolyser les margines par une préparation enzymatique aide à récupérer le maximum de l'hydroxytyrosol. Les enzymes de type  $\alpha$  et  $\beta$ -glucosidases font l'objet de récupérer l'hydroxytyrosol conjugué [158, 159]. Cependant, les réactions de bioconversion à l'aide d'enzymes purifiées et immobilisées semblent être délicates que celles mettant en jeu des cellules microbiennes qui produisent les enzymes extracellulaires (*esterase*,  $\beta$ -glucosidase et *laccase*) dans le but de l'hydrolyse des polyphénols comme, l'oleuropéine, le ligustroside ou le verbascoside pour donner des monomères tels que l'hydroxytyrosol [150]. Le tableau 1.11 indique plusieurs travaux sur la bioconversion des composés phénoliques.

**Tableau 1.11** : Bio-composés obtenus après la bioconversion des produits phénoliques

Précurseurs	Produits	Microorganismes	Nature	Réf
Acide gallique	Pyrogallol	<i>Citrobacter freundii</i>	Bactérie	[160]
Acide vanillique	Vanilline	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Champignon filamenteux	[161]
	Gaïacol	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces sp. A3</i> , <i>Streptomyces sp. A5</i> et <i>Streptomyces sp. A13</i>	Bactérie et 3 Actinomycètes	[162]
Eugénol	Acide vanillique et vanilline	<i>Rhodococcus sp</i> <i>Pseudomonas sp</i>	Bactéries	[163, 164]
	Alcool coniférylique	<i>Escherichia coli</i>		[165]
Trans-Acide cinnamique	L-phénylalanine	<i>Rodoturula rubra</i>	Levure	[166]

Acide cinnamique et férulique	Acide vanillique, cinamamide et acide benzoïque	<i>Streptomyces</i>	Actinomycètes	[167]
Acide férulique	Vanilline et composés aromatiques	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Bacillus cereus</i>	Bactéries	[168-170]
Acide quinique	Acide shikimique	<i>Bacillus megaterium</i>	Bactérie	[171]
Acides hydroxycinnamiques	Dérivés du vinylphénol (4-vinylphénol et 4-vinylgaïacol)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bactérie	[172]
Oleuropéine	Hydroxytyrosol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Candida wickerhamii</i>	Levures	[173]
Oleuropéine, ligustroside et verbascoside	Hydroxytyrosol	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> et <i>Trametes trogii</i>	Champignons	[150]

## CHAPITRE 2

### PREPARATION DE L'HUILE ESSENTIELLE ET LA FRACTION VOLATILE DE MARGINE, ANALYSE CHIMIQUE ET DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNE, ANTIOXYDANTE ET PHOTOPROTECTRICE

L'huile essentielle (HE) et/ou la fraction volatile (FV) est le liquide obtenu par distillation ou entraînement à la vapeur d'eau d'une matrice riche en substances odorantes, volatiles et peu solubles dans l'eau. La diversité et la complexité des huiles essentielles rendent le choix des méthodes d'extraction délicat, car la méthode utilisée aura un impact sur la qualité de l'huile extraite, qui déterminera son utilisation ultérieure. Les HE<sub>S</sub> ne sont étudiées que depuis le 20<sup>ème</sup> siècle, notamment d'un point de vue chimique et biologique dans la phytothérapie et l'aromathérapie pour les utiliser dans la médecine complémentaire à des fins curatives. Aujourd'hui, la médecine moderne utilise les propriétés thérapeutiques des HE<sub>S</sub> et de leurs composants. En effet, de nombreux composés volatils sont désormais des ingrédients courants dans les préparations pharmaceutiques. Le thymol, par exemple, est utilisé dans les soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques et l'eugénol pour ses propriétés analgésiques [174, 175]. La science s'est récemment intéressée aux constituants des HE<sub>S</sub>, car un nombre important de composés volatils, tels que les monoterpènes et les sesquiterpènes, ont montré des activités pharmacologiques remarquables contre des maladies infectieuses et d'autres pathologies [176-179]. Par ailleurs, il est important de rappeler que chaque HE contient un grand nombre de molécules bioactives intéressantes et l'utilisation des techniques de chimie avancées telles que la chromatographie et l'étude des activités biologiques sont donc nécessaires pour identifier et classer chaque HE.

C'est dans cette optique que s'inscrit ce chapitre de la thèse, dont les principaux objectifs peuvent être résumés comme suit :

- Extraction de l'HE et la de la FV de margine et détermination de la composition chimique;

- Étude de l'impact de la coexistence de plusieurs voies de biosynthèse sur la composition chimique de l'HE et de la FV.
- Évaluation, *in vitro*, des activités biologiques (antimicrobienne, antioxydante et photoprotectrice);

## 1. Méthodologie expérimentale

### 1.1. Origine et traitement de la margine

La margine qui a fait l'objet de ce travail a été obtenue auprès de « SARL ARBAOLIVE HUILERIE » de la région de Larbaa (Lat. 3633054.2000 N-Long. 3 905.6300 E)-Blida (Algérie) au mois de Novembre, au cours de la saison oléicole 2019/2020. La margine récupérée était le sous-produit d'un processus d'extraction d'huile d'olive en trois phases. Les échantillons ont été soumis à une filtration suivie d'une centrifugation pour éliminer les solides en suspension. Enfin, la margine a été collectée dans des bouteilles et stockée dans le congélateur afin qu'elle garde ses caractéristiques biologiques et physico-chimiques initiales.

### 1.2. Etude physicochimique de margine

La caractérisation physicochimique de margine a été réalisée par la détermination des paramètres suivants :

#### 1.2.1. Acidité (pH)

La mesure du pH a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre de type (HANNA instruments modèle 210).

#### 1.2.2. Conductivité électrique

La conductivité a été mesurée à l'aide d'un conductimètre de type ADWA instruments. La conductivité est exprimée en mS/cm.

#### 1.2.3. Matière sèche (MS)

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension contenues dans l'échantillon. La détermination de leur MS consiste à sécher un volume de margine dans un

creuset en porcelaine à l'étuve (105°C) pendant 24 heures. La teneur en matière sèche est exprimée par la relation suivante :

$$MS (\%) = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

MS : Teneur en matière sèche (%).

M<sub>2</sub> : masse des margines après séchage (g).

M<sub>0</sub> : masse du creuset vide (g).

M<sub>1</sub> : masse de l'échantillon avant séchage (g).

#### 1.2.4. Taux d'humidité

En calculant la différence entre le poids d'échantillon humide et celui sèche. L'échantillon de margine séché a été refroidi dans un dessiccateur. La teneur en eau ou taux d'humidité est exprimée en % de masse.

$$TH (\%) = \frac{p - p_s}{p - p_o} \times 100$$

TH : Taux d'humidité (%).

p : masse d'échantillon avant séchage.

P<sub>s</sub> : masse d'échantillon après séchage.

P<sub>0</sub> : masse du creuset vide.

### 1.3. Préparation de l'huile essentielle (HE) et la fraction volatile (FV) de margine

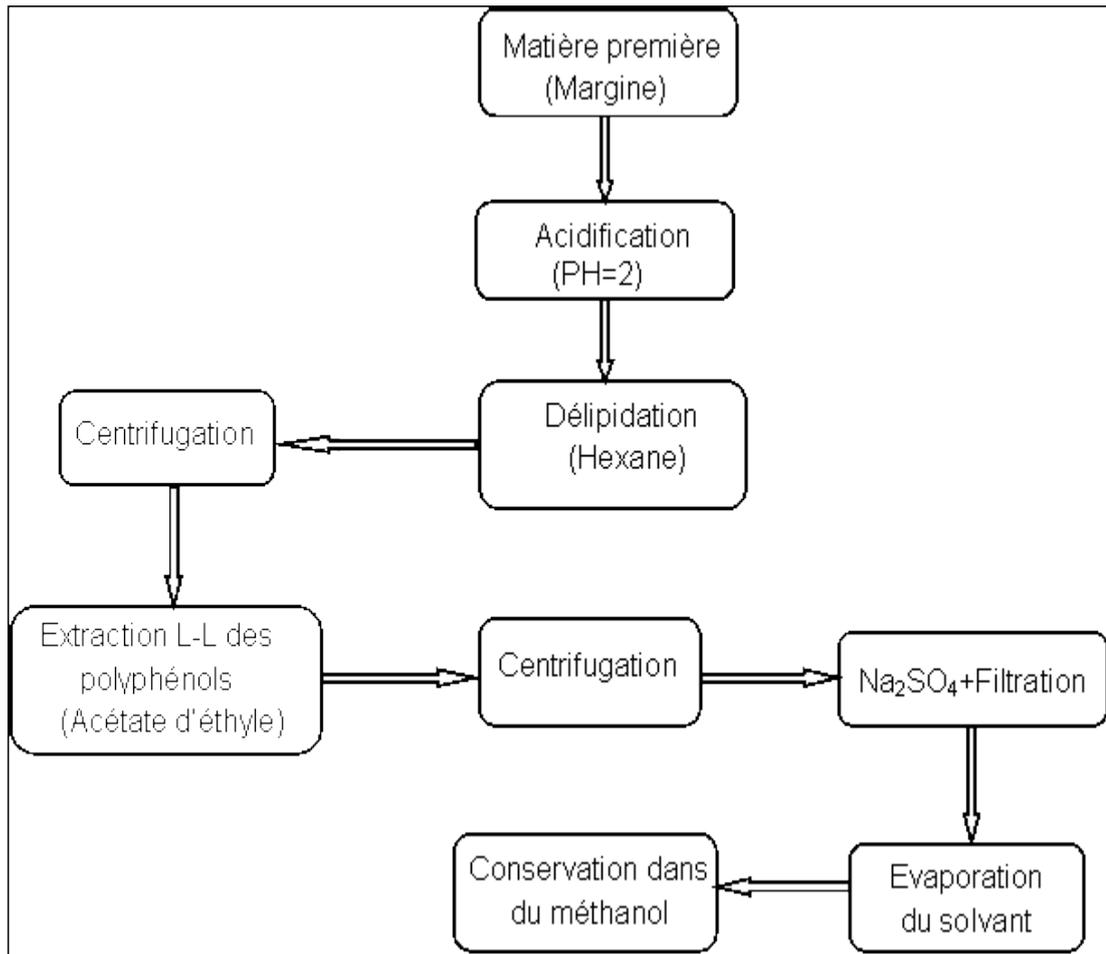
#### 1.3.1. Extraction de l'huile essentielle (HE)

L'HE de margine a été extraite par hydro-distillation pendant 3 heures à partir de 400 g de margine centrifugée. Dans cette approche, la margine et l'eau sont combinées avant d'être portées à ébullition. Les composés volatils contenus dans la margine sont libérés sous l'effet de la chaleur. Sous l'action de la vapeur d'eau, ces molécules produisent une combinaison hétéroazéotropique et la vapeur qui en résulte est évacuée et condensée dans le refroidisseur. À l'embouchure du condenseur, l'hydrolat (HE + eau) est récupéré dans un erlenmeyer. L'hydrolat est soumis à une extraction liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle, qui sépare le

mélange en deux phases : une phase aqueuse inférieure qui contient de l'eau, une petite quantité de composés hydrosolubles et une phase organique supérieure qui contient l'HE dissoute dans l'acétate d'éthyle. Afin d'extraire le maximum d'HE de la phase aqueuse, on procède à une deuxième extraction à l'acétate d'éthyle. Un évaporateur rotatif a été utilisé pour distiller les phases organiques récupérées sous pression réduite à 40°C après les avoir combinées et séchées sur du sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau restante. Le rendement de l'extraction a été déterminé par la pesée de l'HE produite. Elle est ensuite conservée dans des flacons ambrés à une température d'environ 4°C en vue d'utilisation ultérieure.

### 1.3.2. Préparation de l'extrait brut de margine

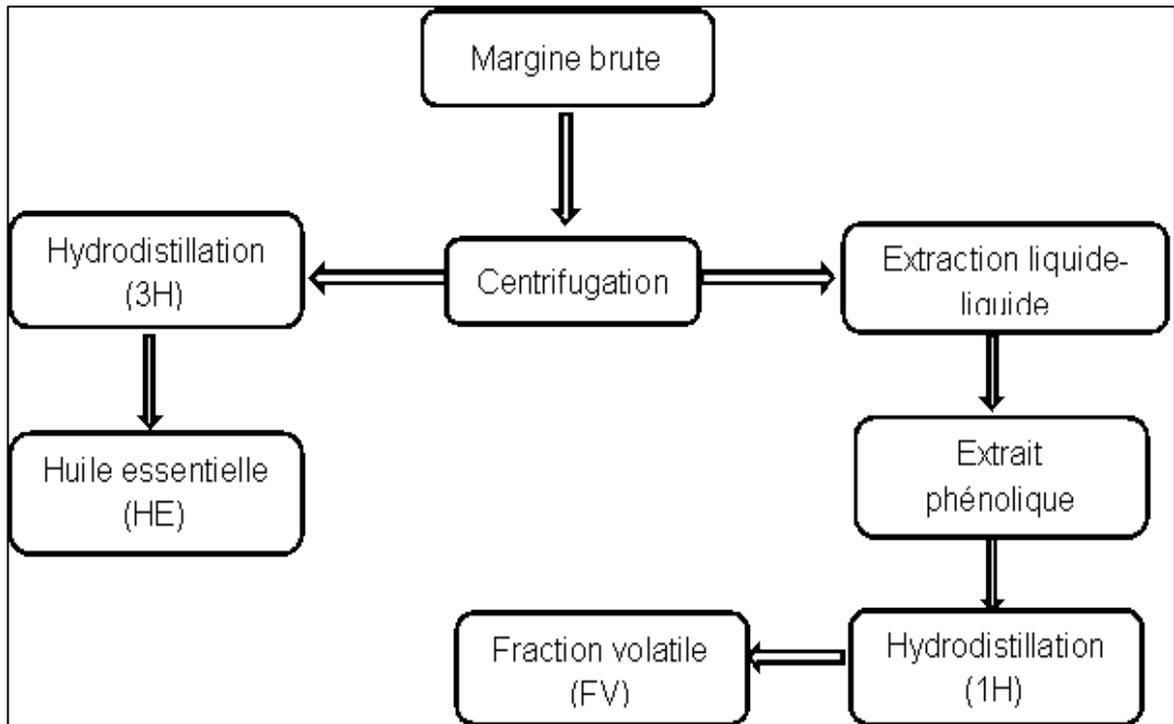
Le protocole d'extraction des composés phénoliques à partir des margines est basé sur la méthode décrite dans la littérature [95]. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle car ce dernier est confirmé d'être le meilleur solvant pour la récupération des composés phénoliques contenus dans la margine d'après plusieurs auteurs [68, 180, 181]. A cet effet, une masse de 300 g de margine brute a été centrifugé pendant 10 minutes à 4500 rpm et à 5 °C par le biais d'une centrifugeuse de type SIGMA 3-16KL, le pH a été ajusté à 2 à l'aide d'une solution HCl (0,5 N) pour stabiliser les phénols présents dans cette matrice. La solution obtenue a été traitée avec 100 ml d'hexane à trois reprises pour éliminer la fraction lipidique. La phase aqueuse a été recueillie pour une nouvelle extraction liquide-liquide en utilisant 100 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique riche en phénols a été obtenue après trois extractions successives. Après séchage sur sulfate de sodium anhydre, suivi d'une évaporation sous pression réduite à 40°C, nous avons obtenu notre extrait phénolique (Figure 2.1).



**Figure 2.1** : Organigramme de l'extraction des polyphénols de margine [95]

### 1.3.3. Extraction de la fraction volatile (FV) de margine

En utilisant un système de Dean-Stark modifié, la FV a été produite à partir de l'extrait brut (Figure 2.2). Le système est placé dans un ballon bicol, qui est ensuite rempli d'eau jusqu'à ébullition. La vapeur générée par la méthode de Dean-Starck modifiée pénètre dans le tube contenant l'extrait brut de margine, qui emporte alors les composants volatils sous forme d'hétéroazéotrope. Le mélange est ensuite condensé dans le refroidisseur. Une heure de distillation à la vapeur a été effectuée sur une quantité de 300 mg d'extrait combiné avec 500 mL d'eau distillée et l'hydrolat obtenu a subi le même traitement que l'HE. La FV récupérée a été pesée pour déterminer le rendement d'extraction et a été conservée à une température de 4 °C dans une bouteille ambrée.



**Figure 2.2 :** Organigramme de l'obtention de l'HE et la FV de margine

#### 1.3.4. Calcul du rendement

Le rendement d'extraction d'HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile extraite  $M_{HE}$  et la masse de margine brute ( $M_M$ ).

$$R_{HE}(\%) = M_{HE}/M_M * 100$$

Le rendement en extrait  $R_E$  s'exprime par le rapport entre la masse d'extrait ( $M_E$ ) obtenu et la masse de margine ( $M_M$ ) par la relation suivante :

$$R_E(\%) = M_E/M_M * 100$$

Le rendement de la FV.  $R_{FV}(\%)$  est décrit comme étant le rapport de la masse de la fraction obtenue  $M_{FV}$  rapporté à celle de la masse d'extrait  $M_E$  :

$$R_{FV}(\%) = M_{FV}/M_E * 100$$

#### 1.4. Analyse chimique de l'huile essentielle et la fraction volatile de margine

##### 1.4.1. Caractérisation par infrarouge à transformée de Fourier

La réflectance totale atténuée (ATR) est la méthode d'échantillonnage la plus utilisée pour la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). La ATR-IRTF mesure rapidement et facilement une large gamme de types d'échantillons, y compris des liquides, des solides, des poudres, des semi-solides et des pâtes sans ajouter de solvant ni changer de pastille. De plus, Elle offre le plus haut niveau de fiabilité pour la caractérisation des matériaux.

Un spectromètre IRTF de modèle Nicolet™ iS™ 10, a été utilisé pour les mesures de films secs ATR. Il était équipé d'un détecteur de sulfate de triglycine deutéré (DTGS) à réponse rapide, des échantillons liquides de 0,5 µL (HE ou FV) ont été séchés sur le cristal ATR en diamant de l'accessoire monoréflexion Dura Sample IR II pour liquides, de Smiths Détection Inc. (Andover, MA, USA). Le logiciel OMNIC 9.8, de Nicolet iS10, a été utilisé pour le contrôle de l'instrument et le traitement des spectres, sous le système d'exploitation Microsoft Windows 10. L'absorbance a été enregistrée sur la plage 4000-525 cm<sup>-1</sup> à une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> avec une moyenne de 32 balayages par spectre.

##### 1.4.2. Identification des composés volatils de l'huile essentielle et de la fraction volatile de margine

L'identification de la composition chimique de l'HE et de la FV de margine a été réalisée qualitativement par analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) et quantitativement par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CG/DIF) pour la détermination des teneurs en masse des différents constituants.

Les analyses CG/SM ont été effectuées sur un système GC2010 (Shimadzu, Kyoto, Japon). Le système d'analyse est équipé d'un injecteur à échantillonneur automatique et d'une colonne de séparation capillaire en silice fondue HP-5 (30 m x 0,25 mm i.d., df 0,25 µm). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 28,8 mL/min et à une vitesse linéaire constante de 33,3 cm/s, ce qui

correspond à une pression d'entrée de 43,6 kPa. La température de l'injecteur a été réglée à 250 °C. La température du four a été maintenue à 60°C pendant 5 minutes, puis augmentée à 250°C à une rampe de 3°C.min<sup>-1</sup>. Les températures de l'interface et de la source d'ions étaient respectivement fixées à 250°C et 200°C. L'acquisition a été réalisée en mode balayage complet dans la gamme de masse 35 à 550 m/z, avec un intervalle de balayage de 0,2 s. Les échantillons ont été dissous dans de l'acétate d'éthyle (10 %), puis 1 µL a été injecté en mode division split avec un rapport de division (split ratio) de 1:90. Le traitement des données est réalisé à l'aide du logiciel LabSolution ver. 5,97 (Shimadzu, Kyoto, Japon).

L'identification a été réalisée en appliquant deux filtres, une correspondance de similarité spectrale supérieure à 90 % et une correspondance de l'indice de rétention linéaire (IRL) calculée à l'aide d'une série d'homologues de n-alcanes saturés C7 et C40 (1000 g/mL, 49452-U) fournis par Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne) avec une fenêtre de filtrage de ±10 unités IRL. Une identification plus poussée a été réalisée sur la base des spectres de masse rapportés par des spécialistes [182]. Pour caractériser et identifier la composition chimique, les bases de données suivantes ont été utilisées : W11N17 (DB1) (Wiley11-Nist17, Wiley, Hoboken, NJ, USA ; et FFNSC 3.0 (DB2) (Shimadzu, Kyoto, Japon).

L'analyse CG/DIF a également été réalisée dans les mêmes conditions et la quantification de la composition chimique a été déterminée comme étant le pourcentage de surface des pics sans aucune correction.

## 1.5. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de la fraction volatile de margine

### 1.5.1. Microdilutions

La méthode de microdilution en bouillon a été utilisée pour évaluer quantitativement l'activité antimicrobienne en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE et la FV, qui représentent la plus faible concentration de l'agent antimicrobien capable d'empêcher la croissance des souches pathogènes testées.

### 1.5.2. Microorganismes testés

Douze souches, dont dix bactéries et deux levures, ont été utilisées et conservées par repiquage sur des géloses nutritives favorables à leur croissance. Ces souches ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie). Elles sont données dans le tableau 2.1.

**Tableau 2.1** : Souches microbiennes utilisées

Souches	Gram	Références (ATCC)
<i>Bacillus subtilis</i> ( <i>B. subtilis</i> )	+	ATCC 6633
<i>Bacillus cereus</i> ( <i>B. cereus</i> )	+	ATCC 14975
<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> )	+	ATCC 44300
<i>Micrococcus luteus</i> ( <i>M. luteus</i> )	+	ATCC 14110
<i>Listeria monocytogenes</i> ( <i>L. monocytogenes</i> )	+	ATCC 13932
<i>Enterococcus faecium</i> ( <i>E. faecium</i> )	+	ATCC 51559
<i>Enterobacter cloacae</i> ( <i>E. cloacae</i> )	-	ATCC 13047
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )	-	ATCC 23308
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	-	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	-	ATCC 9027
<i>Candida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> )	Levures	ATCC 10231
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )		ATCC 9763

### 1.5.3. Repiquage des souches

Les souches microbiennes ont été injectées dans des boîtes de Pétri de 90 mm remplies de milieu solide de Mueller-Hinton à l'aide d'un écouvillon stérile. De nombreuses bactéries peuvent se développer dans ce milieu qui ne contient pas d'antibiotiques inhibiteurs. Les boîtes ont été incubées pendant 24 h et 48h pour les bactéries et levures, respectivement, à 37 °C. Le processus s'est déroulé dans un environnement aseptique.

### 1.5.4. Préparation et composition des milieux de culture

Selon leur nature, les bactéries peuvent se développer dans des environnements variés. Il n'existe donc pas de conditions de culture universelles qui favorisent la

croissance de tous les micro-organismes. La CMI a été déterminée conformément aux lignes directrices de l'institut des standards cliniques et de laboratoire (CLSI) par la méthode de microdilution [183]. Le milieu de culture utilisé pour les bactéries est le Lauria Bertani liquide (LB), constitué de 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl. Le liquide International Streptomyces Project (ISP2), obtenu par mélange de : 4 g de glucose, 10 g d'extrait de malt et 4 g d'extrait de levure, est utilisé comme milieu de croissance pour les levures. Un litre d'eau distillée a été utilisé pour dissoudre le mélange. Le milieu de culture a été stérilisé dans un autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

#### 1.5.5. Préparation de l'inoculum

Les inoculums ont été préparés en transférant 2 à 3 colonies identiques et bien isolées d'une culture microbienne dans des flacons contenant le bouillon nutritif stérile. Les suspensions microbiennes ont été ajustées à l'aide du spectrophotomètre UV-visible, à des densités optiques ( $DO_s$ ) qui varient de 0,08 à 0,12, après incubation au bain-marie pendant 24 h et 48 h pour les bactéries et les levures, respectivement, à 37°C.

#### 1.5.6. Préparation des différentes concentrations de l'huile essentielle et de la fraction volatile de margine

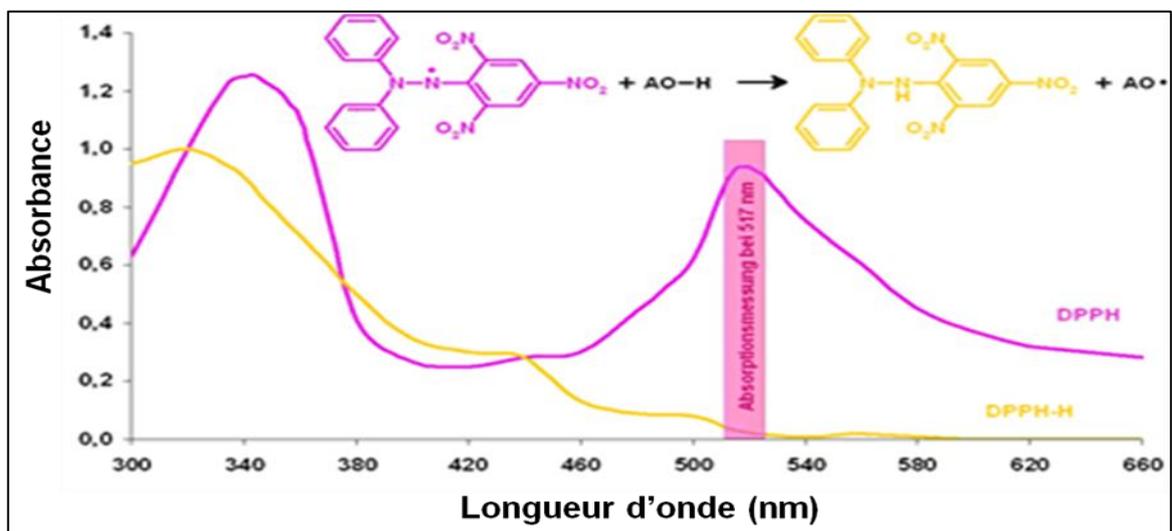
Les valeurs de la CMI des deux huiles ont été effectuées par microdilution sur des microplaques ELISA. La microplaque est divisée en 96 puits pouvant être schématisée sous forme de tableau de 8 lignes (A à H) et 12 colonnes (1 à 12), les quadrillages représentent les puits. Ces plaques ont été préparées en ajoutant 100  $\mu$ L d'HE et de FV dans le premier puits. Ensuite, 50  $\mu$ L de bouillon nutritif ont été ajoutés à chaque puits, du deuxième au douzième puits. Une série de doubles dilutions a été réalisée dans une gamme de concentration allant de 0,0488 à 50 mg/mL en transférant successivement 50  $\mu$ L du premier au onzième puits. Le dernier puits contenant 50  $\mu$ L de bouillon nutritif sans HE ni FV a été utilisé comme contrôle négatif, puis 50  $\mu$ L des suspensions ont été ajoutés aux puits de chaque bande, ce qui a conduit à un volume final de 100  $\mu$ L.

Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries et 36 à 48 heures pour le test antifongique. La kanamycine et le chloramphénicol ont été utilisés comme références avec une concentration n'excédant pas 10 mg/mL. Tous les tests ont été réalisés dans des conditions stériles.

## 1.6. Étude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et de la fraction volatile de margine

### 1.6.1. Piégeage du radical DPPH'

La capacité de l'extrait à servir d'antioxydant a été évaluée à l'aide du test DPPH, qui implique une réaction d'oxydoréduction avec le radical DPPH•. En raison de l'électron non apparié de l'azote, le radical est de couleur violette. Cependant, lorsqu'il réagit avec un atome d'oxygène provenant d'un piègeur de radicaux, la réduction du DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) est produite, ce qui donne une couleur jaune (Figure 2.3) [184]. La capacité antioxydante d'une substance ou d'un extrait peut être déterminée en mesurant le changement de couleur par spectrophotométrie à 517 nm [185, 186].



**Figure 2.3** : Principe de l'activité antioxydante du DPPH• [184]

### 1.6.2. Procédure expérimentale

La capacité antiradicalaire de l'HE et la FV de margine a été déterminée par la méthode de DPPH développée par M.S. Blois [187]. La procédure est décrite comme suit : Un volume de 0,4 mL de la solution méthanolique de l'HE et de la FV

à différentes concentrations (de 7,81 à 4000 µg/mL) et de l'acide ascorbique comme étalon, à différentes concentrations (2-40 µg/mL) ont été mélangés à 1,6 mL de solution méthanolique de DPPH (0,004 %). La réaction se déroule pendant 30 min dans l'obscurité. Le mélange a été incubé à 37 °C. Les résultats sont souvent rapportés à des antioxydants de référence, car il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé. Par conséquent, un test de piégeage des radicaux libres DPPH sur l'acide ascorbique a également été réalisé.

En parallèle, une solution exempte d'un antioxydant dite solution témoin, constituée de 0,4 mL du méthanol et 1,6 mL de la solution DPPH a été préparée dans les mêmes conditions opératoires. Le test antioxydant a été réalisé en "triplicata" et la lecture des résultats a été effectuée à 517 nm avec un spectrophotomètre UV-visible. L'activité antioxydante est définie par le pourcentage d'inhibition PI %, où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée à l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant avec l'équation (1) suivante :

$$PI \% = \frac{Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon}}}{Abs_{\text{contrôle}}} \times 100 \quad (1)$$

Abs échantillon : Absorbance à 517 nm du mélange réactionnel (échantillon + DPPH).

Abs contrôle : Absorbance à 517 nm du mélange sans échantillon (méthanol + DPPH).

## 1.7. Evaluation *in vitro* de l'activité photoprotectrice des deux huiles

### 1.7.1. Evaluation du facteur de protection solaire des deux huiles

L'activité FPS a été évaluée selon la technique de Mansur et al. [188] . Une concentration de 2 mg/mL a été obtenue en diluant l'HE et la FV dans du méthanol. Le blanc de l'analyse a été réalisé avec du méthanol. Les expériences ont été effectuées avec un spectrophotomètre UV/VIS en mode balayage à des longueurs d'onde allant de 290 à 320 nm, avec des intervalles de 5 nm. Les

mesures ont été effectuées avec une cellule de quartz de 1 cm. Comme rapporté dans la littérature [188], L'équation (2) mathématique suivante a été utilisée dans le calcul du FPS:

$$\text{FPS} = \text{FC} \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \text{I}(\lambda) \text{A}(\lambda) \quad (2)$$

Où :

EE ( $\lambda$ ) : Spectre d'effet érythémal (erythemal effect spectrum) ;

I ( $\lambda$ ) : Spectre d'intensité solaire (solar intensity spectrum) ;

A ( $\lambda$ ) : Absorbance des échantillons (absorbance of sunscreen product) ;

CF : Facteur de correction (correction factor : 10).

Le produit EE ( $\lambda$ )  $\times$  I ( $\lambda$ ) est une constante qui varie en fonction de la longueur d'onde et donnée par le tableau 2.2.

**Tableau 2.2** : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul du FPS [189]

Longueur d'onde $\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ ) $\times$ I ( $\lambda$ ) (Normes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Total	1

## 2. Résultats et discussions

### 2.1. Étude physicochimique de margine

#### 2.1.1. Mesure du pH et conductivité électrique

Le pH des margines analysées est acide et égal à 4,7, cette valeur est située dans l'intervalle cité dans le chapitre 1, cette valeur du pH est la conséquence de la présence d'acides organiques [190].

La salinité des margines, exprimé en conductivité électrique, est moyenne en comparaison à celles trouvées dans la littérature dont nous avons relevé une valeur de  $12,99 \text{ ms.cm}^{-1}$  [33].

#### 2.1.2. Matière sèche (MS) et taux d'humidité (TH)

Le taux de la matière sèche de la margine étudiée est de l'ordre de 6,9 %. Il correspond à l'ensemble de la matière organique et de la matière minérale. Cette valeur appartient à l'intervalle [1,4-17 %] comme rapporté dans la littérature [33].

Le rejet liquide analysé présente un TH de 93,10 %. Cette valeur se situe dans l'intervalle de valeurs (83-94 %) [191].

## 2.2. Étude chimique de l'huile essentielle et la fraction volatile de margine

### 2.2.1. Rendements et caractéristiques organoleptiques de la fraction volatile et l'huile essentielle de margine

Le rendement moyen de la FV de plusieurs manipulations est de 6,6 %. Le rendement moyen de l'HE est de 0,09 %. Il est nettement inférieur en comparaison à celui de la FV. Cette différence de rendement peut être fortement liée à la différence de composition chimique des deux huiles de margine, au procédé d'entraînement et aussi le temps d'extraction. Le contact de la vapeur avec l'extrait de margine pourrait entraîner plus de produit que celui du contact directe entre la vapeur et la margine brute.

Les propriétés organoleptiques de FV et d'HE estimées par nous-mêmes, sont regroupées dans le tableau 2.3.

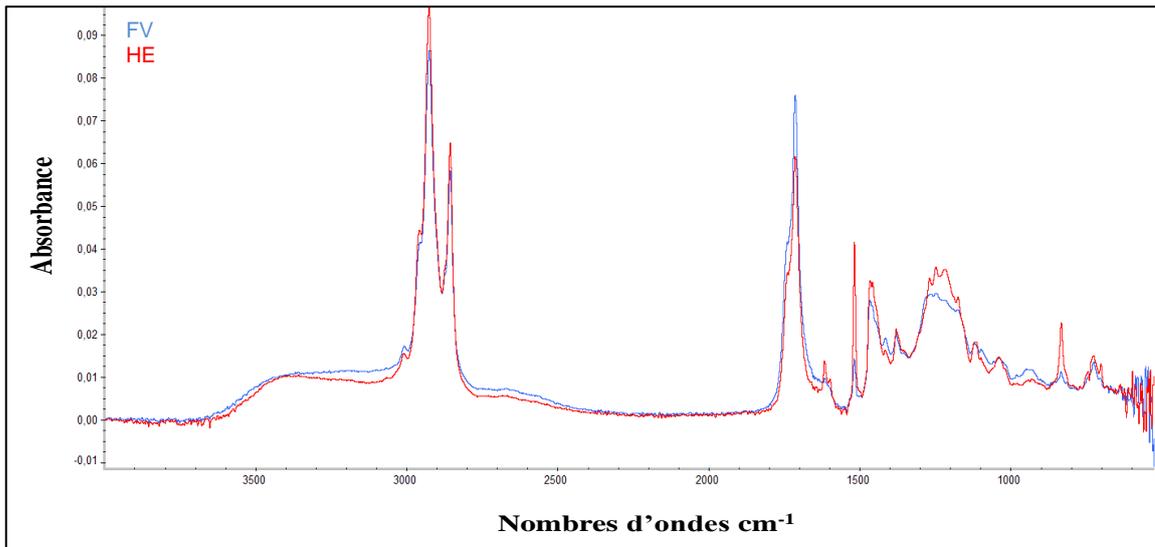
**Tableau 2.3** : Propriétés organoleptiques de la fraction volatile et l'huile essentielle de margine

	Caractères organoleptiques		
	Couleur	Aspect	Odeur
Huile essentielle	Jaune-orange	Liquide visqueux	Forte odeur-piquante
Fraction volatile	Jaunâtre-orange	Huileux	Forte odeur-piquante

La FV et l'HE de margine sont caractérisées par une odeur piquante et caractéristique de l'huile d'olive.

### 2.2.2. Analyse de l'huile essentielle et de la fraction volatile de margine par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier- Réflectance Totale Atténuée (ATR- IRTF)

L'analyse du spectre infrarouge de l'HE et de la FV de margine (Figure 2.4) révèle la présence de fortes bandes d'absorption à  $1463\text{ cm}^{-1}$ ,  $2923\text{ cm}^{-1}$ ,  $2853\text{ cm}^{-1}$  correspondant très probablement à des groupes méthynes, méthylènes et méthyles, respectivement. Le spectre IRTF montre également une forte bande d'absorption entre  $1600$  et  $1800\text{ cm}^{-1}$  centrée autour de  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Cette bande pourrait regrouper les mouvements d'élongation du groupe C=C à  $1500\text{ cm}^{-1}$ , indiquant la présence de composés aromatiques et ceux du groupe carbonyle C=O à  $1720$ - $1740\text{ cm}^{-1}$ , en relation avec la présence de composés portant une fonction carbonyle. La présence de composés aromatiques est associée à la présence de composés phénoliques. Cette hypothèse est confirmée de la manière la plus plausible par la présence de groupes OH de composés phénoliques, mais aussi d'alcools, à  $3358\text{ cm}^{-1}$  [192]. La corrélation entre les spectres FV et HE a été estimée à 71,69 %.



**Figure 2.4 :** Spectres ATR-IRTF de la FV (Bleu) et l'HE (rouge) extraite de margine

### 2.2.3. Analyse de l'huile essentielle et de la fraction volatile de margine par CG/SM et CG/DIF

Comme décrit ci-dessus, la CG/SM a permis d'identifier les différents composés en se basant sur la base de données SM et l'analyse CG/DIF avait un double objectif, à savoir le calcul des indices de rétention et la détermination de la teneur en pourcentage des différents composés.

Le tableau 2.4 regroupe la composition chimique de l'HE et de la FV de margine, les banques de données utilisées dans l'identification, les indices de rétention calculés et ceux fournis par la littérature ainsi que les pourcentages des différents composés déterminés par CG/DIF.

Il est important de noter que les profils chromatographiques de l'HE et la FV sont relativement différents (Appendice A 1).

**Tableau 2.4** : Composition chimique de l'HE et la FV de margine

N°	Composés	Database	IRL <sub>lit</sub>	IRL <sub>cal</sub>	FV (%)	HE (%)
1	2,2'-oxybis-éthanol	DB1, DB2	967	962	0,5	t
2	Acide caproïque	DB1, DB2	984	980	0,23	0,3
3	Phénol	DB1, DB2	986	982	0,4	0,5
4	Alcool benzylique	DB1, DB2	1032	1033	2	4,9
5	cis-furane Oxyde de linalool	DB1, DB2	1070	1072	-	0,12
6	p- Crésol	DB1, DB2	1077	1077	0,32	-
7	o. Gaïacol	DB1, DB2	1088	1088	0,11	0,5
8	Nonanal	DB1, DB2	1104	1104	0,17	-
9	Benzèneéthanol	DB1, DB2	1116	1112	3,61	7
10	Acide cyclohexanecarboxylique	DB1, DB2	1127	1120	-	0,12
11	Cis-Oxyde de limonène	DB1, DB2	1134	1134	-	t
12	Camphre	DB1, DB2	1143	1141	t	-
13	4-Ethylphénol	DB1, DB2	1170	1170	11,7	28,5
14	cis-pyran Oxyde de linalool	DB1, DB2	1173	1174	-	0,41
15	Acide caprylique	DB1, DB2	1178	1175	0,8	-
16	Isomenthol	DB1, DB2	1182	1182	0,65	-
17	Catéchol	DB1, DB2	1197	1205	1,1	0,2
18	4-Vinylphénol	DB1, DB2	1226	1221	0,3	0,7
19	cis-p-Propénylanisole	DB1, DB2	1269	1265	-	0,3
20	Acide pélargique	DB1, DB2	1272	1272	0,8	t
21	4-Ethylguaïacol	DB1, DB2	1282	1279	1,31	3,8
22	Acide cinnamique, ester méthylique	DB1, DB2	1350	1352	0,20	1,4
23	Acide nérique	DB1, DB2	1347	1358	-	0,2

24	Acide o-toluique, ester méthylique	DB1, DB2	1362	1365	0,2	0,4
25	Eugénol	DB1, DB2	1361	1368	-	11
26	Acide caprique	DB1, DB2	1380	1370	-	0,17
27	4-Éthylcatéchol	DB1, DB2	1392	1388	2,11	0,8
28	Tyrosol	DB1, DB2	1427	1427	2	0,36
29	Acide pélargonique	DB1, DB2	1483	1480	0,26	0,12
30	$\alpha$ -Farnesène	DB1, DB2	1508	1509	-	t
31	2,4-di-tert-Butylphénol	DB1, DB2	1519	1514	0,15	-
32	5-tert-Butylpyrogallol	DB1, DB2	1526	1527	0,2	0,7
33	Tyrosol, acétate	DB1, DB2	1567	1566	0,20	-
34	Acide myristique	DB1, DB2	1768	1761	0,1	0,16
35	Acide palmitoléique, ester méthylique	DB1, DB2	1890	1905	-	0,2
36	Acide palmitique, ester méthylique	DB1, DB2	1926	1927	0,14	1,5
37	Acide palmitoléique	DB1, DB2	1944	1943	0,55	1,7
38	Acide palmitique	DB1, DB2	1969	1967	3,3	2,1
39	Palmitoléate d'éthyle (E)-9	DB1, DB2	1978	1974	1,04	1,1
40	Acide palmitique, ester éthylique	DB1, DB2	1992	1995	4,4	7,4
41	Acide cis-linoléique, ester méthylique	DB1, DB2	2096	2095	0,7	0,7
42	Acide élaïdique, ester méthylique	DB1, DB2	2110	2101	2,01	2
43	Acide oléique	DB1, DB2	2146	2145	24,9	6
44	Acide linoléique, ester éthylique	DB1, DB2	2164	2164	5,7	3
45	Acide élaïdique, ester éthylique	DB1, DB2	2174	2170	16,42	11
46	Acide stéarique, ester éthylique	DB1, DB2	2199	2195	0,3	0,2
47	Palmitate d'isopentyle	DB1, DB2	2246	2246	0,21	-

48	Acétylcitrate de tributyle	DB1, DB2	2254	2269	0,4	-
49	Tétracosne	DB1, DB2	2400	2400	0,2	-
50	Propionate de 2-octyldodécyle	DB1, DB2	2411	2411	0,17	-
51	Acide oléique, ester pentylique	DB1, DB2	2421	2421	0,31	-

$LRI_{lit}$  : Indice de Rétention Linéaire rapporté dans la littérature,  $LRI_{cal}$  : Indice de Rétention Linéaire calculés, t : trace  $\leq 0.1$  %, (-) : Composé inexistant.

Ces analyses ont permis d'identifier quarante et trente-neuf composés représentant 90,17 % et 99,26 % des compositions totales dans l'HE et la FV, respectivement (Tableau 2.4). L'examen de la composition chimique de l'HE et du FV révèle la présence de trois classes chimiques distinctes et d'un groupe formé d'un mélange de composés diversement fonctionnalisés.

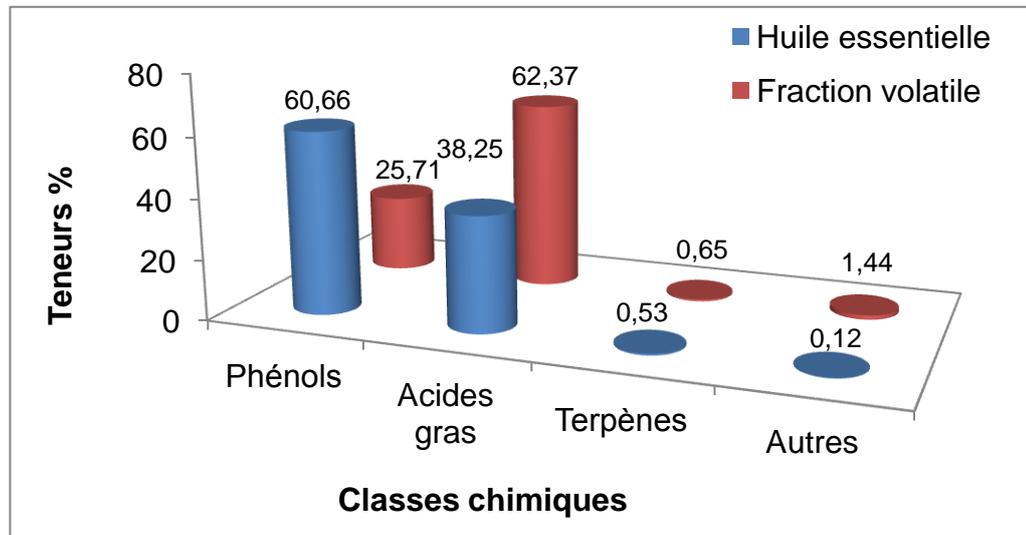
Le tableau 2.5 énumère les noms des classes chimiques et les numéros dans l'ordre d'apparition des composés correspondants dans le tableau 2.4.

**Tableau 2.5** : Répartition des composés par classe chimique

Classes chimiques	Numéros des composés	Teneurs (%)	
		FV	HE
Phénols	3, 4, 6, 7, 9, 13, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 27, 28, 31, 32, 33.	25,71	60,66
Acides gras	2, 15, 20, 23, 24 26, 29, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 51.	62,37	38,25
Terpènes	5, 11, 12 , 14, 16, 30	0,65	0,53
Alcanes, aldéhydes et composés oxygénés apparentés (alcools, carbonyles et esters)	1, 8, 10, 48, 49, 50	1,44	0,12

Pour mieux apprécier la présence des différentes classes chimiques dans la composition chimique des deux huiles de margine, nous avons représenté les

données du tableau 2.5 sous forme d'histogramme (Figure 2.5), en tenant compte de la teneur de chaque classe.



**Figure 2.5 :** Teneur des différentes classes chimiques dans l'HE et la FV de margine

La composition chimique de la FV et de l'HE peut être divisée en quatre classes chimiques (Tableau 2.5, Figure 2.5) : Terpènes (FV- 0,65 % ; HE- 0,53 %), composés phénoliques (FV- 25,71 % ; HE- 60,66 %), acides gras (FV- 62,37 % ; HE- 38,25 %) et autres (composés diversement fonctionnalisés) (FV- 1,44 % ; HE- 0,12 %). Des recherches antérieures avaient déjà signalé la présence d'acides gras [193], de phénols [194] et de terpènes [195, 196] dans la composition chimique principale de l'huile d'olive et de margine. Un examen plus approfondi de la composition chimique (Tableau 2.4) révèle la présence d'acide oléique et de son isomère, l'acide élaïdique (identifié comme un ester éthylique), de tyrosol et de son dérivé, l'acétate de tyrosol (considéré comme un sécoiridoïde), ces deux composés ayant déjà été signalés dans l'huile d'olive vierge [197].

La somme des pourcentages de composés phénoliques et d'acides gras dans l'HE et la FV est respectivement de 88,08 % et 98,61 %. On constate donc que la quasi-totalité de la composition chimique des deux huiles est constituée de composés phénoliques et/ou d'acides gras. Comme mentionné ci-dessus et selon la figure 2.5, les composés phénoliques et les acides gras sont les classes

chimiques prédominantes dans l'HE et la FV, respectivement. Les résultats révèlent également que la principale classe chimique de l'HE est constituée de composés phénoliques (60,66 %), dont le 4-éthylphénol (28,5 %) est le composé majoritaire.

Ce résultat est assez surprenant étant donné que les deux huiles, obtenues à partir de margine, devraient, selon toute vraisemblance, avoir une composition chimique relativement similaire, notamment en ce qui concerne la nature chimique de la classe principale. Il semble donc que l'hypothèse de l'intervention d'un processus de dégradation soit plus que probable. Ainsi, comme l'HE a été directement préparé à partir de la margine alors que le FV a été obtenu après deux étapes comprenant la préparation de l'extrait puis son hydrodistillation, il est plausible que les phénols, très sensibles à la chaleur, au sein du FV aient subi des réactions de dégradation en acides gras. Il est possible que le processus de dégradation ait suivi le même mécanisme chimique que la bioconversion des phénols en acides gras. Ces résultats sont très probablement liés à un processus de bioconversion/dégradation des phénols en acides gras et vice versa. Ainsi, la coexistence simultanée des quatre classes principales dans la composition chimique du FV et de l'HE pourrait très être liée à des considérations biosynthétiques, comme l'illustre la figure 2.6 qui décrit les voies de biosynthèse des différentes classes chimiques et certaines voies plausibles suggérées sur la base de la composition chimique de la FV et de l'HE [198].

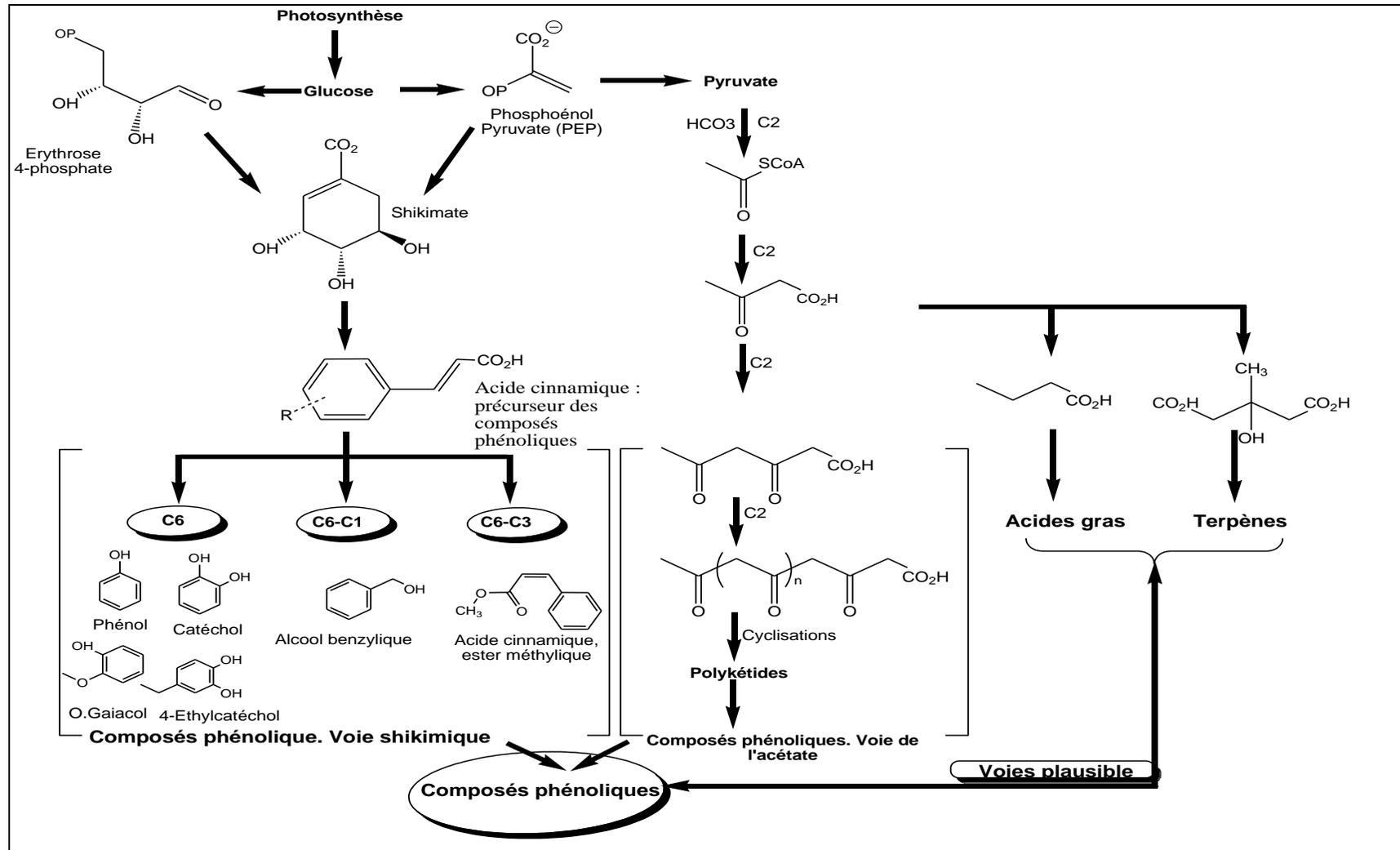
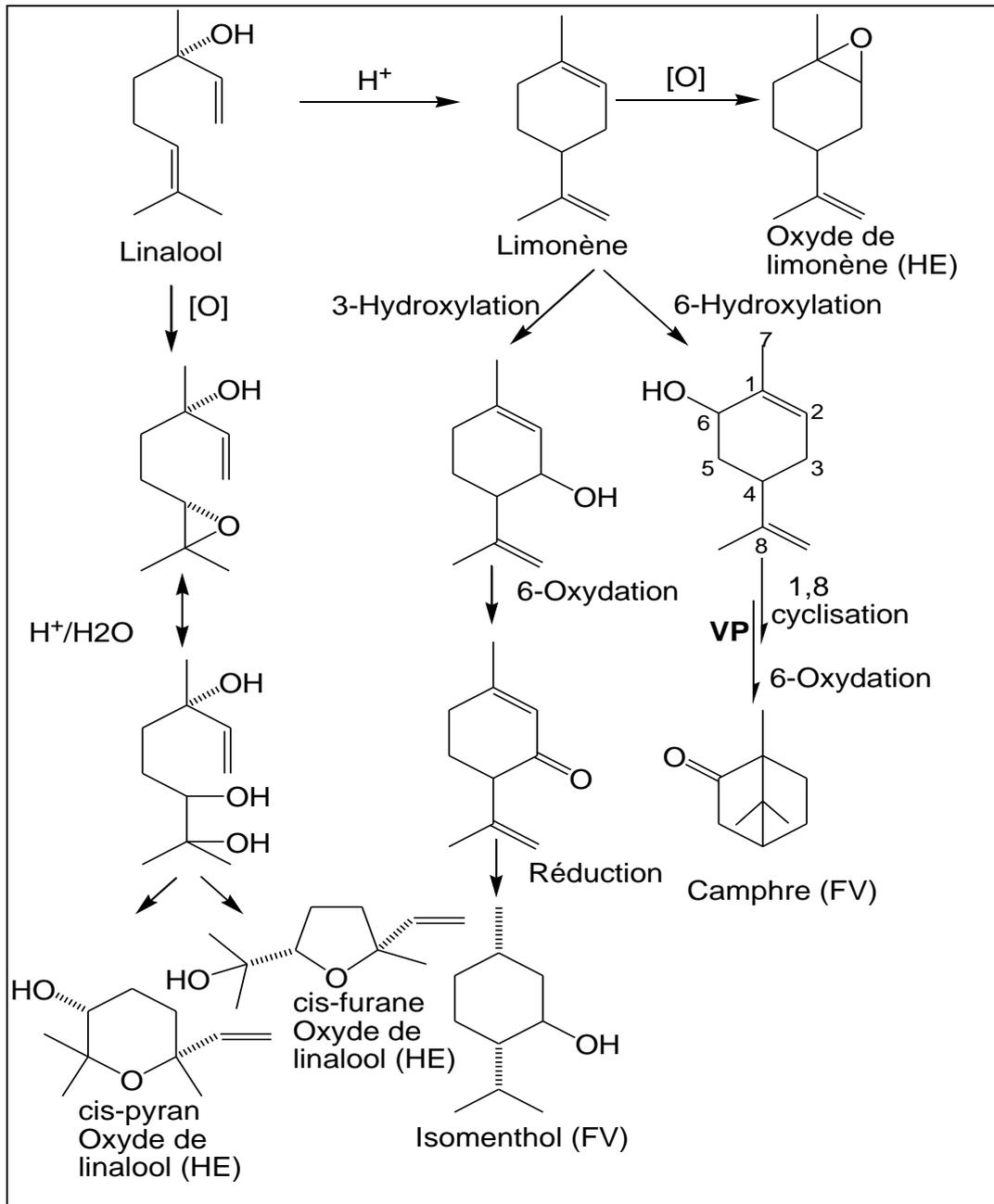


Figure 2.6 : Interconnexion des voies de biosynthèse des différentes classes chimiques présentes dans l'HE et la FV.

Comme le montre la figure 2.6, l'acide shikimique est le précurseur biosynthétique de la majorité des composés phénoliques, tandis que l'acétyl-coenzyme A est le précurseur des acides gras, qui est également le précurseur des terpènes par l'intermédiaire de l'acide mévalonique et des composés phénoliques par l'intermédiaire du malonyl-coenzyme A. Il est tout à fait admissible que les contenus des quatre classes chimiques soient très probablement interdépendants.

Les substances volatiles principales des huiles d'olive possédant 5 et 6 atomes de carbone ; plus particulièrement, les aldéhydes et les alcools en C6, représentant la majeure partie de la fraction volatile de ces huiles. Au sein du fruit, à partir d'acide gras poly insaturés, ces composés sont formés principalement par une voie enzymatique appelée « voie de lipoxygénase » (LOX). Cette voie se produit lors du processus d'extraction de l'huile d'olives et notamment lors de la première étape de fabrication qui consiste à broyer et malaxer les olives jusqu'à l'obtention d'une pâte. Les aldéhydes et les alcools ainsi formés jouent un rôle important dans la flaveur de l'huile d'olive et donc sur sa qualité [199-201]. Les enzymes responsables de la biosynthèse ont des activités qui dépendent de plusieurs facteurs à savoir, le stade de maturation, le climat et la variété des olives [202].

La faible teneur en terpènes dans la FV et l'HE est probablement liée soit à leur perte au cours du processus de préparation de l'extrait de margine par extraction liquide, soit à leur dégradation sous l'effet de la chaleur, bien que cette dernière hypothèse reste moins probable. Dans la présente étude, nous avons noté la présence de l'oxyde de cis-limonène, de l'oxyde des cis-pyran-linalool et cis-furan-linalool, de l'isomenthol et du camphre en tant que monoterpènes et du farnésène en tant que sesquiterpène. Les réactions de biotransformation proposées de ces terpènes sont illustrées dans la figure 2.7.



**Figure 2.7 :** Voies de bioconversion du limonène et du linalool à l'aide d'*Aspergillus niger* et vois plausibles proposées (VP) menant au camphre et à l'isomenthol.

Ainsi, il convient de noter la présence de linalool et de limonène dans la FV de l'huile d'olive [203, 204], alors que, dans la présente étude, ils sont décrits dans l'HE sous forme d'oxyde de limonène et d'oxyde de linalool dans la forme furanique et pyranique. Cette constatation est très probablement liée à leur

transformation chimique sous l'effet de la vapeur ou à leur bioconversion par des micro-organismes spécifiques présents dans la margine. Dans ce contexte, la biotransformation du linalool en oxyde de limonène, ainsi qu'en oxyde de linalool sous les deux formes furanique et pyranique a été rapportée [205] en utilisant différentes espèces de la souche *Aspergillus niger*, un champignon trouvé et isolé dans les margines [206]. Dans le même ordre, des voies de bioconversion plausibles (VP) sont proposées pour obtenir du camphre et de l'isomenthol à partir du limonène. La biosynthèse du néomenthol (isomère de l'isomenthol) à partir du limonène dans les huiles essentielles de *Mentha arvensis L.* a également été décrite [207].

De plus, la présence de farnésène, même à l'état de traces, dans l'HE et non dans la FV, est liée au temps d'hydrodistillation relativement long (3H) qui favorise son entraînement puisqu'il s'agit d'un composé de poids moléculaire élevé et de faible pression de vapeur. La présence de farnésène et de limonène dans l'huile d'olive traitée par hydrodistillation et microextraction en phase solide (MEPS) a été prouvée précédemment [196]. Il convient de souligner que les monoterpènes, les sesquiterpènes et les benzénoïdes ont été décrits comme étant plus abondants dans la fraction volatile de l'huile d'olive vierge obtenue par hydrodistillation que par MEPS [208] et vice versa pour l'abondance de leurs acides gras.

### 2.3. Détermination des activités biologiques de la fraction volatile et l'huile essentielle

#### 2.3.1. Détermination de l'activité antimicrobienne de la fraction volatile et de l'huile essentielle

##### 2.3.1.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Dans notre étude, la FV et l'HE de margine ont été testées de manière quantitative vis-à-vis de douze souches microbiennes à travers la détermination de la CMI, il a été procédé ensuite à la comparaison des valeurs obtenues par rapports à des standards antibiotiques qui sont le chloramphénicol et la kanamycine. Les valeurs de la CMI obtenues sont données dans le tableau 2.6.

**Tableau 2.6** : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices de l'HE et la FV

Microorganismes	Gram	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )			
		HE	FV	Kanamycine	Chloramphénicol
<i>B. subtilis</i>	+	3125,0	3125,0	62,50	3,90
<i>B. cereus</i>	+	1562,5	1562,5	7,81	1,95
<i>S. aureus</i>	+	781,25	781,25	15,62	15,62
<i>M. luteus</i>	+	1562,5	781,25	15,62	7,81
<i>L.monocytogenes</i>	+	1562,5	1562,5	15,62	7,81
<i>E. feacium</i>	+	1562,5	781,25	62,50	3,90
<i>E. cloacae</i>	-	781,25	1562,5	7,81	3,90
<i>A. tumefaciens</i>	-	1562,5	781,25	1,95	15,62
<i>E. coli</i>	-	390,625	195,30	–	3,90
<i>P. aeruginosa</i>	-	1562,5	1562,5	1,95	3,90
<i>C. albicans</i>	Levures	1562,5	781,25	3,90	3,90
<i>S. cerevisiae</i>		781,25	390,625	–	3,90

D'après le tableau 2.6, la FV présente une forte activité antimicrobienne par rapport à l'HE. Ainsi, l'HE et la FV ont inhibé la croissance de tous les micro-organismes testés à différentes concentrations. Les valeurs des CMI étaient comprises entre (195,30-1562,5  $\mu\text{g/mL}$ ) et (390,62-3125  $\mu\text{g/mL}$ ) pour le FV et l'HE, respectivement.

Sur la base des données ci-dessus, il est évident que la FV a montré un effet inhibiteur plus fort vis-à-vis des souches : *M. luteus*, *E. coli*, *A. tumefaciens*, *E. feacium*, *C. albicans* et *S. cerevisiae*. En outre, les deux huiles ont montré la même activité contre *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *P. aeruginosa*. Cependant, l'HE n'a devancé la FV qu'une seule fois contre *E. cloacae*. La kanamycine et le chloramphénicol ont montré les valeurs de CMI les plus basses, c'est-à-dire un effet inhibiteur très fort contre tous les micro-organismes testés en comparaison avec la FV et l'HE. Il faut noter que *B. subtilis*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* et *P. aeruginosa* étaient les micro-organismes les plus résistants. Inversement, *E. coli* et *S. cerevisiae* étaient les plus sensibles.

La forte activité antibactérienne de la FV pourrait être liée à sa composition chimique particulièrement riche en acides gras, notamment insaturés. Ces derniers sont également réputés pour leur activité biologique élevée et sont impliqués dans divers processus de biosynthèse. À cet égard, les acides gras insaturés à longue chaîne sont dotés d'une activité antibactérienne [209]. En outre, il a été rapporté que les acides gras inhibent la croissance bactérienne en perturbant les membranes bactériennes ou en inhibant la synthèse des acides gras [210]. D'après l'analyse CG-SM de la FV, la fraction d'acides gras se compose d'acide oléique et de son isomère l'acide élaïdique, d'acide linoléique, de leur ester éthylique et de l'ester éthylique de l'acide stéarique, qui sont connus pour leur activité antibactérienne contre plusieurs micro-organismes tels que *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* et *S. aureus*, entre autres [211].

En outre, une synergie entre ces acides gras pourrait se produire et renforcer l'activité antimicrobienne de la FV. À cet égard, il a été constaté que les acides oléique et linoléique ont un effet antimicrobien synergique lorsqu'ils sont mélangés [212]. En outre, la présence de tyrosol dans la composition de la FV (2 %) en plus grande quantité que dans l'HE (0,3 %) et l'acétate de tyrosol (0,2 %) qui n'a été trouvé que dans la FV pourrait également être une raison de son activité élevée. Dans ce scénario, il a été signalé que ces deux composants sont dotés de bonnes activités antimicrobiennes [213].

### 2.3.2. Détermination de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et de la fraction volatile de margine

#### 2.3.2.1. Détermination de la concentration inhibitrice

La capacité de piégeage des radicaux libres DPPH par l'HE, la FV et l'acide ascorbique a été obtenue graphiquement en traçant les pourcentages d'inhibition (PI %) des radicaux en fonction des concentrations des échantillons (Figure 2.8). L'activité antioxydante des deux huiles et du standard a été exprimée en termes de concentration inhibitrice  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) dans le tableau 2.7 et 2.8, respectivement. Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant qui provoque l'inhibition de 50 % du radical DPPH\* [214]. Notons

que la capacité antioxydante d'une substance est d'autant plus élevée que sa  $CI_{50}$  est petite.

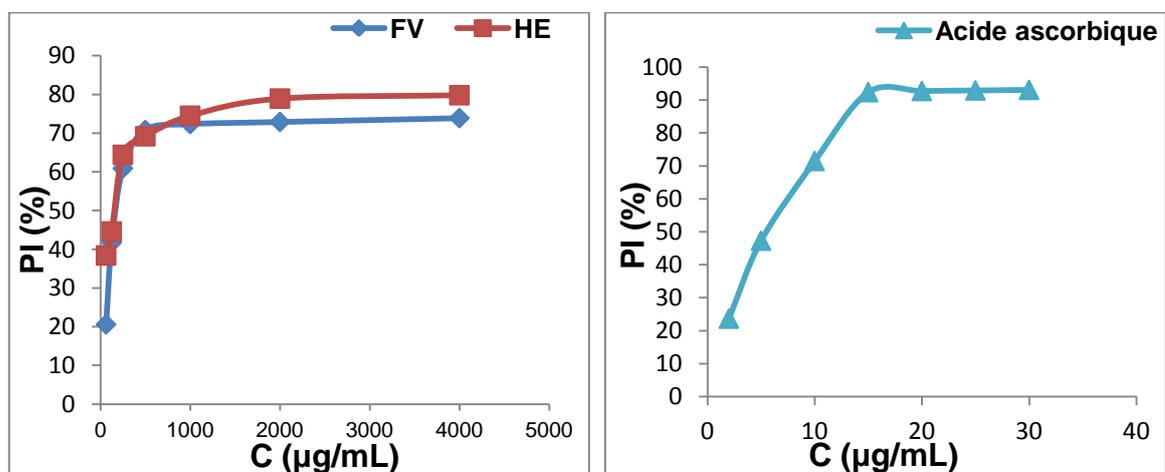
**Tableau 2.7 :** Activité antioxydante de l'HE et la FV de margine

C ( $\mu\text{g/mL}$ )	PI (%)							$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	62.5	125	250	500	1000	2000	4000	
FV	20,60	41,70	60,90	70,81	72,36	72,91	73,90	244
HE	38,40	44,60	64,40	69,20	74,50	78,93	79,80	218

**Tableau 2.8 :** Activité antioxydante de l'acide ascorbique

C ( $\mu\text{g/mL}$ )	PI (%)							$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	2	5	10	15	20	25	30	
Acide ascorbique	23,66	47,32	71,5	92,4	92,75	92,92	93,09	5,55

Les résultats des tableaux 2.7 et 2.8 ont révélé que l'activité antioxydante de l'HE et la FV était significativement inférieure à celle de l'acide ascorbique et les standards BHA, BHT et  $\alpha$ -tocophérol déjà étudiées dans les mêmes conditions, qui présentent de forte activité antioxydante avec des  $CI_{50}$  de 5,5, 6,14, 12,99 et 13,02, respectivement [215]. La  $CI_{50}$  enregistrée pour l'HE est relativement meilleure que pour la FV.



**Figure 2.8 :** Variation du taux de piégeage du DPPH• par l'HE, la FV et l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations

Il a été signalé précédemment que les alcools aromatiques alkylés de la margine présentent des propriétés antioxydantes significatives et que le meilleur résultat est associé à la présence de composés phénoliques [10, 213]. Ce résultat est principalement dû à la forte teneur en composés phénoliques des extraits de margines, qui représentent la principale classe chimique. Dans notre étude, la différence d'activité antioxydante est très probablement liée à la présence de gaiacol, de phénol et de 5-tertbutylpyrogallol qui ne sont présents que dans l'HE. En outre, l'alcool benzylique (4,9 %), l'éthanol benzylique (7 %) et le 4-éthylphénol (28,5 %) sont comparativement beaucoup plus présents dans l'HE que dans la FV. La présence de groupes hydroxyles, qui fonctionnent comme de bons donneurs d'hydrogène et génèrent des ions phénolates en tant qu'intermédiaires, a été liée aux propriétés antioxydantes des composés phénoliques, selon un certain nombre d'études antérieures. Le phénomène de résonance stabilise ces intermédiaires lorsque les électrons non appariés des positions méta du cycle aromatique sont délocalisés. En d'autres termes, la stabilité des radicaux phénoxyles produits après déshydrogénation et la capacité des composés phénoliques à donner de l'hydrogène déterminent leur action antioxydante.

### 2.3.3. Détermination de l'activité photoprotectrice de l'huile essentielle et de la fraction volatile

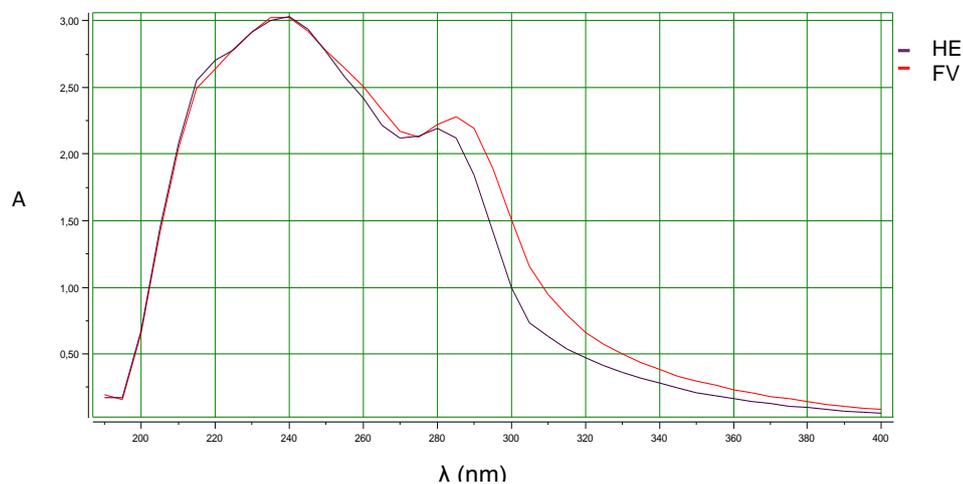
#### 2.3.3.1. Détermination du facteur de protection solaire

Des mesures *in vitro* de l'activité photoprotectrice de l'HE et de la FV de margine ont été effectuées par la mesure du FPS, considéré comme l'un des indicateurs les plus couramment utilisés pour classer les niveaux de protection solaire des produits contre les coups de soleil qui sont principalement causés par les rayons UV-B dangereux. Il a été signalé que, les valeurs FPS de 2-12, 12-30 30-50 et  $\geq 50$  sont considérées comme ayant respectivement une activité de protection solaire minimale, modérée, élevée et maximale [216]. La détermination des valeurs du FPS pour les deux huiles a été effectuée à l'aide de l'équation (2), par la méthode spectrophotométrique à une concentration de 2 mg/mL. Les valeurs de l'absorbance en fonction de longueurs d'onde sont extraites de leurs spectres UV (Figure 2.9) et sont mentionnées ainsi que celles du FPS dans le tableau 2.9.

**Tableau 2.9** : Valeurs des absorbances [290-320 nm] et FPS de l'HE et la FV

$\lambda$ (nm)	Abs (FV)	Abs (HE)
290	1,96	2,376
295	1,252	1,83
300	0,947	1,41
305	0,766	1,168
310	0,641	0,969
315	0,538	0,784
320	0,47	0,659
<b>FPS</b>	<b>8,28</b>	<b>12,32</b>

Le critère de référence pour évaluer la capacité d'un écran solaire à protéger les utilisateurs des rayons UV nocifs du soleil est la mesure quantitative du FPS, qui est le meilleur moyen d'évaluer l'efficacité d'un écran solaire. Bien que plusieurs écrans solaires synthétiques soient disponibles, leur capacité limitée à interférer avec des voies cancérogènes spécifiques et leur toxicité probable pour l'homme limitent leur utilisation dans les cosmétiques [217]. L'activité photoprotectrice de l'HE est modéré par contre de la FV de marge est minimale, ce qui est probablement lié à sa richesse en produits phénoliques.

**Figure 2.9** : Spectres UV de l'HE et la FV de marge à 2 mg/mL

Plusieurs études indiquent qu'en raison de la présence de grandes quantités de composés phénoliques, une augmentation de la valeur FPS se produira car ils présentent d'excellentes propriétés antioxydantes et photoprotectrices [218, 219]. Ces substances ont la capacité de prévenir les dommages à l'ADN en fonctionnant comme une cascade de signalisation sensible à l'oxydoréduction. Ils

peuvent contribuer à atténuer la peroxydation des lipides induite par les UV et la production de radicaux libres d'oxygène, deux processus liés à des conditions médicales telles que le photovieillissement et le cancer de la peau. En outre, la protection contre les rayons UV nécessite une activité antioxydante importante [220, 221].

### **CHAPITRE 3**

#### **EXTRACTION, FRACTIONNEMENT ET POTENTIALITES PHOTOPROTECTRICE, ANTIOXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS ET DES DIFFERENTES FRACTIONS DE MARGINES**

L'utilisation d'agents naturels pour protéger la peau des dommages, en particulier ceux causés par les produits chimiques synthétiques, suscite un intérêt croissant. En outre, l'utilisation d'extraits de sources naturelles a moins d'effets négatifs que les produits synthétiques. Par conséquent, de nombreuses études ont été menées sur la formulation d'écrans solaires à base d'extraits de plantes, qui possèdent un large éventail de propriétés pharmacologiques telles que des activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antibiotiques, anticancérigènes et photoprotectrices [222, 223]. En effet, l'inclusion de produits phytochimiques tels que les extraits, les composés phénoliques et les flavonoïdes dans les formulations d'écrans solaires est désormais largement recommandée et a été démontrée avec succès [222, 224].

Suivant cette tendance, la plus récente est l'utilisation d'extraits de plantes ou d'ingrédients naturels ayant une activité antioxydante dans les écrans solaires pour augmenter la protection contre les radicaux libres produits. Ils ont également la capacité d'absorber les rayons UV pour contribuer à l'effet filtrant de l'écran solaire, en particulier grâce à la présence de fonctions hydroxyle dans les polyphénols, qui confèrent des activités antioxydantes [18, 225, 226].

Les formulations de soins de la peau contenant non seulement des huiles végétales mais aussi des composants antioxydants d'origine végétale gagnent en popularité et certains auteurs se sont intéressés à l'utilisation potentielle de sous-produits agricoles comme sources d'ingrédients cosmétiques [227].

Dans le cadre de nos recherches sur les agents de protection solaire, la margine peut être une source importante de matériaux cosmétiques. Le but de cette étude

est de séparer les fractions de l'extrait ayant des propriétés photoprotectrices qui peuvent être exploitées dans la formulation de produits cosmétiques et pharmaceutiques. Les teneurs totales en phénols et en flavonoïdes ont été évaluées et les activités antimicrobiennes, antioxydantes et photoprotectrices *in vitro* des deux extraits d'acétate d'éthyle obtenu à partir de deux margines différentes, ont été déterminées. Les fractions de l'extrait d'acétate d'éthyle obtenues par chromatographie ouverte sur une colonne de gel de silice ont été soumises aux mêmes analyses et le FPS des combinaisons de fractions a également été évalué.

## 1. Méthodologie expérimentale

### 1.1. Étude chimique des extraits phénoliques des margines

Deux margines ont fait l'objet de l'extraction liquide-liquide et de fractionnement sur colonne, la première est celle utilisée dans les manipulations expérimentales du chapitre 2 et qui est issue d'une huilerie moderne à trois phases (M1) qui traite notamment les olives de la plaine de la Mitidja. Le deuxième échantillon de marge provient d'une huilerie traditionnelle de Yakouren, Tizi-Ouzou (M2) collecté en janvier 2023 qui traite des olives provenant des montagnes du Djurdjura.

#### 1.1.1. Prétraitement des margines

Chaque marge a été filtrée, centrifugée puis acidifiée à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (0.5N) jusqu'à pH=2. La fraction lipidique a été éliminée ensuite, par une extraction liquide-liquide à l'hexane.

#### 1.1.2. Extraction à l'acétate d'éthyle

L'opération d'extraction décrite dans le chapitre 2 (& 2.3.2) est répétée cinq fois dans le but de récupérer de manière exhaustive les composés phénoliques (Figure 2.1). La phase organique riche en composés phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C pour éliminer l'acétate d'éthyle. Le résidu sec a été dissous dans le méthanol et cette solution a été utilisée pour la caractérisation et le fractionnement des composés phénoliques.

### 1.1.3. Fractionnement des extraits de margines

Dans le but de réduire la complexité d'un extrait brut et d'identifier les molécules actives, on a fait appel au fractionnement sur colonne qui va permettre de séparer leurs molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

(5g) de chaque extrait phénolique Ex<sub>1</sub> et Ex<sub>2</sub> a fait l'objet d'un fractionnement sur colonne. La chromatographie sur colonne été réalisée à l'aide d'une colonne de verre (hauteur = 60 cm, diamètre = 5cm). La phase stationnaire utilisée pour la séparation sur colonne de chromatographie est le gel de silice 60 (60-100 mesh). Le chloroforme constitue le solvant initial utilisé dans la séparation. La première élution a été effectuée avec du chloroforme pur (100 %). Un mode gradient a été appliqué en ajoutant successivement 5 % du méthanol jusqu'à la dernière élution à 50 % méthanol. 36 fractions de 50 mL ont été collectées séparément et chaque fraction a été soumise à l'évaporation du solvant à sec.

### 1.1.4. Analyse par chromatographie sur couche mince

Une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) a été ensuite réalisée en phase normale sur une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice Si 60 F254 (Réf. : Merck 1.05554). L'élution a été effectuée avec le système binaire Chloroforme/Méthanol (v/v : 9/1) pour les fractions [1-18] et (v/v : 1/9) pour les fractions [19-36], après optimisation du système de solvant. La révélation est d'abord réalisée avec une lampe UV (254 nm), après développement dans la cuve en verre.

### 1.1.5. Caractérisation par ATR-IRTF

Une analyse ATR-IRTF a été effectuée à l'extrait Ex<sub>1</sub> et ses fractions dans les mêmes conditions opératoires du chapitre 2 (& 2.4.1).

### 1.1.6. Analyses chimiques de l'extrait et des fractions de margine

#### 1.1.6.1. Analyses par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP/DAD-UV)

L'analyse des composés phénoliques dans l'extrait Ex<sub>2</sub> de margine (M2) et ses fractions a été effectuée avec le système d'échantillonnage automatique de la

série 1100 d'Agilent, GL Sciences Inc. (Waldbronn, Allemagne) équipé d'un contrôleur de système, d'un détecteur DAD-UV (G 1315B) et d'une pompe CL quaternaire (G1311A). La séparation a été effectuée avec une colonne Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm, 4,6 mm de diamètre intérieur et 5 µm de taille de particules), la température de la colonne étant réglée à 25 °C. La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'un système de solvant binaire, Eau (A)/Acétonitrile (B), (v/v : 95/5). Les analyses ont été effectuées à débit de 1 mL/min. Le programme d'élution en mode gradient a été appliqué comme suit : L'éluant de départ est constitué de 95 % A entre 0 et 10 min ; il passe à 85 % A entre 10 et 17 min, puis à 80 % A entre 17 et 22 min, à 70 % A entre 22 et 32 min et enfin à 100 % A entre 32 et 53 min.

Le solvant d'injection est de composition identique à celui du solvant initial de l'analyse et le volume d'injection fixé à 20 µL.

#### 1.1.6.2. Chromatographie liquide à Ultra Performance (CLUP-ISE-SM/SM)

L'analyse a été réalisée sur un UPLC-ISE-MS/MS Shimadzu 8040 ultrahaute sensibilité doté de la technologie UFMS et ayant une pompe binaire Nexera XR LC-20AD. Les conditions d'injection en électrospray sont les suivantes : Pression de dissociation induite par collision CID (Collision-induced dissociation) du gaz : 230KPs, le potentiel de conversion dynode : -6.00 Kv, Température DL : 250°C, flux du gaz de nébulisation : 3.00 L/min, température du block : 400 °C, flux du gaz de séchage : 15.00 L/min.

La phase mobile est constitué de : Solvant A : Eau/Acide formique à 0,1 %, Solvant B : Méthanol/Acide formique à 0.1 %. Débit de la phase mobile : 0.4 mL/min. Volume d'injection : 5 µL. Colonne Restack Ultra, C18 3µm 150 x4.6 mm. Le gradient de la phase mobile est le suivant : 0.1 à 15 min 95 % (A), 15 à 20 min A (5 %), 20 à 30 min A (95 %).

### 1.1.6.3. Estimation du contenu en composés phénoliques et flavonoïdes totaux des extraits et des fractions de margine

#### 1.1.6.3.1. Estimation du contenu en composés phénoliques totaux des extraits et des fractions de margine

Une estimation de la teneur en composés phénoliques totaux des extraits bruts des margine et de leurs fractions a été obtenue par utilisation de réactif Folin-Ciocalteu. Ce dernier est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène, qui montrent une absorption maximale aux environs de 760 nm permettant de déterminer la concentration des produits phénoliques en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues.

La teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait à l'acétate d'éthyle Ex<sub>1</sub> et de ses fractions (M1) a été déterminée via la méthode adaptée par Song et al. [228] avec quelques modifications. Un volume de 20 µL de la solution méthanolique d'extrait et des fractions (1 mg/mL) a été mélangé avec 100 µL de réactif de Folin-Ciocalteu et 1,85 mL d'eau distillée. Après 5 minutes, 300 µL de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 20 % ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à température ambiante dans l'obscurité pendant 2 h. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 760 nm avec un spectrophotomètre UV.

L'extrait phénolique Ex<sub>2</sub> et ses fractions (M2) ont été pesés et dissous dans de l'éthanol jusqu'à une concentration de 2 mg/mL. 10 µL de l'extrait Ex<sub>2</sub> et ses fractions ont été mélangés avec 30 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué x 2) et 150 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,5 %) dans des puits de microplaques et incubés à 40 °C pendant 30 min. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 765 nm sur un lecteur de microplaques ELISA (Versamax tunable microplate reader, USA) [229]. L'étalon utilisé pour la courbe d'étalonnage est l'acide gallique et le tracé consiste à la réalisation de six points expérimentaux.

### 1.1.6.3.2. Estimation du contenu en flavonoïdes totaux des extraits et des fractions de margine

La teneur totale en flavonoïdes de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle Ex<sub>1</sub> de margine (M1) a été réalisée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) [230] avec de légères modifications. 0,75 mL de méthanol ont été mélangés avec 0,25 mL de solution de l'extrait Ex<sub>1</sub> de la margine (M1) et ses fractions (1 mg/mL), puis un volume de 0,25 mL de solution de 10 % AlCl<sub>3</sub> et 1,4 mL d'eau distillée ont été ajoutés. Après homogénéisation et incubation pendant 30 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm avec un spectrophotomètre UV/VIS à double faisceau (UV-2601).

Pour la margine (M2), 25 µL d'Ex<sub>2</sub> et ses fractions ont été mélangés avec 75 µL de l'éthanol (2 mg/mL), 5 µL de AlCl<sub>3</sub> (10 %), 5 µL d'acétate de sodium (1 M) et 100 µL d'eau distillée. L'absorbance des mélanges a été mesurée à une longueur d'onde de 415 nm après 30 min d'incubation à température ambiante [229].

La quercétine a été utilisée comme étalon pour la courbe d'étalonnage et les résultats ont été exprimés en équivalents de quercétine (µg QE/mg).

Le taux des composés phénoliques équivalent à l'acide gallique et de flavonoïdes équivalent à la quercétine des extraits brut Ex<sub>1</sub> et Ex<sub>2</sub> de margine M1 et M2 et de leurs fractions est déterminée selon l'équation (3) ci-dessous.

$$T = C \times V / M \quad (3)$$

T : Taux de composés phénoliques ou flavonoïdes totaux (TPT ou TFT)

C : Concentration d'échantillon équivalente à l'acide gallique ou à la quercétine

V : Volume total (mL)

M : Poids sec d'échantillon (M1 en mg) et (M2 en g).

## 1.2. Etude de l'activité biologique des extraits et des fractions de margines

### 1.2.1. Activité antimicrobienne des extraits et des fractions séparées

Conformément aux directives du CLSI, les valeurs de CMI de l'extrait Ex<sub>1</sub> de margine (M1), de ses fractions séparées et des standards ont été déterminées pour toutes les souches microbiennes indiquées dans le tableau 2.1, en suivant la méthodologie et les conditions décrites dans le chapitre 2 (& 2.5). La série de dilutions doubles de l'extrait Ex<sub>1</sub> et de ses fractions a été effectuée à des concentrations allant de 0,39 à 50 mg/mL pour les fractions Fr (3-5), néanmoins, les gammes de concentration ont été modifiées de 0,63 à 80 mg/mL et de 0,78 à 100 mg/mL pour Fr<sub>6</sub> et Fr<sub>7</sub>, respectivement.

La méthode de diffusion en milieu solide a été utilisée pour déterminer la sensibilité de nouvelles souches à savoir, les bactéries : *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis* - ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Enterococcus hirae* (*E. hirae* - ATCC 10541) et les levures : *Salmonella abony* (*S. abony* - NCTC 6017), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) à l'extrait phénolique Ex<sub>2</sub> à l'état brut.

La procédure générale pour déterminer le diamètre d'inhibition comprend les étapes suivantes :

#### 1.2.1.1. Préparation du milieu de culture

Les milieux de cultures solides (LB pour les bactéries et ISP2 pour les levures) ont été fondu dans un bain marie réglé à 95°C, ensuite coulé dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. A la fin, ils sont laissés refroidir et solidifier.

#### 1.2.1.2. Préparation de la préculture

10 mL de bouillon nutritif ont été introduits dans chaque tube à essai puis stérilisé pendant 20 min à 120 °C à l'autoclave. Les souches de chaque bouillon de culture de 24h et 48h pour les bactéries et levures, respectivement, sont émulsifiées dans 10 mL de milieu physiologique NaCl 0,9 %. L'inoculum ainsi obtenu présente une opacité égale à celle de l'étalon Mc Farland (0,5).

#### 1.2.1.3. Ensemencement

Après solidification des milieux de cultures, les suspensions microbiennes ont été uniformémentensemencées et essorées sur la paroi du tube à l'aide d'un écouvillon stérile. Ensuite, un frottement de l'écouvillon sur la totalité de la surface du milieu solide, sèche, de haut en bas, a été appliqué en stries. On répète l'opération 2 à 3 fois, en tournant la boîte de 60°C à chaque fois afin d'assurer une bonne répartition de l'inoculum. En fin, on Laisse sécher les boîtes de Pétri pendant quelques minutes à température ambiante.

#### 1.2.1.4. Déposition des disques et incubation

La technique consiste à utiliser des disques de papier buvard de 9 mm de diamètre qui ont été imprégnés de 60 µL de l'Ex<sub>2</sub> et ont été déposés à la surface du milieu solide uniformémentensemencée avec les suspensions ciblés. Par la suite, les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et pendant 48 h pour les levures.

#### 1.2.2. Potentialités antioxydantes des extraits de margines et de leurs fractions

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait phénolique Ex<sub>1</sub> et de ses fractions de colonne a été déterminée par la même méthode de DPPH• et dans les mêmes conditions opératoires décrite dans le chapitre 2 (& 2.6).

L'extrait Ex<sub>2</sub> et ses fractions ont été testés pour leur activité antioxydante par les méthodes de DPPH•, capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC), potentialité antioxydante réductrice du Fer (FRAP) et la méthode de l'oxyde nitrique (NO•), à l'aide d'un lecteur de microplaque ELISA (Versamax tunable microplate reader, USA) [229].

Pour la détermination de l'activité de piégeage du DPPH•, 10 µL d'Ex<sub>2</sub> et ses fractions dissous dans l'éthanol ont été mélangés à 90 µL d'une solution de DPPH• d'une concentration de 0,138 mg/mL. La mesure des absorbances a été effectuée à 515 nm.

Pour l'activité de piégeage du radical  $\text{NO}\cdot$ , 60  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon et de référence (acide ascorbique) ont été mélangées à 60  $\mu\text{L}$  (10 mM) de nitroprussiate de sodium et laissées à incuber pendant 150 minutes à température ambiante. Après incubation, 120  $\mu\text{L}$  de réactif de Griess (1 % de sulfanilamide dans 5 % de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  et 0,1 % de chlorhydrate de naphtyléthylènediamine) a été ajouté au puits et l'absorbance du mélange a été mesurée à 577 nm.

Selon la méthode de FRAP basée sur la réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), l'extrait de margine  $\text{Ex}_2$ , ses fractions et la référence (quercétine) dissous dans de l'éthanol (10  $\mu\text{L}$ ) ont été ajoutés dans 25  $\mu\text{L}$  du tampon phosphate (pH 6,6) et 25  $\mu\text{L}$  de ferricyanure de potassium [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] (1 %). Après pré-incubation de 20 min à 50 °C, 25  $\mu\text{L}$  d'acide trichloracétique (10 %), 85  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et 17  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  à 0,1 % ont été ajoutés, respectivement. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 700 nm.

Pour déterminer la réduction du complexe cuivre-néocuproïne [ $\text{Cu}(\text{II})\text{-Nc}$ ] en  $\text{Cu}(\text{I})\text{-Nc}$  (CUPRAC) par  $\text{Ex}_2$  et ses fractions en comparant avec l'acide gallique, 25  $\mu\text{L}$  de 10 mM de chlorure de cuivre (II), 25  $\mu\text{L}$  de néocuproïne (7,5 mM), 25  $\mu\text{L}$  d'acétate d'ammonium 1 M (pH 7), 25  $\mu\text{L}$  d'échantillon et 100  $\mu\text{L}$  d'eau distillée ont été mélangés dans un puits de microplaque de 96 puits. La microplaque a ensuite été incubée pendant 30 minutes. À la fin, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 450 nm.

Les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats ont été calculés selon l'équation (1) de l'essai de piégeage du radical DPPH et sont exprimés en valeurs moyennes avec écart-type.

### 1.2.3. Etude de l'activité photoprotectrice

#### 1.2.3.1. Activité photoprotectrice de l'extrait de margine et ses fractions

L'activité photoprotectrice de l'extrait  $\text{Ex}_1$  de margine (M1) et ses fractions a été établie *in vitro* en calculant le FPS. L'extrait brut et les fractions de colonne ont été dilués dans du méthanol absolu à différentes concentrations.

### 1.2.3.2. Activité photoprotectrice des fractions combinées

La concentration des fractions à combiner a été choisie sur la base d'un FPS égal à 20. Cette valeur est très commode et descriptive d'un système doté d'une activité photoprotectrice acceptable [216].

## 2. Résultats et discussions

### 2.2. Etude chimique des extraits phénoliques et leurs fractions

#### 2.2.1. Rendement des extraits phénoliques

Le rendement des extraits phénoliques Ex<sub>1</sub> et Ex<sub>2</sub> des margines (M1) et (M2) sont de 0,34 % et 0,43 %, respectivement. Ces valeurs sont situées dans l'intervalle (3-6 g/L) obtenue dans des recherches antérieures [94].

#### 2.2.2. Fractions séparées sur colonne ouverte de silice

Les deux extraits phénoliques des margines M1, M2 et toutes leurs fractions de colonne (1-36) ont été analysés par CCM et les fractions similaires de chaque extrait ont été regroupées en se basant sur le pourcentage d'élution et leur profil CCM (Appendice B 1).

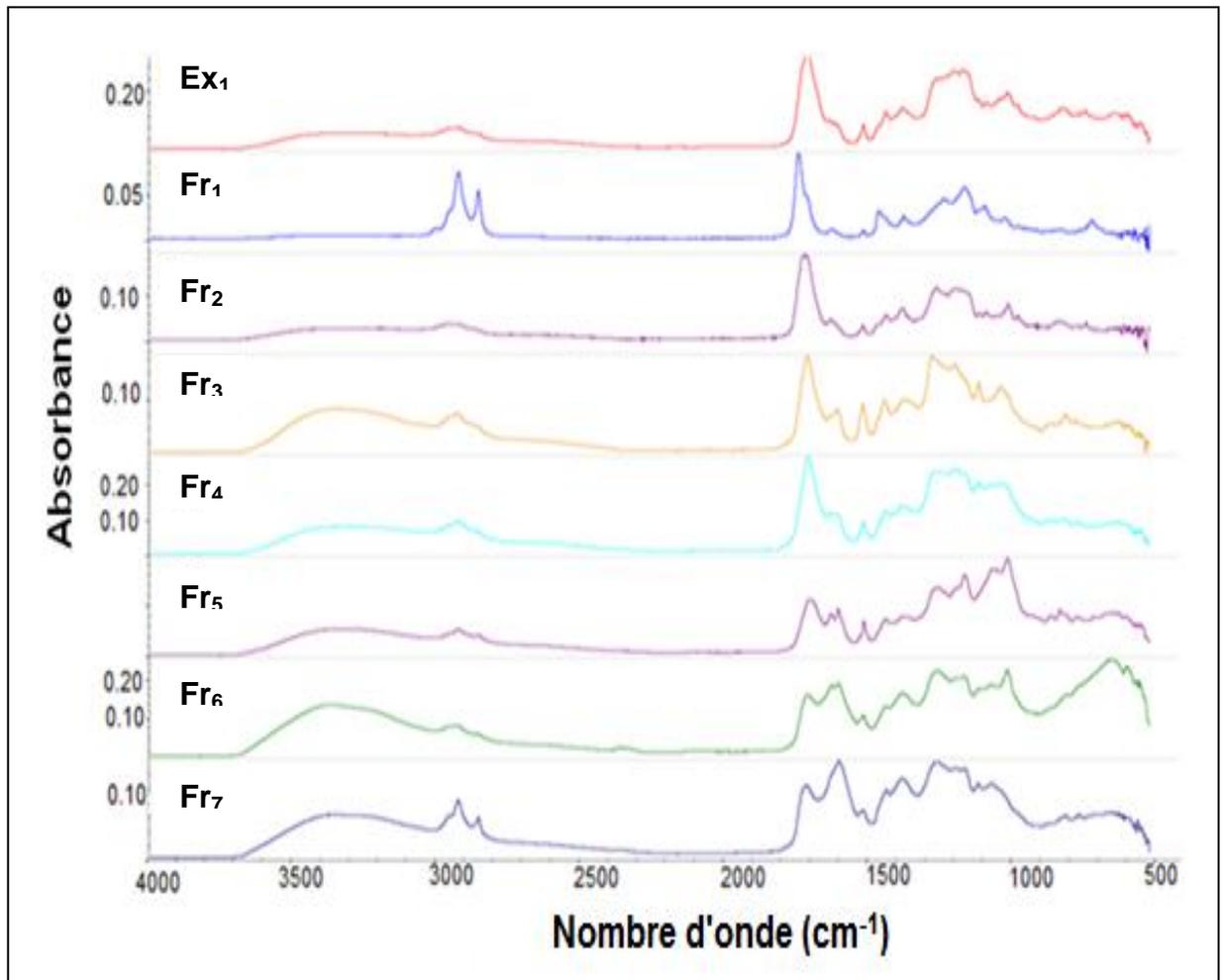
**Tableau 3.1 : Rendement de fractions regroupées**

Lots	Fractions	Chloroforme/ Méthanol (%)	R (M1) (%)	R (M2) (%)
1,2	Fr <sub>1</sub>	100	30,00	31
3-11	Fr <sub>2</sub>	95/5	44,00	39,90
12-16	Fr <sub>3</sub>	90/10	2,90	3,45
17-26	Fr <sub>4</sub>	85/15	2,50	2,42
27-31	Fr <sub>5</sub>	80/20	1,26	1,30
32-33	Fr <sub>6</sub>	70/30	0,50	0,47
34-36	Fr <sub>7</sub>	50/50	1,80	1,52

Le regroupement des fractions des deux extraits phénoliques des margines, a permis d'obtenir 7 fractions pour chaque extrait, elles ont été séparées avec des teneurs en méthanol correspondant à 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 % et 50 % (Tableau 3.1).

### 2.2.3. Analyse de l'extrait et des fractions de margine par ATR-IRTF

Les spectres ATR-IRTF de l'extrait Ex<sub>1</sub> de margine (M1) et toutes ses fractions obtenues sont indiqués dans la figure 3.1.



**Figure 3.1** : Spectres ATR-IRTF de l'extrait de margine (M1) et de ses fractions

L'interprétation des résultats des spectres ATR-IRTF au-dessus, selon les groupements fonctionnels et les intensités des pics en fonction de nombre d'onde ( $\nu$ ) sont résumés dans le tableau 3.2.

**Tableau 3.2** : Comparaison de groupements fonctionnels dans les spectres ATR-IRTF entre l'extrait de margine Ex<sub>1</sub> et ses fractions.

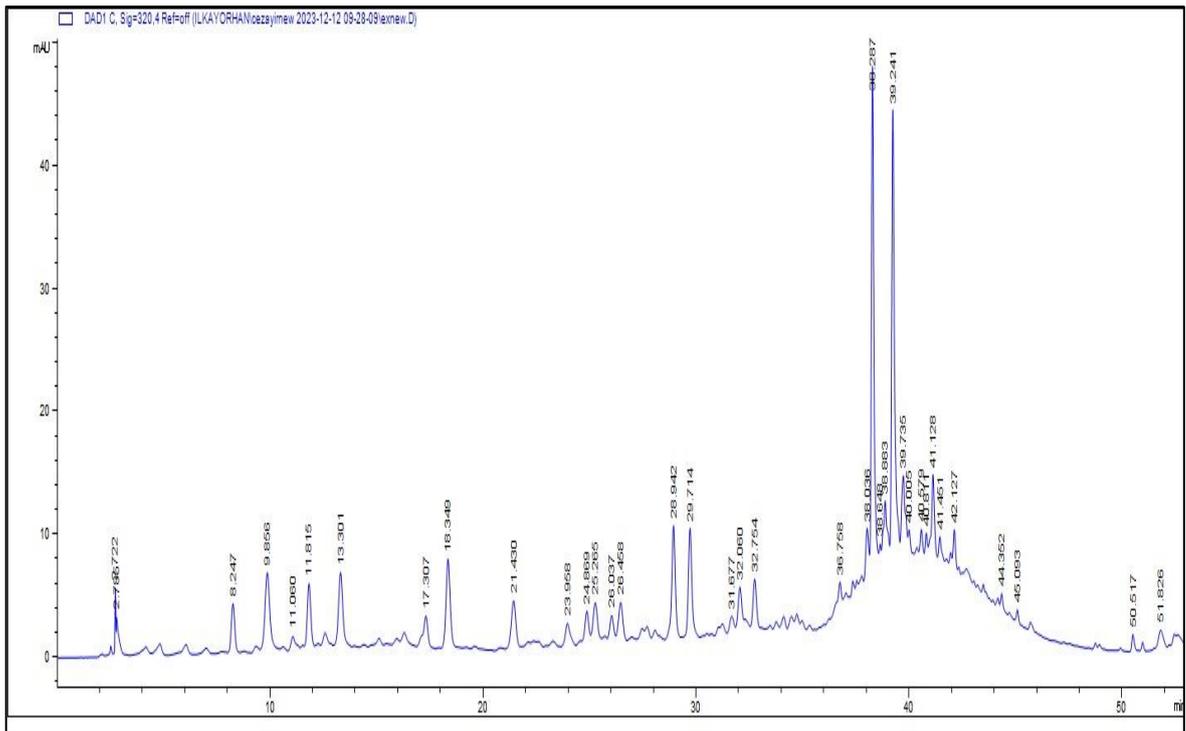
$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Intensités								Groupements fonctionnels
	Ex <sub>1</sub>	Fr <sub>1</sub>	Fr <sub>2</sub>	Fr <sub>3</sub>	Fr <sub>4</sub>	Fr <sub>5</sub>	Fr <sub>6</sub>	Fr <sub>7</sub>	
3500-3250	++	-	+	+++	++	++	+++	+++	OH (Alcool) OH (Acide)
2949	++	+++	+	++	++	++	++	+++	CH <sub>3</sub>
2853	+	+++	-	-	-	+	+	++	CH <sub>2</sub>
1713	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	C=O (Cétone)
1607	++	+	+	++	++	++	+++	+++	C=C
1519	++	+	+	++	++	++	++	++	C=C (Ar)
1444-1436	++	-	+	++	++	++	+	++	C-O (Acide)
1382	++	+	++	++	++	++	+++	+++	Ar-OH
1280	+++		++	+++	+++	++	+++	+++	C-O (Ester)
1197	+++	-	++	+++	+++	++	+++	+++	C-O-C (Cyclique)
1163	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	CH <sub>2</sub>
1115	++	+	+	+++	+	-	++	++	C-OH (Secondaire)
1075				-	++	+++	+	++	C-OH (Primaire)
1015	++	+	+	+	+	+++	+++	+	Alk-O-Ar
867-743	+	+	+	++	+	+	-	+	Cycle aromatique di et trisubstitué

+++ : Forte ; ++ : Moyenne ; + : Faible

#### 2.2.4. Analyses chimiques par CLHP/DAD-UV et CLUP-ESI-SM/SM

##### 2.2.4.1. Détermination de la composition chimique de l'extrait Ex<sub>2</sub> de margine (M2) et ses fractions

L'analyse CLHP/DAD-UV de l'extrait Ex<sub>2</sub> de margine (M2) et de ses fraction [2-7] a permis d'identifier quelques composés phénoliques comme mentionné dans le tableau 3.3, en se référant aux chromatogrammes CLHP de l'extrait indiqués dans la figure 3.2 et des fractions données en appendice A 2.



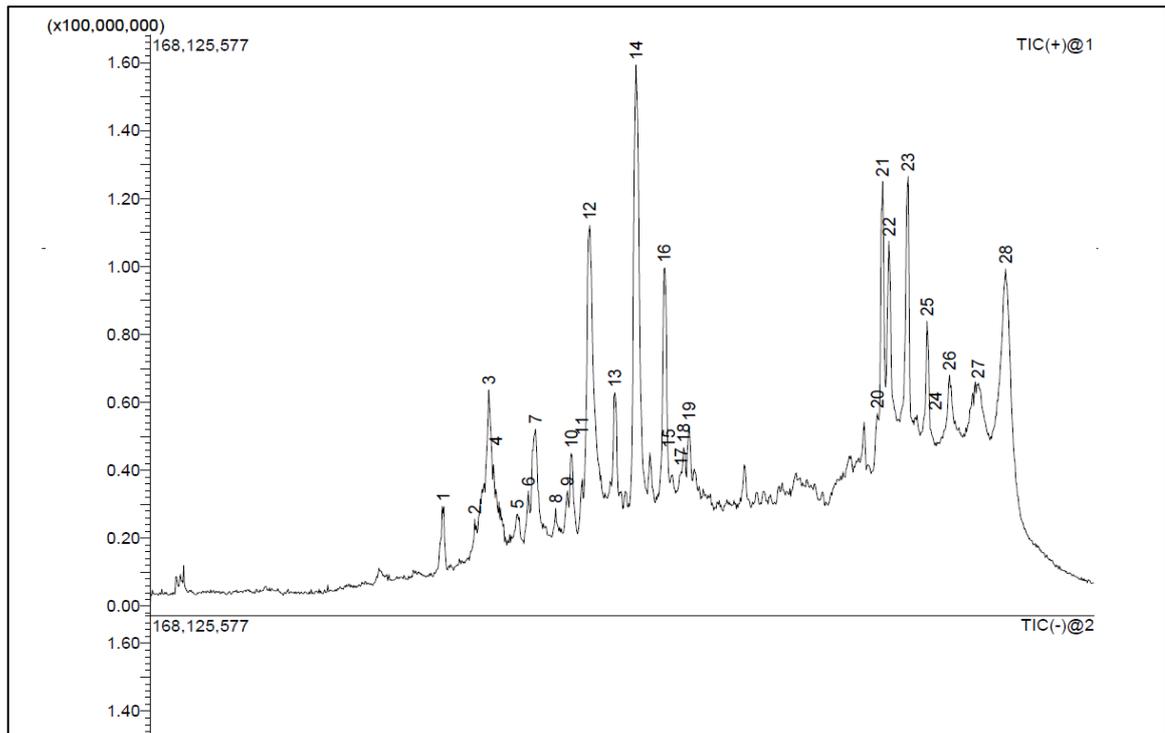
**Figure 3.2 :** Profil chromatographique CLHP de l'extrait de margine Ex<sub>2</sub>

**Tableau 3.3 :** Composés phénoliques identifiés dans l'extrait de margine Ex<sub>2</sub> et ses fractions par CLHP/DAD-UV

Composés identifiés	Tr (min)						
	Ex <sub>2</sub> (M2)	Fr' <sub>2</sub>	Fr' <sub>3</sub>	Fr' <sub>4</sub>	Fr' <sub>5</sub>	Fr' <sub>6</sub>	Fr' <sub>7</sub>
Acide gallique	-	-	-	-	5,719	5,749	
Hydroxytyrosol	9,315	9,317	-	-	9,305	9,297	9,314
Tyrosol	13,379	15,379	13,310	13,397	-	-	-
Acide vanillique	17,07	17,091	-	-	-	-	-
Oleuropéine	-	-	36,492	36,519	-	-	-

#### 2.2.4.2. Analyse de l'extrait phénolique Ex<sub>2</sub> de margine (M2) par CLUP-ESI-SM/SM

Le chromatogramme d'analyse de l'Ex<sub>2</sub> obtenu par analyse CLUP est donné par la figure 3.3.



**Figure 3.3 :** Profil chromatographique CLUP de l'extrait de margine Ex<sub>2</sub>

L'identification a été effectuée en se basant sur l'injection d'étalons et de la base de données de l'appareil. Les principaux composés identifiés de manière assez fiables, sont regroupés dans le tableau 3.4.

**Tableau 3.4 :** Composés identifiés dans l'extrait de margine Ex<sub>2</sub> par CLUP-ESI/SM/SM

N°	Tr (min)	Nom	Formule brute	Masse molaire	Intervalle de masse	Charge ESI (+/-)
1	6.463	Acide salicylique	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.12	137.10-93.15	(-)
2	8.190	Acide vanillique	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168.1	167.15-152.15	---
3	8.915	Acide cafféique	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180.16	179.10-135.15	(-)
4	9.025	Vanilline	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152.15	153.10 - 65.15	(+)
5	9.473	Acide 2-anisique	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152.15	153.05 - 135.050	(+)
6	9.658	Acide cis-p.coumarique	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164.16	163.15-119.15	(-)

7	10.096	Acide férulique	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.18	194.90 - 177.150	(+)
8	11.737	Catéchine	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.27	291.10- 123.05	(+)
9	17.618	Acide oléanolique	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	456.7	457.20- 425.20	(+)
10	17.956	Esculine	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	358.3	359.10- 341.150	---
11	19.459	Rutine	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610.5	611.20 - 73.20	(+)

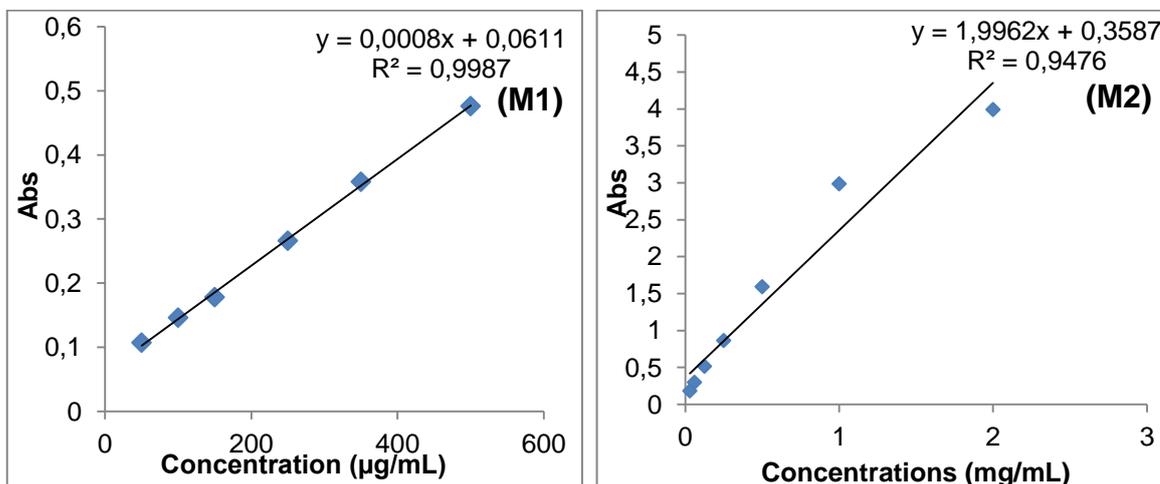
L'analyse CLUP-ESI-SM/SM de l'Ex<sub>2</sub> a été utilisée pour cribler 28 composés. Seuls 11 composés ont été identifiés, dont 7 sont des acides phénoliques (1-7) et 2 sont des flavonoïdes, 8 et 11 des sous classes de flavanols et flavonols, respectivement. On trouve également l'acide oléanolique (9) et l'esculine (10) qui appartiennent à la classe des triterpènes et des coumarines, respectivement. En outre, l'analyse CLHP/DAD-UV a été réalisé pour détecter 4 autres composés, à savoir, l'acide gallique, le tyrosol, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine.

Plusieurs recherches ont démontré la prédominance des acides phénoliques (férulique, cafféique, coumarique, vanillique, salicylique, gallique, catéchique, quinique et autres), des alcools phénoliques (tyrosol, hydroxytyrosol), des sécoiridoïdes (oleuropéine, ligustroside..) et des flavonoïdes (rutine, apigénine, quercétine, lutéoline et autres) [8, 12]. L'acide 2-anisique, la catéchine et l'esculine sont détectés pour la première fois dans l'extrait à l'acétate d'éthyle de margine.

#### 2.2.5. Détermination du contenu total en phénols et flavonoïdes des fractions

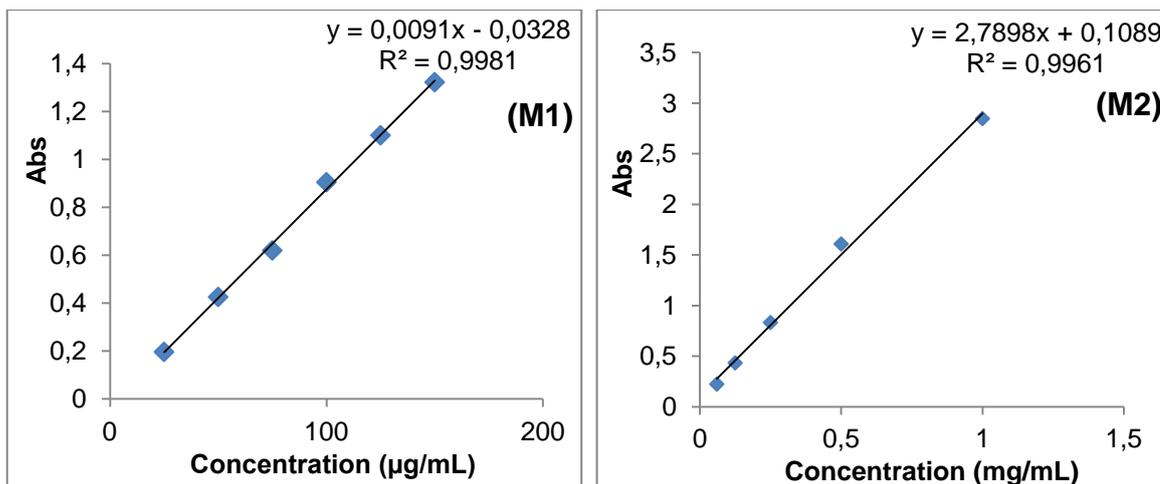
Les résultats du dosage quantitatif des produits phénoliques par le test de Folin-Ciocalteu ont été déterminés après l'établissement d'une droite d'étalonnage en utilisant une gamme allant de 50 à 500 µg.mL<sup>-1</sup> d'acide gallique dissous dans du méthanol utilisé comme étalon de l'Ex<sub>1</sub> et ses fractions (M1) et de 0,03 à 2 mg.mL<sup>-1</sup> d'acide gallique dissous dans de l'éthanol utilisé comme étalon de l'Ex<sub>2</sub> et ses fractions (M2).

La concentration d'échantillon équivalente à l'acide gallique est calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe du standard (Figure 3.4), par extrapolation de la valeur d'absorbance de la solution d'extrait ou des fractions ayant réagi avec le réactif de Folin-Ciocalteu.



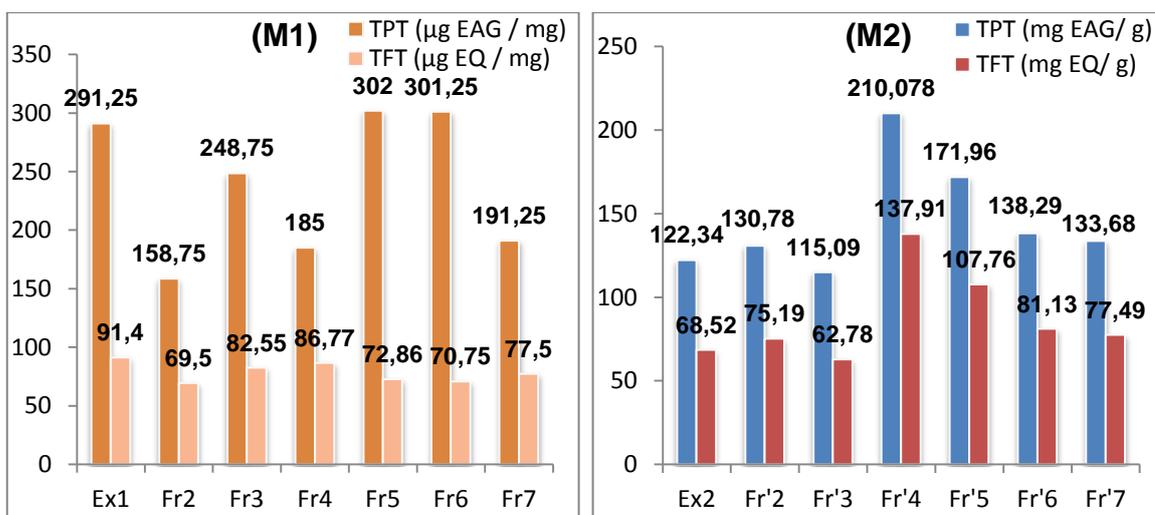
**Figure 3.4 :** Courbes d'étalonnage de l'acide gallique

La teneur totale en flavonoïdes des extraits de margine (M1) et (M2) a été déterminée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium, calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la quercétine en utilisant une gamme allant de 25 à 150  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  de quercétine dissoute dans le méthanol utilisé comme étalon pour Ex<sub>1</sub> et ses fractions (M1) et de 0,06 à 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  de quercétine dissoute dans l'éthanol utilisé comme étalon pour Ex<sub>2</sub> et ses fractions (M2) (Figure 3.5).



**Figure 3.5 :** Courbes d'étalonnage de la quercétine

Les résultats de l'analyse colorimétrique et la comparaison du contenu total en phénols et flavonoïdes des deux extraits phénoliques  $\text{Ex}_1$ ,  $\text{Ex}_2$  et leurs fractions est donné par la figure 3.6.



**Figure 3.6 :** Comparaison des valeurs de TPT et TFT des extraits de margines et de leurs fractions

Les résultats obtenus (Figure 3.6) semblent être très cohérents, confirmant la richesse de la margine en composés phénoliques et en flavonoïdes qui constituent la principale classe de phénols dans le mélange de composés phénoliques de l'extrait total.

La teneur en composés phénoliques a été largement quantifiée dans les margines par de nombreuses études, comme pour les extraits méthanoliques et d'acétate

d'éthyle qui ont montré des valeurs TPT de 950 et 902,7  $\mu\text{g}$  EAG / mg d'extrait et des valeurs TFT de 80,6 et 75,8  $\mu\text{g}$  EQ / mg d'extrait, respectivement [231, 232]. Ainsi, les fractions extraites avec un pourcentage élevé de méthanol sont les plus intéressantes en terme d'abondance en phénols et en flavonoïdes. Il a été démontré par plusieurs auteurs que les alcools (méthanol et éthanol) sont des solvants appropriés pour l'extraction et la séparation des composés phénoliques et flavonoïdes en raison de leur meilleure solubilité, en particulier dans le méthanol [223]. En général, les polyphénols sont mieux extraits par les solvants organiques polaires et moyennement polaire que par les solvants non polaires [233].

### 2.3. Évaluation des activités biologiques

#### 2.3.1. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits de margines et leurs fractions

Le test de l'activité antimicrobienne a été réalisé pour déterminer les CMI, exprimées en mg/mL des échantillons et en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour les étalons (Tableau 3.5), vis-à-vis les souches indiquées dans le tableau 2.1.

**Tableau 3.5 :** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'Ex<sub>1</sub> et ses fractions

Microorganismes	CMI (mg/mL)								CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
	Ex <sub>1</sub>	Fr <sub>1</sub>	Fr <sub>2</sub>	Fr <sub>3</sub>	Fr <sub>4</sub>	Fr <sub>5</sub>	Fr <sub>6</sub>	Fr <sub>7</sub>	Kan	Chl
<i>B. subtilis</i>	1,56	12,5	6,25	6,25	3,13	12,5	10	25	62,5	3,90
<i>B. cereus</i>	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	12,5	10	25	7,81	1,95
<i>S. aureus</i>	3,13	6,25	3,13	6,25	6,25	12,5	10	25	15,6	15,6
<i>M. luteus</i>	--	12,5	3,13	3,13	6,25	12,5	10	25	15,6	7,81
<i>L. monocytogenes</i>	3,13	12,5	6,25	6,25	6,25	12,5	10	25	15,6	7,81
<i>E. cloacae</i>	3,13	6,25	6,25	6,25	6,25	12,5	10	25	7,81	3,90
<i>E. faecium</i>	--	12,5	6,25	12,5	6,25	12,5	10	25	62,5	3,90
<i>A. tumefaciens</i>	1,56	12,5	6,25	3,13	6,25	12,5	10	25	1,95	15,6
<i>E. coli</i>	6,25	6,25	3,13	6,25	6,25	12,5	10	25	--	3,90
<i>P. aeruginosa</i>	6,25	12,5	3,13	6,25	6,25	12,5	10	25	1,95	3,90
<i>C. albicans</i>	3,13	25	25	12,5	6,25	12,5	10	25	3,90	3,90
<i>S. cerevisiae</i>	--	--	--	--	6,25	12,5	5	25	--	3,90

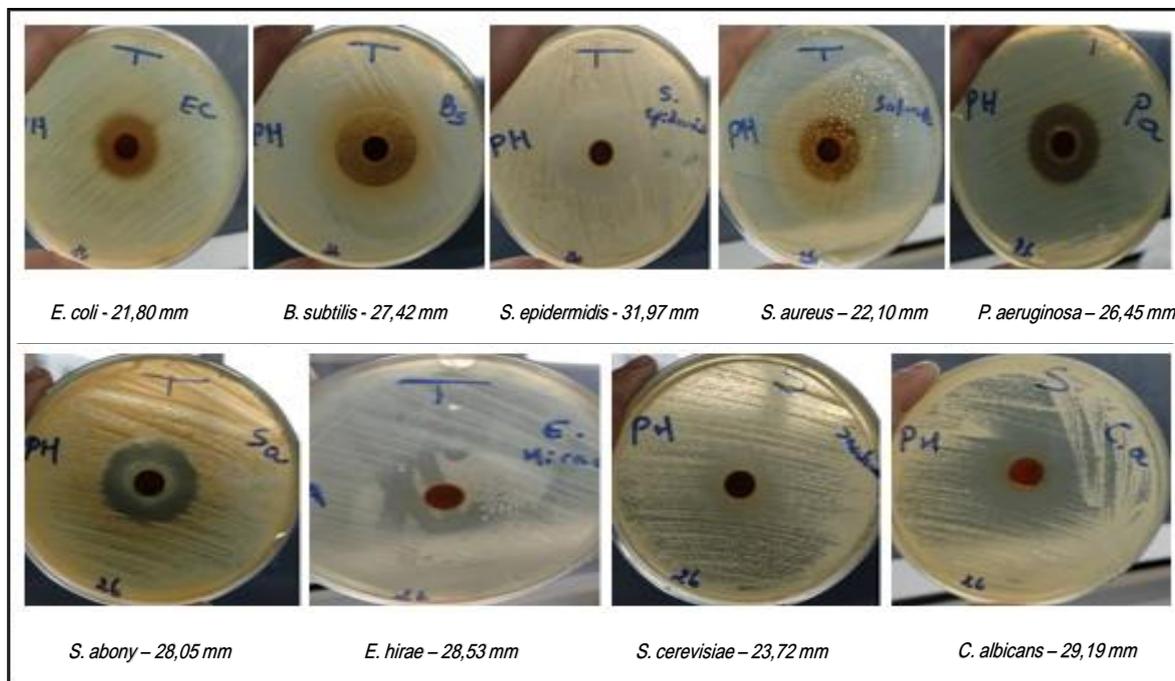
Kan : Kanamycine ; Chl : Chloramphénicol.

D'après les résultats obtenus dans le tableau 3.5, tous les échantillons ont inhibé les micro-organismes testés à des degrés divers. Cependant, les souches *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. cloacae*, *E. faecium*, *C. albicans* et *S. cerevisiae* ont été les micro-organismes les plus résistants. Inversement, *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus*, *A. tumefaciens*, *E. coli* et *P. aeruginosa* étaient les plus sensibles. L'extrait Ex<sub>1</sub> de margine (M1) a montré une forte activité antimicrobienne par rapport à toutes les fractions. L'examen des données du tableau 3.5 montre clairement que la plus forte activité contre *B. subtilis* et *A. tumefaciens* avec une CMI = 1,56 mg/mL, néanmoins, contre *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* à 3,13 mg/mL. D'autre part, la Fr<sub>2</sub> a été plus performante que l'extrait contre *E. coli* et *P. aeruginosa* ce qui signifie que ces deux souches étaient plus sensibles à la Fr<sub>2</sub> (3,13 mg/mL) qu'à l'Ex<sub>1</sub> (6,25 mg/mL). En outre, la Fr<sub>6</sub> a montré la meilleure activité antifongique vis-à-vis *S. cerevisiae* à une concentration d'inhibition de 5 mg/mL.

Il faut noter que les fractions de (M1), Fr<sub>2</sub>, Fr<sub>3</sub> et Fr<sub>4</sub> se sont révélées les meilleures fractions en termes d'activité antibactérienne, présentant de forts effets inhibiteurs contre toutes les souches. Fr<sub>2</sub> et Fr<sub>3</sub> sont les fractions les plus performantes contre *M. luteus* avec une CMI de 3,13 mg/mL, la Fr<sub>4</sub> pour *E. faecium*, la Fr<sub>2</sub> est également efficace contre *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, tandis que la Fr<sub>3</sub> est efficace contre *A. tumefaciens* à la même concentration de 3,13 mg/mL. La Fr<sub>4</sub> a montré la meilleure activité contre *B. subtilis* et toutes les souches bactériennes et fongiques avec des CMI de 3,13 mg/mL et de 6,25 mg/mL, respectivement.

Les fractions à forte teneur en composés phénoliques (Fr<sub>5</sub> et Fr<sub>6</sub>) ont montré une faible activité antimicrobienne. La Fr<sub>7</sub> éluée avec 50 % de méthanol a également montré l'activité la plus faible avec une CMI de 25 mg/mL. Le chloramphénicol et la kanamycine utilisés comme références ont montré un fort effet inhibiteur contre tous les micro-organismes testés par rapport aux échantillons et leurs valeurs de CMI étaient comprises entre 1,95 et 62,5 µg/mL.

Les diamètres d'inhibition microbienne de l'extrait phénolique de margine Ex<sub>2</sub> vis-à-vis les souches indiquées dans ce chapitre (& 2.2.1) ont été également mesurés et mentionné dans la figure 3.7.



**Figure 3.7 :** Diamètres d'inhibition de l'extrait de margine Ex<sub>2</sub>

Les résultats obtenus montrent que l'extrait Ex<sub>2</sub> de M2 a une activité inhibitrice significative contre la croissance microbienne de toutes les souches à différents degrés, confirmant le large spectre de l'activité antimicrobienne des margines. Ex<sub>2</sub> a produit de plus grandes zones d'inhibition contre la levure *C.albicans* (29,19 mm) et la bactérie *S. epidermidis* (31,97 mm).

L'action des extraits de margine et de leurs fractions sur les bactéries et les levures peut être due aux flavonoïdes, qui sont de bons inhibiteurs des enzymes présentes dans la membrane cytoplasmique des bactéries et qui catalysent l'ensemble des protéines de surface inhibant la libération des facteurs de virulence tels que l'épigallocatechine et la rutine [234]. En parallèle, un certain nombre de composés phénoliques présentent une forte activité antimicrobienne [235-237], en particulier l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique et l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol [11, 238], ainsi que le verbascoside [239], ont été associés à une variété d'activités antimicrobiennes. En

conclusion, les différences d'activité contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives peuvent être expliquées par des différences dans la composition de la paroi cellulaire et plusieurs autres considérations.

### 2.3.2. Etude de l'activité antioxydante

#### 2.3.2.1. Détermination de l'activité antioxydante des extraits des margines et leurs fractions par la méthode de DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH en termes de  $CI_{50}$  et de PI % des deux extraits phénoliques  $Ex_1$ ,  $Ex_2$  et de leurs fractions de colonne sont regroupés dans le tableau 3.6 et le tableau 3.7, respectivement.

**Tableau 3.6** : Variation des taux de piégeage du DPPH• en fonction des différentes concentrations de l' $Ex_1$  et ses fractions

C ( $\mu\text{g/mL}$ )	PI (M1) (%)						$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	1,953	3,906	7,8125	15,625	31,25	62,5	
$Ex_1$	20,37 $\pm$ 1,02	22,13 $\pm$ 1,52	26,02 $\pm$ 2,04	32,33 $\pm$ 1,68	46,9 $\pm$ 3,19	75,22 $\pm$ 2,06	34,69 $\pm$ 2,29
C	62,5	125	250	500	1000	2000	$CI_{50}$
$Fr_1$	19,37 $\pm$ 2,05	21,22 $\pm$ 2,36	27,42 $\pm$ 2,58	35,04 $\pm$ 1,86	53,61 $\pm$ 1,50	87,79 $\pm$ 1,03	918,5 $\pm$ 1,68
C	7,812	15,62	31,25	62,5	125	250	$CI_{50}$
$Fr_2$	24,07 $\pm$ 2,45	25,87 $\pm$ 1,08	29,3 $\pm$ 1,25	37,8 $\pm$ 1,30	51,89 $\pm$ 3,48	79,60 $\pm$ 1,93	119,33 $\pm$ 2,36
$Fr_3$	37,03 $\pm$ 0,86	38,55 $\pm$ 0,72	42,07 $\pm$ 1,32	46,84 $\pm$ 1,84	57,36 $\pm$ 2,60	79 $\pm$ 1,05	81,19 $\pm$ 1,46
$Fr_4$	34,83 $\pm$ 0,43	37,03 $\pm$ 1,45	40,45 $\pm$ 1,64	46,94 $\pm$ 2,85	58,91 $\pm$ 2,62	82,55 $\pm$ 1,75	81,41 $\pm$ 1,53
$Fr_5$	36,03 $\pm$ 2,25	37,31 $\pm$ 3,12	41,3 $\pm$ 2,35	48,07 $\pm$ 0,63	61,93 $\pm$ 3,41	87,73 $\pm$ 0,28	72,42 $\pm$ 2,57
$Fr_6$	34,98 $\pm$ 1,74	36,22 $\pm$ 2,56	40,95 $\pm$ 1,85	47,37 $\pm$ 3,69	60,35 $\pm$ 1,36	86,54 $\pm$ 2,78	76,99 $\pm$ 2,85
$Fr_7$	33,59 $\pm$ 2,42	35,62 $\pm$ 1,25	39,37 $\pm$ 1,94	45,36 $\pm$ 1,38	58,12 $\pm$ 0,58	84 $\pm$ 0,56	85,20 $\pm$ 1,37

Les  $CI_{50}$  de l' $Ex_1$ , l' $Ex_2$  et leurs fractions sont déterminées graphiquement à partir des courbes présentées en appendice B (2-3).

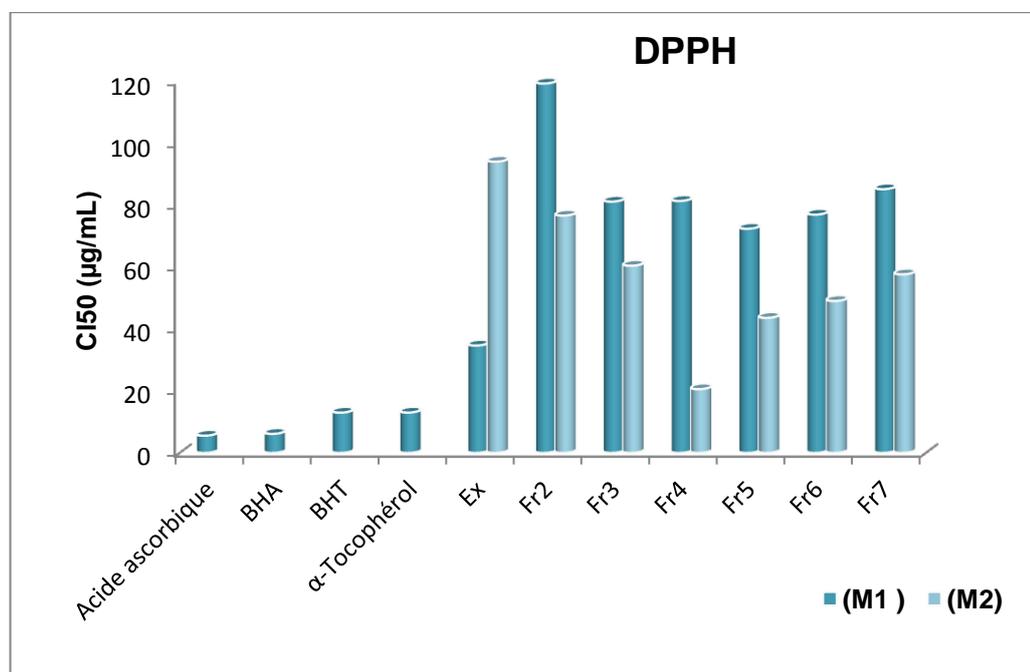
**Tableau 3.7** : Variation des taux de piégeage du DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'Ex<sub>2</sub> et ses fractions

C (µg/mL)	PI (M2) (%)						Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
	6,25	12,5	25	50	100	200	
Ex <sub>2</sub>	16,4 ± 1,55	20,58 ± 0,93	30,89 ±1,22	45,4 ± 6,28	75,43 ± 3,81	89,22 ± 0,26	94,08 ± 3,20
Fr' <sub>2</sub>	16,4 ± 1,55	20,58 ± 0,93	30,89 ±1,22	45,4 ± 0,28	75,43 ± 2,81	89,22 ± 0,26	76,66 ± 0,27
Fr' <sub>3</sub>	11,33 ± 0,76	14,66 ± 1,03	20,28 ± 1,08	27,69 ± 1,16	87,77 ± 0,63	86,65 ± 1,03	60,47 ± 0,76
Fr' <sub>4</sub>	24,60 ± 0,50	39,61 ± 1,65	63,0 ± 0,12	87,62 ±1,34	88,02 ± 0,37	88,83 ± 0,24	20,59 ± 0,24
Fr' <sub>5</sub>	17,49 ± 0,89	22,34 ± 1,04	37,52 ± 1,21	67,0 ±1,86	87,06 ± 0,50	87,65 ± 0,16	43,64 ± 0,79
Fr' <sub>6</sub>	19,04 ± 1,67	25,18 ± 1,26	36,52 ± 2,84	55,86 ± 1,34	81,65 ± 0,37	85,67 ± 0,66	49,09 ± 1,53
Fr' <sub>7</sub>	11,43 ± 2,96	23,28 ± 0,95	33,25 ± 0,46	49,58 ± 1,05	75,40 ± 1,34	84,73 ± 0,53	57,69 ± 0,35

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH• des extraits de margine et de leurs différentes fractions révèlent une activité dose-dépendante. L'augmentation de la concentration a fait augmenter le pourcentage d'inhibition des deux extraits et toutes les fractions testés des deux margines (M1) et (M2). L'extrait total Ex<sub>1</sub> à l'effet de piégeage du radical DPPH• le plus élevé correspondant à la Cl<sub>50</sub> la plus faible (34,69 ± 2,29 µg/mL) et toutes ses fractions ont présenté une Cl<sub>50</sub> plus élevée en termes d'activité antioxydante (Tableau 3.6). En revanche, l'Ex<sub>2</sub> a présenté la plus faible activité antioxydante indiquée dans le tableau 3.7 (94,08 ± 3,20 µg/mL) par rapport ses fractions qui ont indiqués des activités antioxydantes extraordinaires, particulièrement, la fraction Fr'<sub>4</sub> avec une Cl<sub>50</sub> de 20,59 ± 0,24 (µg/mL) proche de l'activité des standards indiqués dans la figure 3.8.

Les valeurs de Cl<sub>50</sub> déterminées pour les deux extraits Ex<sub>1</sub>, Ex<sub>2</sub>, leurs fractions et les standards indiqués dans le chapitre 2 sont présentées dans la figure 3.8. La Fr<sub>1</sub> n'est pas illustrée dans la figure 3.8 en raison de sa valeur Cl<sub>50</sub> la plus élevée

( $918.5 \pm 1,68 \mu\text{g/mL}$ ) et, par conséquent, de son activité antioxydante la plus faible.



**Figure 3.8 :** Comparaison des valeurs de Cl<sub>50</sub> des extraits de margines, de leurs fractions [2-7] et des antioxydants standards par la méthode du piégeage du DPPH•

Le mécanisme d'antioxydation est bien connu pour sa capacité à piéger les radicaux libres par le biais d'un don d'hydrogène. Selon la littérature, des niveaux élevés de phénols et de flavonoïdes impliquent des propriétés antioxydantes significatives [240-242]. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés précédemment, indiquant une relation étroite entre l'effet de piégeage du radical DPPH• et les teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes de différents extraits de margines [47, 240, 243]. Cela pourrait expliquer la forte activité antioxydante de l'extrait de margine Ex<sub>1</sub> ainsi que des fractions Fr<sub>5</sub> et Fr<sub>6</sub> avec  $72,42 \pm 2,57 \mu\text{g/mL}$  et  $76,99 \pm 2,85 \mu\text{g/mL}$ , respectivement. Ces fractions ont été séparées avec un éluant contenant plus de 30 % du méthanol, qui est le solvant approprié pour les composés phénoliques, ce qui pourrait en partie expliquer leur teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes et, par conséquent, leur activité antioxydante élevée ou leurs faibles valeurs Cl<sub>50</sub>. En revanche, les fractions Fr<sub>1</sub> et Fr<sub>2</sub>, qui sont clairement apolaires (éluées avec 100-95 % de

chloroforme), ont une teneur plus faible en composés phénoliques et, par conséquent, une faible activité antioxydante, caractérisée par des valeurs  $CI_{50}$  élevées de  $918.5 \pm 1,68 \mu\text{g/mL}$  et  $119,33 \pm 2,36 \mu\text{g/mL}$ , respectivement. Les fractions  $Fr_3$  et  $Fr_4$  contiennent également un niveau moyen de produits phénoliques car elles ont été éluées avec un éluant contenant 10 à 15 % de méthanol, ce qui a donné une activité antioxydante modérée (Figure 3.6). La plus faible activité antioxydante de la  $Fr_7$  ( $CI_{50} = 85,20 \pm 1,37 \mu\text{g/mL}$ ), bien qu'éluée avec une teneur en méthanol plus élevée, est vraisemblablement liée à une forte diminution des composés phénoliques de l'extrait élué dans les fractions précédentes.

Les fractions de l' $Ex_2$  ont montré de meilleures activités que les fractions de l' $Ex_1$ , bien que le contraire ait été démontré par les extraits de margine M1 et M2, cette différence peut-être due à leur emplacement différent et aux systèmes d'extraction de l'huile d'olive appliqués qui résultent en une variété de composés chimiques à des teneurs différentes.

Ces résultats mettent en évidence l'effet synergique entre les fractions de l' $Ex_1$  de margine [244, 245]. Il est plus probable qu'un fractionnement plus poussé des fractions de colonne puisse conduire à des sous-fractions présentant une activité antioxydante plus intéressante.

#### 2.3.2.2. Détermination de l'activité antioxydante de l'extrait de margine et ses fractions par les méthodes de l'oxyde nitrique et le pouvoir réducteur du cuivre et du fer

Les résultats de l'activité du piégeage du radical  $NO\bullet$  sont exprimés en PI (%) et les absorbances réductrice du cuivre (CUPRAC) et du fer (FRAP) des différents échantillons et des standards, l'acide gallique et la quercétine, sont résumés dans le tableau 3.8.

**Tableau 3. 8** : Variation de l'activité antioxydante de l'Ex<sub>2</sub> et ses fractions par les tests de piégeage du NO• et de réduction du cuivre et du fer

C (2 mg/mL)	Abs (CUPRAC)	Abs (FRAP)	PI (%) NO
Acide gallique	3,06 ± 0,25	-	-
Quercétine	-	1,86 ± 0,40	-
Acide ascorbique	-	-	75,8 ± 1,90
Ex <sub>2</sub>	2,78 ± 0,20	1,77 ± 1,25	70,47 ± 1,95
Fr' <sub>1</sub>	2,31 ± 1,23	-	16,88 ± 1,25
Fr' <sub>2</sub>	2,79 ± 0,96	-	46,08 ± 2,25
Fr' <sub>3</sub>	2,65 ± 0,22	1,78 ± 1,30	56,49 ± 2,02
Fr' <sub>4</sub>	2,78 ± 1,30	1,84 ± 0,90	70,02 ± 2,05
Fr' <sub>5</sub>	2,74 ± 0,75	1,79 ± 1,60	73,99 ± 0,20
Fr' <sub>6</sub>	2,76 ± 1,26	1,77 ± 2,42	77,70 ± 0,62
Fr' <sub>7</sub>	2,92 ± 0,86	1,85 ± 1,08	79,09 ± 1,90

L'extrait total Ex<sub>2</sub> de M2 et ses fractions Fr'<sub>4</sub>, Fr'<sub>5</sub>, Fr'<sub>6</sub> et Fr'<sub>7</sub> ont montrés des effets piègeurs de NO• marqués en comparaison aux résultats des références utilisées et sont révélés efficaces dans les méthodes de FRAP et CUPRAC. La Fr'<sub>7</sub> est la fraction la plus active dans les 3 tests effectués suivi de la Fr'<sub>4</sub> avec des pouvoirs réducteurs remarquables. La même fraction Fr'<sub>7</sub> ainsi que la Fr'<sub>6</sub> présentent des PI (%) du NO• plus importants que celles de l'acide ascorbique avec des valeurs de 79,09 ± 1,90 % et 77,70 ± 0,62 %, respectivement (Tableau 3.8). L'hydroxytyrosol et l'oleuropéine les deux composés présent dans la Fr'<sub>7</sub> et la Fr'<sub>4</sub>, respectivement, leurs confèrent une activité élevée, car il a été rapporté que l'activité antioxydante de divers extraits de margine est directement proportionnelle au pourcentage d'hydroxytyrosol libre et à la présence de l'oleuropéine [47, 246, 247]. Les fractions Fr'<sub>5</sub> et Fr'<sub>6</sub>, qui contiennent la même composition d'acide gallique et d'hydroxytyrosol, présentent des activités de réduction du fer et du cuivre et des activités inhibitrices du DPPH et de NO•, relativement similaires. En générale, La forte activité antioxydante de l'extrait et ses fractions peut s'expliquer par la teneur globale en composés phénoliques et par le type de composés

phénoliques présents. En outre, cette activité antioxydante élevée est due à la teneur en flavonoïdes, en particulier la rutine et la catéchine trouvées dans l'Ex<sub>2</sub> (Tableau 3.4).

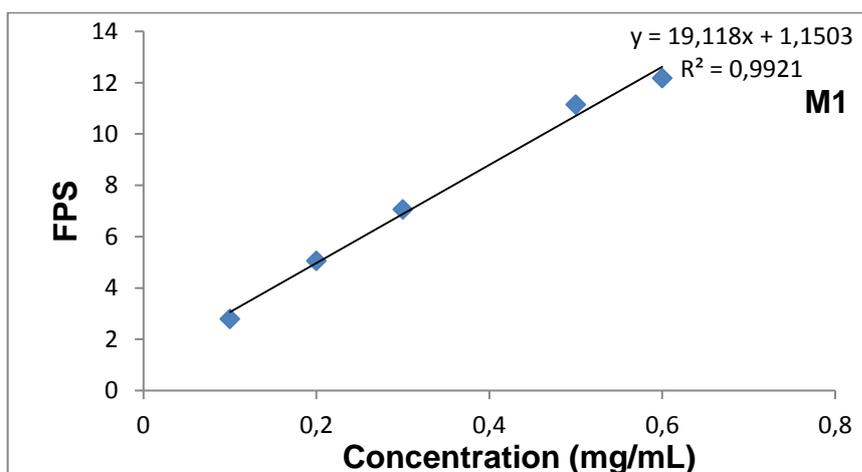
### 2.3.3. Détermination du facteur de protection solaire

#### 2.3.3.1. Facteur de protection solaire de l'extrait brut et ses fractions

Les variations des absorbances de 290-320 nm ainsi que les résultats de l'activité photoprotectrice de l'extrait phénolique Ex<sub>1</sub> à différentes concentrations sont regroupés dans le tableau 3.9 et la figure 3.9.

**Tableau 3.9** : Variation des absorbances de l'extrait de margine Ex<sub>1</sub> à différentes concentrations

<b>C (mg/mL)</b>	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
290	0,67	1,22	1,80	2,33	3,35	3,37
295	0,44	0,79	1,11	1,41	1,77	1,64
300	0,32	0,58	0,82	1,06	1,28	1,25
305	0,26	0,47	0,65	0,82	1,02	0,97
310	0,21	0,37	0,52	0,65	0,81	0,77
315	0,18	0,32	0,44	0,55	0,67	0,65
320	0,16	0,29	0,40	0,49	0,61	0,59
<b>FPS (Ex<sub>1</sub>)</b>	2,80	5,06	7,06	8,99	11,15	12,18



**Figure 3.9** : Variation des FPS<sub>S</sub> en fonction des différentes concentrations de l'extrait phénolique (Ex<sub>1</sub>) de margine (M1)

Les valeurs du FPS des fractions 3-7 en fonction de la concentration sont regroupées dans le tableau 3.10.

**Tableau 3.10** : Valeurs du FPS des fractions de colonne de l'extrait phénolique (Ex<sub>1</sub>) à différentes concentrations

C (mg/mL)	0,025	0,05	0,09	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
FPS (Fr <sub>3</sub> )	--	--	--	6,55	12,03	16,60	20,49	23,02
FPS (Fr <sub>4</sub> )	--	--	--	4,69	8,51	12,85	17,77	22,91
FPS (Fr <sub>5</sub> )	4,86	8,90	16,23	16,70	39,84	--	--	--
FPS (Fr <sub>6</sub> )	5,02	10,03	17,10	18,28	39,96	--	--	--
FPS (Fr <sub>7</sub> )	--	--	12,43	13,91	20,52	23,80	26,49	34

L'augmentation de la concentration a fait augmenter le facteur FPS de façon linéaire pour l'extrait de margine (Figure 3.9) ainsi pour toutes les fractions obtenues. Les tableaux qui regroupent les absorbances des fractions [3-7], les courbes de variation du FPS à différentes concentrations et les spectres UV de tous les échantillons testés en fonction de différentes concentrations sont données en appendice B (4-6).

Comme le montrent les données expérimentales (Tableau 3.9 et 3.10), l'extrait total et les fractions de colonne de la margine (M1) présentent une activité photoprotectrice élevée. Les résultats indiquent que les fractions Fr<sub>5</sub> et Fr<sub>6</sub> sont les meilleures en termes de capacité de protection solaire et sont beaucoup plus importantes que l'extrait total, car à une concentration de 0,2 mg/mL, les valeurs du FPS sont respectivement de 39,84 et 39,96 (Tableau 3.10). La fraction 7 avait également un potentiel photoprotecteur élevé, avec un FPS élevé (34) à 0,5 mg/mL. Les fractions 3 et 4 étaient moins efficaces que les fractions précédentes et ont presque les mêmes propriétés photoprotectrices. Ces fractions ont été retenues pour la suite de l'étude pour leur teneur élevée en composés

phénoliques et leurs résultats antioxydants. Cependant, les fractions Fr<sub>1</sub> et Fr<sub>2</sub> ont montré une faible teneur en polyphénols et une faible activité antioxydante, de sorte que leur activité photoprotectrice n'a pas été étudiée.

### 2.3.3.2. Activité photoprotectrice des fractions combinées

Les concentrations, qui correspondent à un FPS de 20 (Appendice B 5), des fractions 3, 4, 5, 6 et 7 sont respectivement : 0,4, 0,44, 0,12, 0,11 et 0,22 ont été mélangées. Les résultats des valeurs du FPS obtenus en mélangeant deux fractions et trois fractions sont donnés dans le tableau 3.11, la concentration des solutions correspondant à la valeur moyenne résultant du mélange. L'étude de l'activité photoprotectrice de fractions combinées a pour but d'évaluer d'éventuels effets et trouver la meilleure combinaison pour améliorer l'efficacité photoprotectrice. Les valeurs de FPS inférieures et supérieures à 20 indiquent respectivement une diminution et une augmentation de l'effet photoprotecteur.

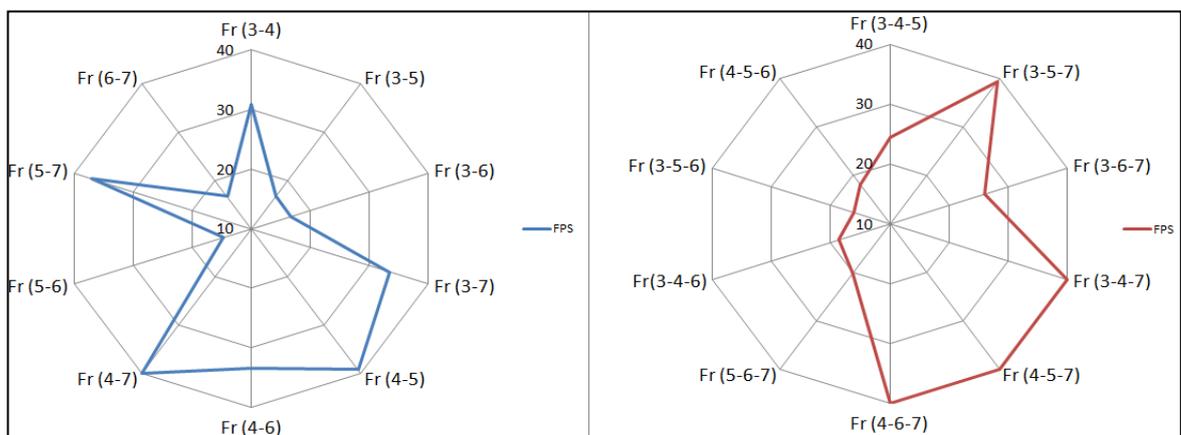
**Tableau 3.11** : Valeurs du FPS des fractions de la margine (M1) combinées à deux et à trois

	Fr (3-4)	Fr (3-5)	Fr (3-6)	Fr (3-7)	Fr (4-5)	Fr (4-6)	Fr (4-7)	Fr (5-6)	Fr (5-7)	Fr (6-7)
C (mg/mL)	0,42	0,26	0,25	0,31	0,28	0,275	0,33	0,12	0,17	0,16
290	3,05	4	2,83	4	4	4	4	1,44	2,93	1,81
295	3,00	3,55	1,90	4	3,88	3,60	4	1,41	2,65	1,69
300	3,20	3,36	1,76	4	4	4	4	1,47	4	1,75
305	3,22	2,68	1,59	2,83	4	2,88	4	1,47	4	1,62
310	2,81	2,60	1,55	2,92	4	3,20	4	1,49	3,44	1,63
315	2,97	2,58	1,58	3,17	3,47	2,78	4	1,52	3,57	1,60
320	2,80	2,68	1,61	4	2,62	3,06	4	1,45	3,03	1,63
<b>FPS</b>	30,89	16,73	16,73	33,45	39,21	33,35	40,01	14,73	37,18	16,68
	Fr (3-4-5)	Fr (3-4-6)	Fr (3-4-7)	Fr (3-5-6)	Fr (3-5-7)	Fr (3-6-7)	Fr (4-5-6)	Fr (4-5-7)	Fr (4-6-7)	Fr (5-6-7)
C (mg/mL)	0,32	0,32	0,35	0,21	0,25	0,24	0,22	0,26	0,26	0,15
290	3,85	2,67	4	2,08	3,98	3,63	2,05	4	4	2,05
295	2,97	2,16	4	1,78	3,16	2,32	2,05	4	4	1,86
300	2,52	1,96	4	1,64	4	3,07	1,80	4	4	2,10
305	2,36	1,78	4	1,55	4	2,39	1,79	4	4	1,98
310	2,25	1,74	4	1,54	4	2,37	1,79	4	4	1,98
315	2,32	1,76	4	1,54	4	2,35	1,73	4	4	2,14
320	2,17	1,72	4	1,54	4	2,45	1,71	4	4	1,93
<b>FPS</b>	24,51	18,68	40,01	15,99	39,32	25,91	18,11	40,01	40,01	20,19

Les combinaisons à deux  $Fr_{(3-5)}$ ,  $Fr_{(3-6)}$ ,  $Fr_{(5-6)}$  et  $Fr_{(6-7)}$  ont montré une diminution de l'effet photoprotecteur, cependant, les  $Fr_{(3-4)}$ ,  $Fr_{(3-7)}$ ,  $Fr_{(4-5)}$ ,  $Fr_{(4-6)}$ ,  $Fr_{(4-7)}$  et  $Fr_{(5-7)}$  ont montré une augmentation de l'activité photoprotectrice, en particulier  $Fr_4$  avec  $Fr_5$  et  $Fr_7$  révélant un effet important. Concernant les combinaisons à trois fractions,  $Fr_{(3-4-6)}$ ,  $Fr_{(3-5-6)}$  et  $Fr_{(4-5-6)}$  ont montré une diminution de l'activité avec des valeurs de 18,68, 15,99, 18,11, respectivement. Toutefois, les combinaisons  $Fr_{(3-4-5)}$ ,  $Fr_{(3-4-7)}$ ,  $Fr_{(3-5-7)}$ ,  $Fr_{(3-6-7)}$ ,  $Fr_{(3-4-5)}$ ,  $Fr_{(4-5-7)}$ ,  $Fr_{(5-7-6)}$  et  $Fr_{(4-6-7)}$  ont affiché une augmentation du FPS jusqu'à 40,01 pour  $Fr_{(3-4-7)}$ ,  $Fr_{(4-5-7)}$  et  $Fr_{(4-6-7)}$  qui représente une activité très élevée (Tableau 3.11).

L'effet photoprotecteur peut être attribué principalement à la présence de composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes [233, 248]. En effet, il a été prouvé que les flavonoïdes ont des effets photoprotecteurs significatifs en raison de leur capacité d'absorption des UV et de leurs effets antioxydants [224, 249-252]. Ainsi, l'activité photoprotectrice des biophénols et des acides phénoliques de margine, tels que le tyrosol, l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine, le verbascoside, les acides caféique, férulique, chlorogénique et leur efficacité dans le traitement d'une série d'affections cutanées ont été étudiées [18] et de même pour les flavonoïdes tels que la quercétine, le kaempférol, la galanine et l'apigénine qui ont fait l'objet de nombreuses discussions [17].

La figure 3.10 englobe la variation du FPS de toutes les combinaisons des fractions de colonne.



**Figure 3.10** : Variations de FPS des fractions de  $Ex_1$  de la margine (M1) combinées

L'activité photoprotectrice la plus élevée résultant de la combinaison de deux et trois fractions a été obtenue pour, Fr<sub>(4-5)</sub>, Fr<sub>(4-7)</sub> et Fr<sub>(3-7-4)</sub>, Fr<sub>(3-7-5)</sub>, Fr<sub>(4-7-5)</sub>, Fr<sub>(4-7-6)</sub>, respectivement (Figure 3.10). Les spectres UV des fractions combinés à deux et à trois sont en appendice B 7.

La margine est une source prometteuse d'ingrédients actifs pour de nouveaux produits dermo-cosmétiques qui contribuent à maintenir l'homogénéité de la peau, à stimuler l'élastine et le collagène et à inhiber la synthèse excessive de mélanine en raison de sa forte concentration en phénols bioactifs [253], qui peuvent être des filtres UV plus actifs dans les régions UVB que l'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol, très probablement en raison de leur capacité antioxydante et photoprotectrice plus élevée [16]. En outre, il a été constaté que la sécurité des produits de protection solaire est directement liée aux agents photoprotecteurs actifs sur la peau [254].

## CHAPITRE 4

### BIOCONVERSION DE TROIS COMPOSES PHENOLIQUES A L'AIDE DE DEUX SOUCHES (*BACILLUS* ET *STREPTOMYCES*)

Actuellement, les composés phénoliques sont obtenus par synthèse chimique ou par extraction. Ils sont également récupérés à partir de sources naturelles par extraction solide-liquide ou liquide-liquide à l'aide de solvants organiques. Cependant, d'autres techniques ont été utilisées pour obtenir ces composés, notamment l'utilisation de fluides supercritiques, les procédés à haute pression et l'extraction par micro-ondes ou ultrasons. Au cours des dernières années, plus de 1 700 articles sur l'extraction des composés phénoliques ont été publiés, ce qui montre que ce type de processus est déjà bien étudié. À ce jour, la plupart des études publiées portent sur l'obtention de composés phénoliques à l'aide de procédés chimiques et physiques. Par exemple, l'acide ellagique commercial est obtenu par extraction chimique de matériaux riches en ellagitanins, tels que les plantes, à l'aide de méthanol acidifié. Un tel procédé entraîne des coûts élevés et une forte contamination du produit [255-257]. Certains de ces procédés ne sont pas applicables aux industries alimentaires et/ou pharmaceutiques, dans les deux cas en raison de leur coût, de l'utilisation de solvants organiques et de leur faible productivité [258-260]. La biotransformation des composés bioactifs est une alternative intéressante qui mérite l'attention. Dans ces procédés, les composés bioactifs sont obtenus à partir de sources naturelles par des micro-organismes grâce à leur métabolisme secondaire ou à une action enzymatique exogène [261, 262].

Au cœur de cette exploration scientifique, ce chapitre se penche sur la bioconversion des produits phénoliques, une approche innovante qui tire parti de l'activité métabolique de micro-organismes spécifiques du *Bacillus* et *Streptomyces* pour transformer le pyrogallol, l'acide quinique et l'acide vanillique en produits de valeur.

## 1. Étude de la bioconversion des acides phénoliques par des souches sélectionnées

### 1.1. Origine des souches utilisées

Deux souches microbiennes ont été isolées et purifiées au niveau de notre Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) de l'Université de Blida 1. Ces microorganismes ont été isolés de l'algue rouge *Asparagopsis armata*, récoltée en février 2016 au niveau du site de la « Corne d'Or » à Tipaza (Algérie).

Les souches utilisées sont dénommées *3R* et *AZ3* de gram positif et mobile et qui appartiennent au genre *Bacillus* et *Streptomyces*, respectivement (Appendice C 1). Leurs conditions optimales de croissance de milieu de culture, pH et température ont été déjà étudiées [263, 264].

### 1.2. Etude de croissance des deux souches

#### 1.2.1. Milieux de culture

Les milieux de culture LB et ISP2 ont été préparé dans des flacons fermée avec du coton et du papier aluminium et stérilisé après ajustement de leur pH à 7,8 et 7,2 par des solutions acides (HCl) où basiques (NaOH) à 1M pour *3R* et *AZ3*, respectivement. La stérilisation des milieux a été réalisée avec l'autoclave pendant 20 min à 120 °C.

#### 1.2.2. Repiquage des souches

Les souches microbiennes utilisées ont étéensemencés à l'aide d'une anse en platine stérile sur des boîtes de Pétri de 90 mm contenant les milieux LB pour *3R* et ISP2 pour *AZ3*. Ces boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24h et 48h pour *Bacillus* et *Streptomyces*, respectivement.

#### 1.2.3. Préparation de l'inoculum

Cette étape consiste à préparer une suspension bactérienne en prélevant des colonies bien isolées et identiques de chacune des souches obtenues d'une culture jeune et pure de 18 à 24 h et les décharger dans 100 mL de milieu de

culture (LB et ISP2) liquide stérilisé, puis agiter quelques minutes et incuber à 30 °C pendant 24 h pour 3R et 48h AZ3, sous une agitation de 250 rpm.

#### 1.2.4. Suivi de croissance des souches 3R et AZ3

Des Erlenmeyers de 100 mL avec un volume utile de 10 mL contenant les mêmes milieux liquides (LB et ISP2) ont été inoculés par 5 % de pré-culture. L'incubation a été faite pendant 7 jours à la température adéquate et sous agitation de 250 rpm. Des mesures de DO à 600 nm ont été effectuées sur des prélèvements réguliers.

#### 1.3. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice en milieu solide

La méthode de diffusion en milieu solide a été utilisée pour déterminer la sensibilité des deux souches 3R et AZ3 aux acides phénoliques utilisés comme précurseurs. Les acides phénoliques ont été solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour déterminer leur effet inhibiteur à différentes concentrations, à savoir 5, 0,5 et 0,05 mg/mL pour 3R et 0,05 mg/mL pour AZ3.

La procédure générale pour déterminer la concentration assimilable non inhibitrice comprend les mêmes étapes décrites dans le chapitre 3.

#### 1.4. Procédure de la bioconversion

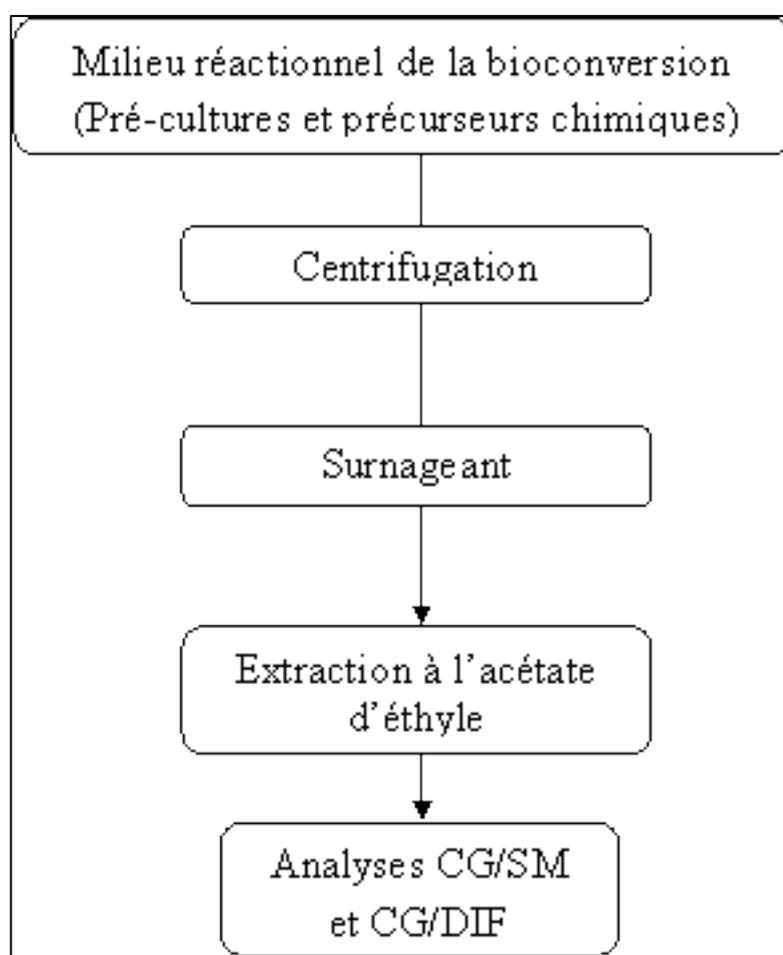
5mg des substrats (acides phénoliques) ont été ajoutés à un volume de 100 mL de préculture fraîche préparé de la même manière à celle utilisée pour établir la courbe de croissance des souches 3R et AZ3 et déposés dans des Erlenmeyers de 500 mL. Trois analyses correspondant à la solution de bioconversion pour chaque acide, ainsi que des témoins chimiques (solution contenant l'acide seul) et biologiques (solution contenant la souche seule) ont été effectuées dans des conditions aseptiques à une concentration de 0,05 mg/mL.

L'incubation a été réalisée à 30°C et le jour de la croissance maximale des deux souches 3R et AZ3, une centrifugation a été réalisée à l'aide de la centrifugeuse à 4500 tour/min pendant 30 min. A l'issue de cette étape, le surnageant obtenu a été soumis à une extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle (Figure 4.1).

### 1.5. Suivi de la bioconversion par CG/SM et CG/DIF

Les acides purs et les fractions obtenues ont fait l'objet d'analyses par CG/SM. Le même système d'injection et la même colonne mentionnée dans le chapitre 2 (& 2.4.2) ont été utilisés dans cette étude, de même pour les bases d'identification des composés obtenus. L'analyse par CG/DIF a été utilisée pour la quantification.

Le programme de température des 3 acides phénoliques a été comme suit : 200 -- 10 °C.min<sup>-1</sup> -- 300 (5'). Concernant les fractions recueillis, le programme suivant a été appliqué : 100 (3') --5 °C.min<sup>-1</sup>-- 220 --10 °C.min<sup>-1</sup>-- 270 (5').

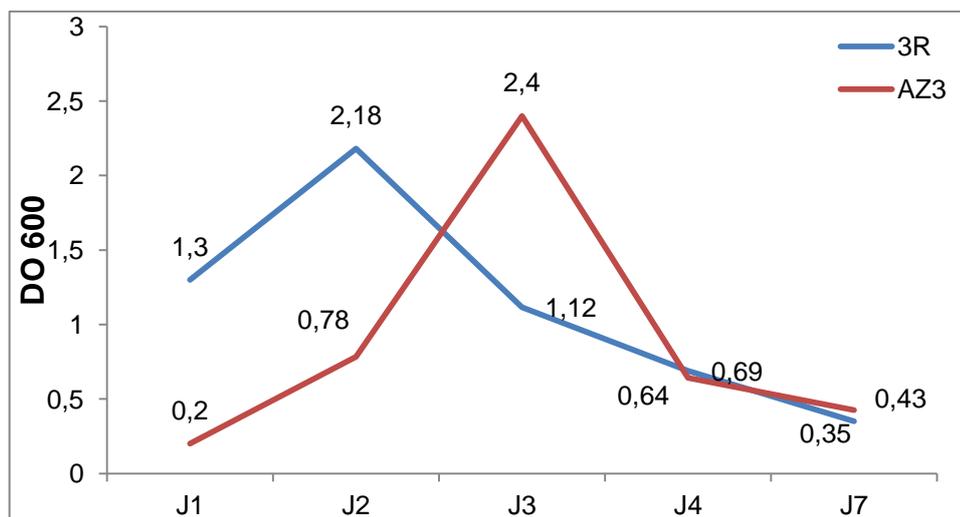


**Figure 4.1** : Extraction des produits de valeur par la bioconversion des acides phénoliques

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Cinétique de croissance des souches 3R et AZ3

Des prélèvements réguliers ont été effectués afin de déterminer la croissance bactérienne des deux souches 3R et AZ3 du genre *Bacillus* et *Streptomyces*, respectivement (Figure 4.2).



**Figure 4.2 :** Cinétique de croissance bactérienne des deux souches 3R et AZ3

Le suivi de leur croissance en fonction du temps montre que la souche 3R atteint son maximum au 2<sup>ème</sup> jour de culture avec une DO à 600 nm d'environ 2,18, ainsi, le maximum de croissance de la souche AZ3 est au 3<sup>ème</sup> jour avec une DO de 2,4. Au-delà de cette période, les densités optiques commencent à diminuer jusqu'à des valeurs de DO de 0,35 et 0,43 pour 3R et AZ3, respectivement.

### 2.2. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice

La souche 3R a montré une légère sensibilité lorsqu'elle a été soumise à une concentration de 5 mg/mL des acides phénoliques. La concentration de 0,05 mg/mL est la concentration assimilable non inhibitrice qui a fait l'objet de la bioconversion, car les deux souches ont montré une résistance en absence totale de zones d'inhibition. (Appendice C 2).

### 2.3. Produits de la bioconversion par analyse CG/SM et CG/DIF

Les acides pyrogallique (P), quinique (Q) et vanillique (V) soumis à des tests de bioconversion ont permis de récupérer des phases organiques riches en métabolites secondaires. L'analyse CG/SM et CG/DIF des acides phénoliques seuls et des différentes fractions obtenues au jour 2 et 3 pour les souches 3R et AZ3, respectivement, a été effectué dans les conditions mentionné précédemment. Les profils chromatographiques de la bioconversion des 3 composés phénoliques sont mentionnés en appendice A (3-5).

Le tableau 4.1 regroupe les différents dérivés phénoliques obtenus par la bioconversion des 3 acides, pyrogallique, quinique et vanillique et leurs teneurs en utilisant les deux souches 3R et AZ3 du genre *Bacillus* et *Streptomyces*, respectivement.

**Tableau 4.1 :** Produits obtenus par la bioconversion des 3 acides en utilisant les souches 3R et AZ3

N°	Produits	IRL <sub>cal</sub>	IRL <sub>lit</sub>	% (P)		% (Q)		% (V)	
				3R	AZ3	3R	AZ3	3R	AZ3
1	Phénylméthanol	1036	1036	–	5,81	1,54	–	3,9	–
2	Guaiacol	1097	1095	–	–	–	–	–	6,62
3	Phényléthanol	1120	1118	4,17	–	–	–	–	7,05
4	Acide benzoïque	1150	1150	11,75	–	–	–	–	–
5	Acide phénylacétique	1257	1257	–	13,48	–	–	–	1,33
6	Tyrosol	1430	1432	7,57	–	–	–	–	59,19
7	Acétovanillone	1481	1483	–	–	–	–	–	3.06
8	Acide (p-hydroxyphényl) acétique)	1556	1558	–	–	–	–	–	16.37
9	Acétate de tyrosol	1566	1567	68	41,34	98,4	–	96,09	6.36
10	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-diène-2,8-dione	1931	1929	8,51	–	–	–	–	–

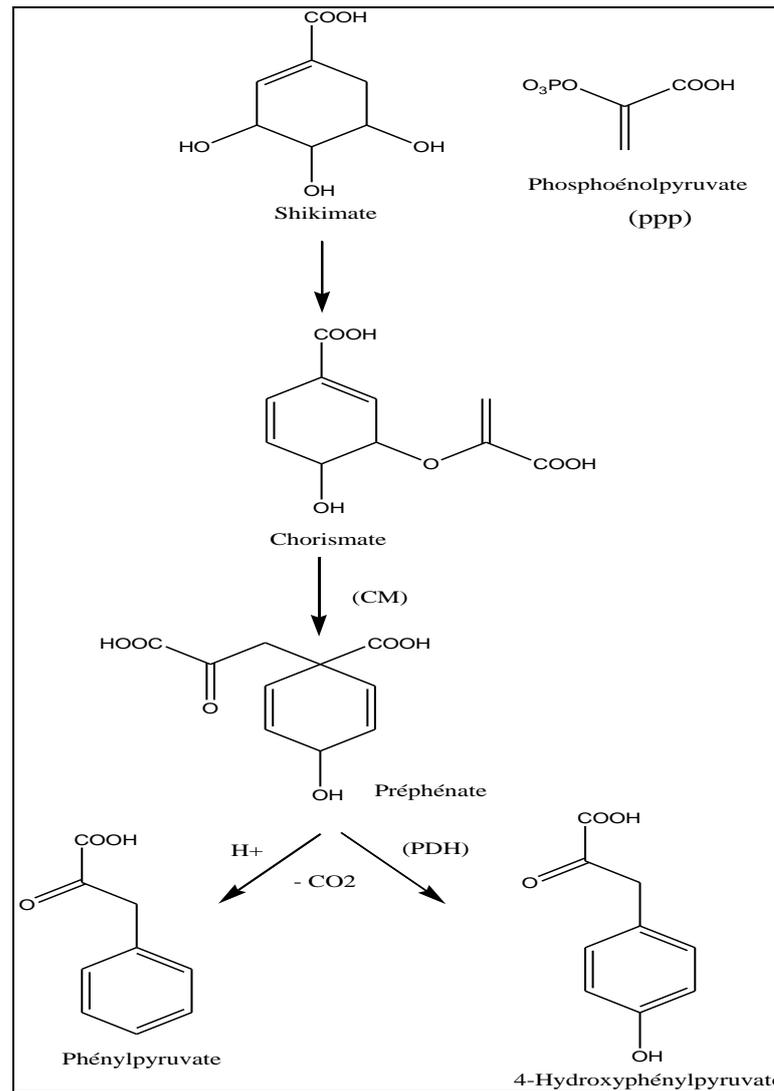
L'examen du tableau 4.1 montre une bioconversion totale des acides phénoliques par la souche 3R, qui donne naissance à d'autres produits de valeur, 5 pour l'acide pyrogallique et 2 pour l'acide quinique et vanillique. La bactérie (3R) du genre *Bacillus* a transformé l'acide pyrogallique en phénols simples tels que le phényléthanol (3); l'acide benzoïque (4); le tyrosol (6); l'acétate de tyrosol (9) et en seule flavonoïde 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-diene-2,8-dione (10). La bioconversion des deux acides quinique et vanillique a permis d'avoir les mêmes produits phénoliques simples; le phénylméthanol (1) et l'acétate de tyrosol (9).

Tous les produits obtenus sont des composés phénoliques et l'acétate de tyrosol étant le produit majoritaire obtenu après la bioconversion des 3 acides phénoliques par la souche 3R.

La bioconversion des 3 produits phénoliques par l'actinomycète AZ3 du genre *Streptomyces* a été bénéfique en termes de produits phénoliques simples pour l'acide pyrogallique et vanillique. 3 composés ont été obtenus par la bioconversion de l'acide pyrogallique à savoir, le phénylméthanol (3); l'acétate de tyrosol (9) et l'acide phénylacétique (5), par contre la souche AZ3 n'a donné aucun produit phénolique de l'acide quinique (Tableau 4.1). L'acide vanillique est le meilleur composé en terme de bioconversion par l'actinomycète AZ3 pour les 6 produits phénoliques formés (guaiacol (2); phényléthanol (3); acide phénylacétique (5); tyrosol (6); acétate de tyrosol (9); l'acide (p-hydroxyphényl) acétique) (8) et l'acétovanillone (7). Le tyrosol et l'acétate de tyrosol sont les produits majoritaires de la bioconversion des acides vanillique et pyrogallique, respectivement.

En termes de composition chimique des extraits recueillis à partir des tests de bioconversion des 3 composés phénoliques, plus de produits de valeurs ont été découverts après la bioconversion du pyrogallol et l'acide vanillique par les deux souches 3R et AZ3, respectivement.

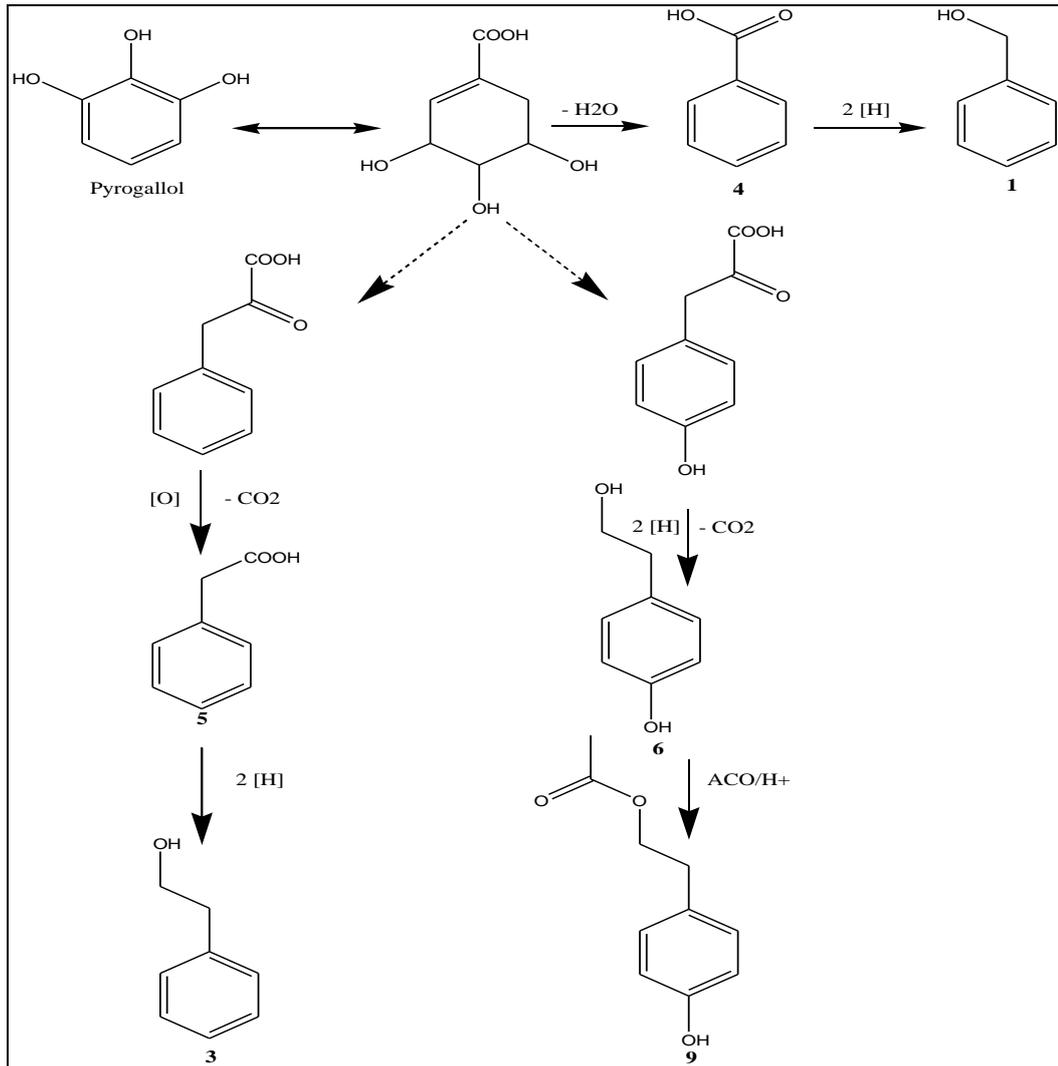
La biosynthèse de différents composés phénoliques est provoquée chez les bactéries, les champignons et les plantes par la voie de shikimate qui donne comme produit final le chorismate [265] (Figure 4.3).



**Figure 4.3 :** Voies de biosynthèse du phénylpyruvate et 4-hydroxyphénylpyruvate

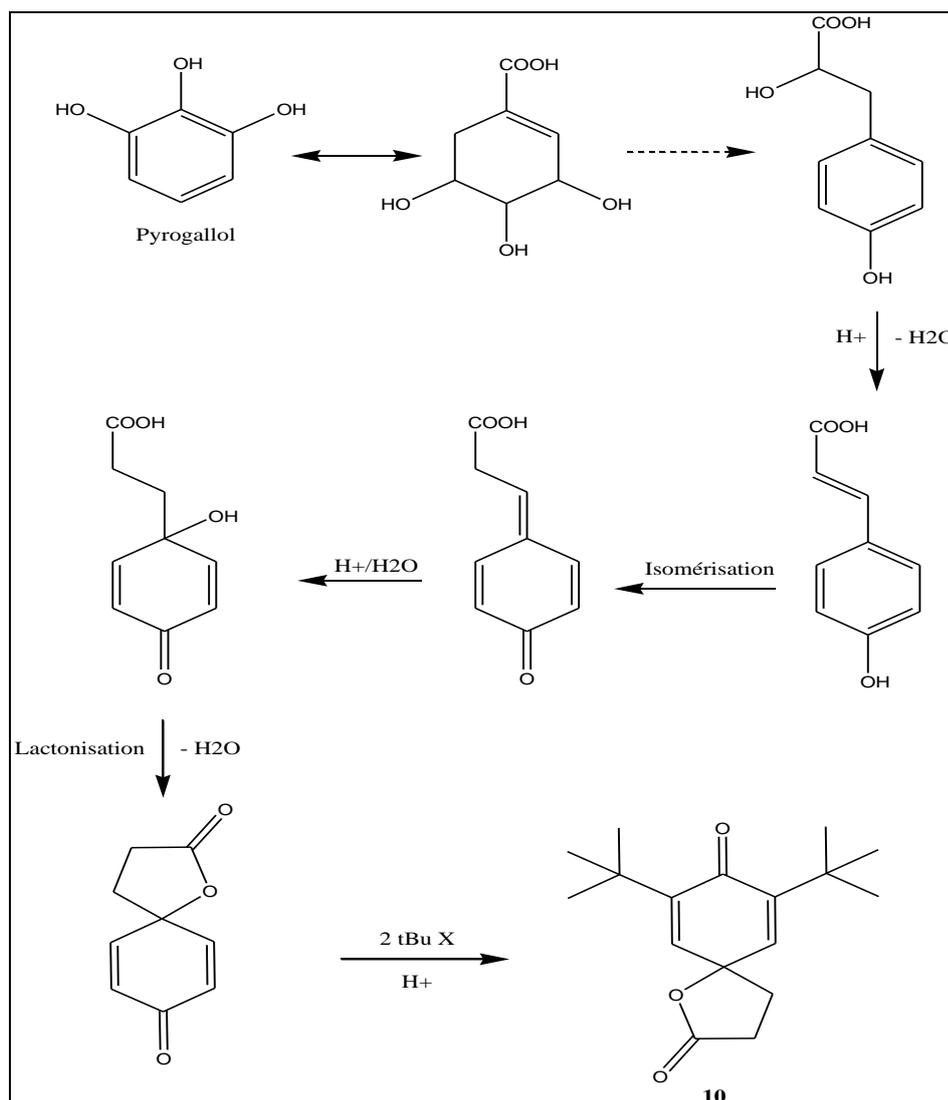
Dans les voies (voies du phénylpyruvate/4-hydroxyphénylpyruvate), que la plupart des micro-organismes semblent utiliser [266, 267], le préphénate formé de mutation du chorismate par l'enzyme chorismate mutase (CM) est d'abord soumis à une déshydratation/décarboxylation ou à une décarboxylation suivi d'une déshydrogénation par l'enzyme préphénate déshydrogénase (PDH) pour former respectivement du phénylpyruvate ou du 4-hydroxyphénylpyruvate (Figure 4.3).

Ces composés peuvent être des produits ou des intermédiaires pour la production ou la transformation des substrats. La figure 4.4 indique des voies plausibles de bioconversion de l'acide pyrogallique.



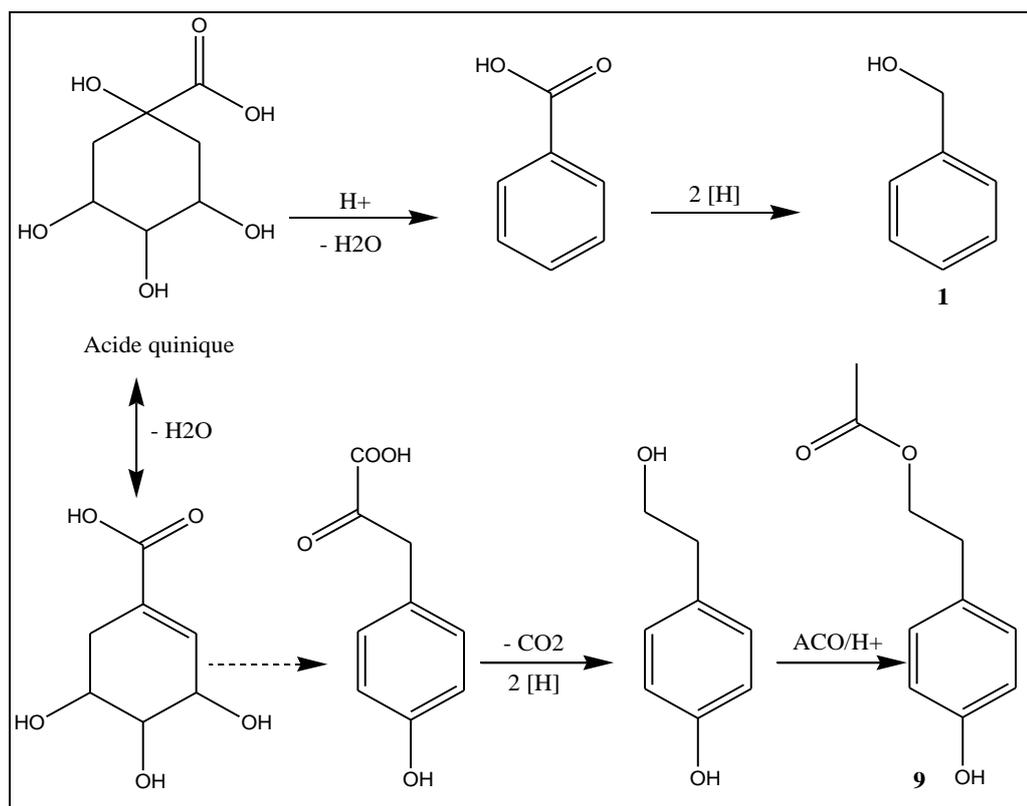
**Figure 4.4 :** Voies de bioconversion du pyrogallol proposées

Les deux souches *3R* et *AZ3* ont transformé l'acide pyrogallique en shikimate (Figure 2.6). Ce dernier est l'intermédiaire principale de la biotransformation du pyrogallol en phénols (1, 3, 4, 5, 6, 9) par des réactions de déshydratation pour avoir l'acide benzoïque (4) qui donne le phénylméthanol (1) après une réduction et le phénylpyruvate, le 4-hydroxyphénylpyruvate étant des intermédiaires (Figure 4.3). La décarboxylation du phénylpyruvate suivi d'oxydation conduit à l'acide phénylacétique (5) qui a subi une réduction pour obtenir le phényléthanol (3) et en parallèle les mêmes réactions qui se suivent sur le 4-hydroxyphénylpyruvate ont résulté le tyrosol (6) qui a donné l'acétate de tyrosol (9) après une acylation (Figure 4.4).



**Figure 4.5 :** Voies de bioconversion du pyrogallol au flavonoïde (10) proposées

Le flavonoïde 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro (4,5) déca-6,9-diène-2,8-dione (10) a été produit par la bioconversion du pyrogallol en premier au shikimate aboutissant au 4-hydroxyphénylpyruvate de mêmes étapes précédentes (Figure 4.3). Ce dernier a été partiellement réduit en alcool en C2 puis déshydraté en alcène délocalisé en carbone C3 jusqu'à formation d'une cétone par isomérisation. L'hydrolyse de la double liaison a donné la fonction alcool en C4. Pour l'attaque de l'oxygène en C1 et la formation d'un deuxième cycle par déshydratation (Lactonisation) suivi d'une alkylation avec deux tertibutyles (tBu) au niveau des C7 et C9 (Figure 4.5).



**Figure 4.6 :** Voies de bioconversion de l'acide quinique proposées

L'acide quinique n'a subi de biotransformation que de la part de la souche 3R, l'autre souche AZ3 s'est montrée inactive. En premier lieu, la bioconversion a été effectuée par déshydratation totale du phényle suivi d'une réduction d'acide en alcool conduisant au phénylméthanol (1) et en deuxième lieu, une déshydratation partielle a conduit à l'acide shikimique qui donne le 4-hydroxyphénylpyruvate (Figure 4.3). Ces intermédiaires ont permis d'avoir l'acétate de tyrosol (9) après une décarboxylation suivi de réduction et acylation (Figure 4.6).



La biotransformation de l'acide vanillique par déméthoxylation suivi d'une déshydratation a conduit à l'acide benzoïque qui a été l'intermédiaire de production du phénylméthanol (1). La carboxylation de l'acide vanillique avec le phosphoénolpyruvate (PPP) a conduit à un intermédiaire essentiel pour la biotransformation des différents produits, ce dernier a subi une déméthoxylation suivi de déshydratation pour avoir le préphénate. L'enzyme phénylacétaldéhyde synthase (PAAS) le transforme en phényl acétaldéhyde [268] conduisant à son rôle au phényléthanol (3) et en acide phényacétique (5) par réduction et oxydation, respectivement. Le gaiacol (2) a été produit par décarboxylation de l'acide vanillique, ce dernier a subi une réduction pour conduire à l'acétovanillone (7) (Figure 4.7).

Tous les produits obtenus présentent des propriétés biologiques et pharmacologiques plus intéressantes des produits de départ, tels que le tyrosol qui présente un large éventail d'avantages pour la santé et exercent des activités telles que des effets cardioprotecteurs [269], antiviraux [270], anti-inflammatoires [271] et anticancéreux [272]. Cependant, le tyrosol est encore rarement utilisé comme complément alimentaire ou comme stabilisateur et antioxydant dans les aliments, les cosmétiques ou les préparations industrielles, probablement en raison de sa nature hydrophile et des problèmes liés à son extraction des solutions aqueuses [273]. En outre, il est généralement bien absorbé par les cellules, ce qui explique leur activité biologique élevée. Les dérivés acylés du tyrosol ou autres ont eu l'intention d'être plus bénéfiques que les composés d'origine [274, 275]. Les dérivés esters du tyrosol présentent de meilleures activités antimicrobiennes et antileismaniaques que le tyrosol, cet effet pouvant être attribué à sa lipophilie accrue [276]. Par exemple, l'acétate de tyrosol a un effet cytotoxique plus important sur les lignées cellulaires cancéreuses et il exerce une activité antithrombotique supérieure à celle du tyrosol [277, 278]. Le gaiacol a été déjà catabolisé de l'acide vanillique par *Streptomyces setonii* Crawford [279], il a suscité beaucoup d'intérêt en raison de ses multiples activités biologiques, telles que ses propriétés analgésiques, antioxydantes et antimicrobiennes [280, 281].

## CONCLUSION

La présente étude portant sur l'étude chimique et la valorisation biologique des polyphénols des margines a été organisée en 4 chapitres.

Le premier chapitre a été consacré à une revue bibliographique dans laquelle nous avons donné un aperçu concis et clair sur l'industrie oléicole, la production, la consommation et les systèmes d'extraction d'huile d'olive à l'échelle nationale et internationale. Nous avons enchaîné avec les sous produits obtenus pour se focaliser à un état des connaissances sur les caractéristiques physicochimiques et biologiques des margines ainsi que les méthodes de traitements et valorisation chimique et biologique. Les margines ne subissent aucun traitement et sont souvent stockées dans des bassins d'évaporation, déversés dans les égouts ou épandus sur le sol. Les produits phénoliques étant les molécules les plus importantes de cet effluent, nous avons consacré une partie non négligeable sur leur classification, biosynthèse et activités biologiques. Ensuite, nous avons discuté l'application de la bioconversion sur les produits phénoliques constituants de la margine.

Le chapitre 2, porte sur l'étude chimique de l'HE et de la FV et la détermination de l'activité antimicrobienne, antioxydante et photoprotectrice de margine. La première partie a été réservée à une étude chimique comparative d'HE et de la FV. L'HE a été obtenue par hydrodistillation à partir de la margine brute avec un rendement de 0,09 %. La FV a été préparée par hydrodistillation, en utilisant le montage de Dean Starck modifié, à partir de l'extrait brut de margine avec un rendement de 6,6 %. Les deux huiles ont été soumises à une analyse par CG/SM et par CG/DIF pour, respectivement, identifier et déterminer la teneur des différents constituants. L'analyse chimique de margine a permis l'identification de 40 et 39 composés représentant 90,17 % et 99,26 % de la composition globale de l'HE et de la FV, respectivement. La composition chimique de l'HE et la FV renferme 3 classes chimiques et un groupe de composés diversement fonctionnalisés. Les classes chimiques essentiellement

présentes sont les phénols, les acides gras saturés et insaturés et les terpènes. L'examen rigoureux de la composition chimique de l'HE et la FV a permis de développer une discussion très fructueuse concernant les voies métaboliques intervenant dans le processus de biosynthèse au sein de la margine par la microflore endogène. Sur la base de cette discussion, nous avons établi un bilan des voies métaboliques impliqués dans laquelle et on a proposé des voies de biosynthèse plausibles concordantes avec celles déjà élucidées et confirmées.

L'étude chimique a été complétée par la détermination de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de douze souches, comparées par rapport à deux antibiotiques (chloramphénicol, kanamycine), 5 bactéries gram positif, 5 gram négatif et 2 levures, l'évaluation de l'activité antioxydante à l'aide du DPPH, comparé avec le BHT, BHA, l' $\alpha$ -tocophérol et l'acide ascorbique et l'étude de l'activité photoprotectrice en calculant leur FPS. Les résultats obtenus ont révélé que la FV est plus active que l'HE, en termes d'activité antimicrobienne, le contraire pour l'activité antioxydante et une activité photoprotectrice très faible des deux huiles.

Le chapitre 3 porte sur l'étude chimique de deux extraits phénoliques de deux margines différentes, une issue d'huilerie moderne de Blida (M1) qui traite notamment les olives de la plaine de la Mitidja et une issue d'une huilerie traditionnelle de Tizi-Ouzou (M2) qui traite des olives provenant des montagnes de la Djurdjura. Sept fractions distinctes ont été obtenues à partir de chaque extrait brut, qui a été réalisé par extraction liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle après délipidation à l'hexane, puis séparé sur une colonne de gel de silice ouverte en utilisant un mélange d'éluant de chloroforme et de méthanol. Les deux extraits et leurs fractions collectées ont été étudiés pour leur teneur en polyphénols. L'Ex<sub>1</sub> et ses fractions ont subi les mêmes activités biologiques effectuées dans le chapitre 2. L'Ex<sub>2</sub> et ses fractions ont fait l'objet des analyses chimiques CLUP/ESI/SM/SM, et CLHP/DAD-UV, respectivement. Les principaux composés appartiennent aux acides phénoliques et flavonoïdes. L'activité antimicrobienne a montré les valeurs de CMI les plus élevées pour l'extrait total Ex<sub>1</sub> allant de 1,56 à 6,25 mg/mL et la Fr<sub>4</sub> a montré la meilleure activité contre *B. subtilis* et les levures *C. albicans* et *S.*

*cerevisiae* avec CMI de 3,13 mg/mL et de 6,25 mg/mL, respectivement. L'Ex<sub>1</sub> a montré la teneur en phénols, en flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante la plus élevée pour le piégeage du DPPH, suivi par la Fr<sub>5</sub> avec des valeurs CI<sub>50</sub> de 34,69 ± 2,29 et 72,42 ± 2,57, respectivement. D'autre part, l'Ex<sub>2</sub> a montré l'activité antioxydante la plus faible et la Fr'<sub>4</sub> était la meilleure fraction en termes de teneur en phénols, de flavonoïdes et d'activité antioxydante contre le DPPH (IC<sub>50</sub> de 20,59 ± 0,24). Les tests antioxydants de l'Ex<sub>2</sub> et de ses fractions par les méthodes de CUPRAC, FRAP et NO ont montré que la Fr'<sub>7</sub> était la meilleure, avec des activités proches des standards utilisés. En outre, L'Ex<sub>1</sub> et toutes ses fractions testées ont montré une forte activité photoprotectrice à de faibles concentrations. Les combinaisons de fractions phénoliques à deux et à trois ont été également appliquées pour la détermination de leur efficacité en terme du FPS, les résultats ont démontré que l'extrait et les fractions phénoliques de margine peuvent constituer une excellente option pour une utilisation en tant que phytoconstituants antimicrobiens, antioxydants et photoprotecteurs.

Le chapitre 4 a traité de la bioconversion de 3 produits phénoliques, à savoir le pyrogallol, l'acide quinique et l'acide vanillique, par deux souches différentes, de la bactérie 3R du genre *Bacillus* et de l'actinomycète AZ3 du genre *Streptomyces*. Il y avait un double objectif, l'un académique qui consistait à voir le comportement des deux souches vis-à-vis des trois composés phénoliques et l'autre est de comprendre les voies métaboliques mis en jeu et les produits de biotransformation obtenus. Les conditions opératoires idéales, telles que le pH et les milieux de culture adaptés à la croissance des deux bactéries, ont déjà été étudiées. Les milieux LB et ISP2 avec des pH de 7,8 et 7,2 ont été utilisés pour la souche 3R et la souche AZ3, respectivement. Un surnageant a été obtenu après la bioconversion de chaque produit phénolique par les deux souches. Tous les extraits recueillis ont été soumis à des analyses CG/SM et CG/DIF. Le pyrogallol est le meilleur produit en termes de variété de composés phénoliques obtenus après sa bioconversion par la bactérie 3R et, en parallèle, l'acide vanillique par sa bioconversion par l'actinomycète AZ3. Tous les composés obtenus à partir de ces tests de bioconversion sont très importants et présentent une large gamme d'activités biologiques et pharmacologiques.

## PERSPECTIVES

- ✓ Etude pharmacologique (activités antidiabétique, anti-cholinestérase, anti-inflammatoire, ...) des extraits et fractions des margines.
- ✓ Application de la bioconversion par les deux souches *3R* et *AZ3* sur l'huile essentielle et la fraction volatile des margines.
- ✓ Application de la bioconversion par les deux souches *3R* et *AZ3* sur les fractions de colonne contenant les produits testés.
- ✓ Utilisation des extraits ou des fractions de ces effluents comme additifs alimentaires et l'évaluation de leur effet sur la conservation et la qualité microbienne des aliments.
- ✓ Isolement du tyrosol et de l'acétate de tyrosol des fractions obtenues après la bioconversion.
- ✓ Formulation des nanoparticules à base des extraits ou des fractions phénoliques.

## REFERENCES

- [1] COI, "*Aire de répartition de l'olivier dans le monde*", Conseil Oléicole International. 2018. p. 16.
- [2] Abu-Khalaf, N., "*Identification and quantification of olive oil quality parameters using an electronic nose*", Agriculture, V. 11, (2021), 674.
- [3] Nefzaoui, A., "*Valorisation des sous-produits de l'olivier*", Options Méditerranéennes, V. 16, (1991), 101-108.
- [4] Jarboui, R.; Magdich, S.; Ammar, E., "*Open ponds for effluent storage, a pertinent issue to olive mill wastewater (OMW) management in a circular economy context: benefits and environmental impact*". *Wastewater from olive oil production: environmental impacts, treatment and valorisation*. Springer, (2023), 153-181.
- [5] Shabir, S.; Ilyas, N.; Saeed, M.; Bibi, F.; Sayyed, R.; Almalki, W.H., "*Treatment technologies for olive mill wastewater with impacts on plants*", Environmental Research, V. 216, (2023), 114399.
- [6] COI, "*Production mondiale d'huile d'olive*", Newsletter N° 145. 2020. p. 18.
- [7] Yaakoubi, A.; Aganchich, B.; Meddich, A.; Wahbi, S., "*Land spreading of olive mill wastewater (OMW): Biodegradation of organic matter and polyphenols in soil and effect on the activity of the total soil microflora*", Water Practice & Technology, V. 19, (2024), 297-310.
- [8] Zahi, M.R.; Zam, W.; El Hattab, M., "*State of knowledge on chemical, biological and nutritional properties of olive mill wastewater*", Food Chemistry, V. 381, (2022), 132238.
- [9] Miklavčič Višnjevec, A.; Baker, P.; Charlton, A.; Preskett, D.; Peeters, K.; Tavzes, Č.; Kramberger, K.; Schwarzkopf, M., "*Developing an olive biorefinery in slovenia: Analysis of phenolic compounds found in olive mill pomace and wastewater*", Molecules, V. 26, (2020), 7.
- [10] Azaizeh, H.; Halahlih, F.; Najami, N.; Brunner, D.; Faulstich, M.; Tafesh, A., "*Antioxidant activity of phenolic fractions in olive mill wastewater*", Food Chemistry, V. 134, (2012), 2226-2234.

- [11] Bouarroudj-Hamici, K.; Mettouchi, S.; Medjkouh-Rezzak, L.; Larbat, R.; Tamendjari, A., "*Antibacterial Activity of the Phenolic Extract of Wild Virgin Olive Oil In Vitro*", *Current Bioactive Compounds*, V. 18, (2022), 45-52.
- [12] Gueboudji, Z.; Addad, D.; Kadi, K.; Nagaz, K.; Secrafi, M.; Yahya, L.B.; Lachehib, B.; Abdelmalek, A., "*Biological activities and phenolic compounds of olive oil mill wastewater from Abani, endemic Algerian variety*", *Scientific Reports*, V. 12, (2022), 6042.
- [13] Kadi, K.; Mrah, R.; Hamli, S.; Lekmine, S.; Dib, D.; Addad, D.; Boukeria, S.; Gueboudji, Z.; Hafsaoui, I., "*Evaluation of the anticoagulant activity of margins from olives extraction in the Khenchela region*", *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, V. 12, (2020), 634-649.
- [14] Silvan, J.M.; Pinto-Bustillos, M.A.; Vásquez-Ponce, P.; Prodanov, M.; Martinez-Rodriguez, A., "*Olive mill wastewater as a potential source of antibacterial and anti-inflammatory compounds against the food-borne pathogen Campylobacter*", *Innovative food science & emerging technologies*, V. 51, (2019), 177-185.
- [15] Imperatore, R.; Pagliarulo, C.; Orso, G.; De Cristofaro, G.A.; Sateriale, D.; Paolucci, M., "*Olive mill wastewater bioactive molecules: applications in animal farming*". *Wastewater from Olive Oil Production: Environmental Impacts, Treatment and Valorisation*. Cham: Springer International Publishing, (2023), 107-141.
- [16] Galanakis, C.M.; Tsatalas, P.; Galanakis, I.M., "*Implementation of phenols recovered from olive mill wastewater as UV booster in cosmetics*", *Industrial Crops and Products*, V. 111, (2018), 30-37.
- [17] Stevanato, R.; Bertelle, M.; Fabris, S., "*Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols*", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, V. 69, (2014), 71-77.
- [18] Carrara, M.; Kelly, M.T.; Roso, F.; Larroque, M.; Margout, D., "*Potential of olive oil mill wastewater as a source of polyphenols for the treatment of skin disorders: a review*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 69, (2021), 7268-7284.
- [19] Abdessemed, S.; Abdessemed, A.; Boudchicha, R., "*Caractérisation et identification de quelques écotypes d'olivier Olea europaea L en Algérie*", *Agriculture*, V. 8, (2018), 26-43
- [20] Hashmi, M.A.; Khan, A.; Hanif, M.; Farooq, U.; Perveen, S., "*Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of Olea europaea (olive)*",

- Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, V. 2015, (2015), 541591.
- [21] Guerra, D.; Lamontanara, A.; Bagnaresi, P.; Orrù, L.; Rizza, F.; Zelasco, S.; Beghè, D.; Ganino, T.; Pagani, D.; Cattivelli, L., "*Transcriptome changes associated with cold acclimation in leaves of olive tree (Olea europaea L.)*", Tree Genetics & Genomes, V. 11, (2015), 1-24.
- [22] MADR, "*Statistiques Agricoles (Superficies et productions)*", Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. 2019. p. 59.
- [23] COI, "*2020/21 crop year: production down, consumption up*", Conseil Oléicole International. 2021.
- [24] Bouali, S.; Douha, S., "*The effects of applying Total Quality Management's techniques on the production of olive oil in Algeria and Tunisia*", Journal of Business Administration and Economic Studies, V. 06, (2020), 083-096.
- [25] Morillo, J.; Antizar-Ladislao, B.; Monteoliva-Sánchez, M.; Ramos-Cormenzana, A.; Russell, N., "*Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes*", Applied microbiology and biotechnology, V. 82, (2009), 25-39.
- [26] Goldsmith, C.; Stathopoulos, C.; Golding, J.; Roach, P., "*Fate of the phenolic compounds during olive oil production with the traditional press method*", International Food Research Journal, V. 21, (2014), 101.
- [27] Di Giacomo, G.; Romano, P., "*Evolution of the olive oil industry along the entire production chain and related waste management*", Energies, V. 15, (2022), 465.
- [28] Vlyssides, A.G.; Loizides, M.; Karlis, P.K., "*Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products*", Journal of Cleaner production, V. 12, (2004), 603-611.
- [29] Niaounakis, M.; Halvadakis, C.P., "*Literature Review and Patent Survey*". Olive processing waste management. Elsevier Science, Amsterdam, (2006), 23-60.
- [30] Akrotos, C.S.; Tekerlekopoulou, A.G.; Vasiliadou, I.A.; Vayenas, D.V., "*Cocomposting of olive mill waste for the production of soil amendments*". Olive Mill Waste. Academic press, Greece, (2017), 161-182.
- [31] Kapellakis, I.E.; Tsagarakis, K.P.; Crowther, J.C., "*Olive oil history, production and by-product management*", Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, V. 7, (2008), 1-26.

- [32] Vitolo, S.; Petarca, L.; Bresci, B., "*Treatment of olive oil industry wastes*", *Bioresource Technology*, V. 67, (1999), 129-137.
- [33] Zbakh, H.; El Abbassi, A., "*Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review*", *Journal of Functional Foods*, V. 4, (2012), 53-65.
- [34] Di Gioia, D.; Barberio, C.; Spagnesi, S.; Marchetti, L.; Fava, F., "*Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds*", *Archives of microbiology*, V. 178, (2002), 208-217.
- [35] Ereqat, S.I.; Abdelkader, A.A.; Nasereddin, A.F.; Al-Jawabreh, A.O.; Zaid, T.M.; Letnik, I.; Abdeen, Z.A., "*Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain Bacillus thuringiensis J20 from olive waste in Palestine*", *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, V. 53, (2018), 39-45.
- [36] Salgado, V.; Fonseca, C.; Lopes da Silva, T.; Roseiro, J.C.; Eusébio, A., "*Isolation and identification of Magnusiomyces capitatus as a lipase-producing yeast from olive mill wastewater*", *Waste and biomass valorization*, V. 11, (2020), 3207-3221.
- [37] Aissam, H.; Errachidi, F.; Merzouki, M.; Benlemlih, M., "*Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase*", *European Journal of Water Quality (Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé)*, V. 7, (2002), 23-30.
- [38] Sierra, J.; Martí, E.; Montserrat, G.; Cruanas, R.; Garau, M., "*Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal*", *Science of the Total Environment*, V. 279, (2001), 207-214.
- [39] Buchmann, C.; Felten, A.; Peikert, B.; Muñoz, K.; Bandow, N.; Dag, A.; Schaumann, G., "*Development of phytotoxicity and composition of a soil treated with olive mill wastewater (OMW): an incubation study*", *Plant and soil*, V. 386, (2015), 99-112.
- [40] Mechri, B.; Mariem, F.B.; Baham, M.; Elhadj, S.B.; Hammami, M., "*Change in soil properties and the soil microbial community following land spreading of olive mill wastewater affects olive trees key physiological parameters and the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi*", *Soil Biology and Biochemistry*, V. 40, (2008), 152-161.

- [41] Mechichi, T.; Sayadi, S., "*Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters*", *Process Biochemistry*, V. 40, (2005), 139-145.
- [42] Sierra, J.; Martí, E.; Garau, M.A.; Cruañas, R., "*Effects of the agronomic use of olive oil mill wastewater: field experiment*", *Science of the total environment*, V. 378, (2007), 90-94.
- [43] Fiorentino, A.; Gentili, A.; Isidori, M.; Monaco, P.; Nardelli, A.; Parrella, A.; Temussi, F., "*Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components*", *Journal of agricultural and food chemistry*, V. 51, (2003), 1005-1009.
- [44] Mekki, A.; Dhouib, A.; Sayadi, S., "*Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth*", *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, V. 2, (2013), 1-7.
- [45] Saadi, I.; Laor, Y.; Raviv, M.; Medina, S., "*Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity*", *Chemosphere*, V. 66, (2007), 75-83.
- [46] Ahmed, P.M.; Fernández, P.M.; Castellanos, L.I.; Pajot, H.F., "*Exploitation alternatives of olive mill wastewater: Production of value-added compounds useful for industry and agriculture*", *Biofuel Research Journal*, V. 6, (2019), 980-994.
- [47] El-Abbassi, A.; Kiai, H.; Hafidi, A., "*Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater*", *Food chemistry*, V. 132, (2012), 406-412.
- [48] Elkacmi, R.; Bennajah, M., "*Advanced oxidation technologies for the treatment and detoxification of olive mill wastewater: a general review*", *Journal of Water Reuse and Desalination*, V. 9, (2019), 463-505.
- [49] Yaakoubi, A.; Chahlaoui, A.; Elyachioui, M.; Chaouch, A., "*Traitement des margines à pH neutre et en conditions d'aérobies par la microflore du sol avant épandage*", *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, V. 149, (2010), 43-56.
- [50] Rais, Z.; El Haji, M.; Benabbou, M.; Majbar, Z.; Lahlou, K.; Taleb, M.; Zaytouni, Y.; Rheribi, R.; Bouka, H.; Nawdali, M., "*Margines: traitement, valorisation dans la germination des graines de tomate et dans la filière de compostage*", *Revue des sciences de l'eau*, V. 30, (2017), 57-62.
- [51] Chowdhury, A.K.M.M.B.; Akratos, C.S.; Vayenas, D.V.; Pavlou, S., "*Olive mill waste composting: A review*", *International Biodeterioration and Biodegradation*, V. 85, (2013), 108-119.

- [52] de la Casa, J.A.; Lorite, M.; Jiménez, J.; Castro, E., "Valorisation of wastewater from two-phase olive oil extraction in fired clay brick production", *Journal of Hazardous Materials*, V. 169, (2009), 271-278.
- [53] Romeo, R.; De Bruno, A.; Imeneo, V.; Piscopo, A.; Poiana, M., "Impact of stability of enriched oil with phenolic extract from olive mill wastewaters", *Foods*, V. 9, (2020), 856.
- [54] Ricelli, A.; Gionfra, F.; Percario, Z.; De Angelis, M.; Primitivo, L.; Bonfantini, V.; Antonioletti, R.; Bullitta, S.M.; Saso, L.; Incerpi, S., "Antioxidant and biological activities of hydroxytyrosol and homovanillic alcohol obtained from olive mill wastewaters of extra-virgin olive oil production", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 68, (2020), 15428-15439.
- [55] Koutrotsios, G.; Larou, E.; Mountzouris, K.C.; Zervakis, G.I., "Detoxification of olive mill wastewater and bioconversion of olive crop residues into high-value-added biomass by the choice edible mushroom *Hericium erinaceus*", *Applied biochemistry and biotechnology*, V. 180, (2016), 195-209.
- [56] Zerva, A.; Zervakis, G.I.; Christakopoulos, P.; Topakas, E., "Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi", *Journal of environmental management*, V. 203, (2017), 791-798.
- [57] Abrunhosa, L.; Oliveira, F.; Dantas, D.; Gonçalves, C.; Belo, I., "Lipase production by *Aspergillus ibericus* using olive mill wastewater", *Bioprocess and biosystems engineering*, V. 36, (2013), 285-291.
- [58] Crognale, S.; D'Annibale, A.; Federici, F.; Fenice, M.; Quaratino, D.; Petruccioli, M., "Olive oil mill wastewater valorisation by fungi", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, V. 81, (2006), 1547-1555.
- [59] Lopez, M.; Ramos-Cormenzana, A.; biodegradation, "Xanthan production from olive-mill wastewaters", *International biodeterioration and biodegradation*, V. 38, (1996), 263-270.
- [60] Morillo, J.A.; Guerra del Águila, V.; Aguilera, M.; Ramos-Cormenzana, A.; Monteoliva-Sánchez, M., "Production and characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill-waste waters", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V. 23, (2007), 1705-1710.
- [61] Liang, T.-W.; Wang, S.-L., "Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities", *Marine drugs*, V. 13, (2015), 1847-1863.

- [62] Gudiña, E.J.; Rodrigues, A.I.; de Freitas, V.; Azevedo, Z.; Teixeira, J.A.; Rodrigues, L.R., "*Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids*", *Bioresource technology*, V. 212, (2016), 144-150.
- [63] Ramírez, I.M.; Tsaousi, K.; Rudden, M.; Marchant, R.; Alameda, E.J.; Román, M.G.; Banat, I.M., "*Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source*", *Bioresource technology*, V. 198, (2015), 231-236.
- [64] Galanakis, C.M.; Tornberg, E.; Gekas, V., "*A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction*", *WT-Food Science and Technology*, V. 43, (2010), 1009-1017.
- [65] Dermeche, S.; Nadour, M.; Larroche, C.; Moulti-Mati, F.; Michaud, P., "*Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies*", *Process Biochem*, V. 48, (2013), 1532-1552.
- [66] Roig, A.; Cayuela, M.L.; Sánchez-Monedero, M., "*An overview on olive mill wastes and their valorisation methods*", *Waste management*, V. 26, (2006), 960-969.
- [67] Messineo, A.; Maniscalco, M.P.; Volpe, R., "*Biomethane recovery from olive mill residues through anaerobic digestion: A review of the state of the art technology*", *Science of The Total Environment*, V. 703, (2020), 135508.
- [68] Rahmanian, N.; Jafari, S.M.; Galanakis, C.M., "*Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater*", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, V. 91, (2014), 1-18.
- [69] Cassano, A.; Conidi, C.; Drioli, E., "*Comparison of the performance of UF membranes in olive mill wastewaters treatment*", *Water research*, V. 45, (2011), 3197-3204.
- [70] Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A., "*Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste*", *Grasas y aceites*, V. 57, (2006), 95-106.
- [71] Nadour, M.; Laroche, C.; Pierre, G.; Delattre, C.; Moulti-Mati, F.; Michaud, P., "*Structural characterization and biological activities of polysaccharides from olive mill wastewater*", *Applied biochemistry and biotechnology*, V. 177, (2015), 431-445.

- [72] Jaouani, A.; Sayadi, S.; Vanthourhout, M.; Penninckx, M.J., "*Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters*", *Enzyme and microbial technology*, V. 33, (2003), 802-809.
- [73] Casa, R.; D'Annibale, A.; Pieruccetti, F.; Stazi, S.R.; Sermanni, G.G.; Cascio, B.L., "*Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability*", *Chemosphere*, V. 50, (2003), 959-966.
- [74] Gunay, A.; Karadag, D., "*Recent developments in the anaerobic digestion of olive mill effluents*", *Process Biochemistry*, V. 50, (2015), 1893-1903.
- [75] Bravo, L., "*Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*", *Nutrition reviews*, V. 56, (1998), 317-333.
- [76] Gee, J.; Johnson, I., "*Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health*", *Current medicinal chemistry*, V. 8, (2001), 1245-1255.
- [77] Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J., "*The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review*", *Frontiers in nutrition*, V. 5, (2018), 87.
- [78] Santana-Gálvez, J.; Jacobo-Velázquez, D.A., "*Classification of phenolic compounds*". *Phenolic Compounds in Food*. CRC press, Greece, (2018), 3-20.
- [79] Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Jay-Allemand, C., "*Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*", EPFL press, (2005), 106.
- [80] Ganesan, K.; Xu, B., "*A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans*", *Nutrients*, V. 9, (2017), 455.
- [81] Da Silva, J.M.R.; Darmon, N.; Fernandez, Y.; Mitjavila, S., "*Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 39, (1991), 1549-1552.
- [82] Jucá, M.M.; Cysne Filho, F.M.S.; de Almeida, J.C.; Mesquita, D.d.S.; Barriga, J.R.d.M.; Dias, K.C.F.; Barbosa, T.M.; Vasconcelos, L.C.; Leal, L.K.A.M.; Ribeiro, J.E., "*Flavonoids: biological activities and therapeutic potential*", *Natural product research*, V. 34, (2020), 692-705.

- [83] Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J., "*Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*", *The Journal of nutritional biochemistry*, V. 13, (2002), 572-584.
- [84] Pietta, P.-G., "*Flavonoids as antioxidants*", *Journal of natural products*, V. 63, (2000), 1035-1042.
- [85] Krisa, S.; Teguo, P.W.; Decendit, A.; Deffieux, G.; Huguet, F.; Fauconneau, B.; Merillon, J.-M., "*Production, purification et activité biologique des picéïdes (Stilbènes) extraits de cultures cellulaires de Vitis Vinifera L*", *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, V. 136, (1997), 7-18.
- [86] Morales, M.; Ros Barcelo, A.; Pedreno, M., "*Plant stilbenes: recent advances in their chemistry and biology*", *Advances in Plant Physiology*, V. 3, (2000), 39-70.
- [87] Lamblin, F.; Hano, C.; Fliniaux, O.; Mesnard, F.; Fliniaux, M.-A.; Lainé, É., "*Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers*", *médecine/sciences*, V. 24, (2008), 511-520.
- [88] Dewick, P., "*The biosynthesis of shikimate metabolites*", *Natural Product Reports*, V. 5, (1988), 73-97.
- [89] Nabavi, S.M.; Šamec, D.; Tomczyk, M.; Milella, L.; Russo, D.; Habtemariam, S.; Sutar, I.; Rastrelli, L.; Daglia, M.; Xiao, J., "*Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering*", *Biotechnology advances*, V. 38, (2020), 107316.
- [90] Rodis, P.S.; Karathanos, V.T.; Mantzavinou, A., "*Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 50, (2002), 596-601.
- [91] Klen, T.J.; Vodopivec, B.M., "*The fate of olive fruit phenols during commercial olive oil processing: Traditional press versus continuous two- and three-phase centrifuge*", *LWT-Food Science and Technology*, V. 49, (2012), 267-274.
- [92] Obied, H.K.; Allen, M.S.; Bedgood, D.R.; Prenzler, P.D.; Robards, K.; Stockmann, R., "*Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 53, (2005), 823-837.
- [93] Azzam, M.O.; Al-Gharabli, S.I.; Alrawash, F.F., "*Air gap membrane distillation applied to olive mill wastewater*", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, V. 10, (2022), 108465.

- [94] Ventura, G.; Calvano, C.D.; Abbattista, R.; Bianco, M.; De Ceglie, C.; Losito, I.; Palmisano, F.; Cataldi, T.R., "*Characterization of bioactive and nutraceutical compounds occurring in olive oil processing wastes*", Rapid Communications in Mass Spectrometry, V. 33, (2019), 1670-1681.
- [95] De Marco, E.; Savarese, M.; Paduano, A.; Sacchi, R., "*Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters*", Food chemistry, V. 104, (2007), 858-867.
- [96] Karamać, M.; Pegg, R.B.J.J.o.a.; chemistry, f., "*Limitations of the tetramethylmurexide assay for investigating the Fe (II) chelation activity of phenolic compounds*", Journal of agricultural and food chemistry, V. 57, (2009), 6425-6431.
- [97] Papanikolaou, S.; Galiotou-Panayotou, M.; Fakas, S.; Komaitis, M.; Aggelis, G., "*Citric acid production by Yarrowia lipolytica cultivated on olive-mill wastewater-based media*", Bioresource Technology, V. 99, (2008), 2419-2428.
- [98] Manach, C.; Mazur, A.; Scalbert, A., "*Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases*", Current opinion in lipidology, V. 16, (2005), 77-84.
- [99] Ali, M.B.; Hahn, E.-J.; Paek, K.-Y., "*Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in Panax ginseng bioreactor root suspension cultures*", Molecules, V. 12, (2007), 607-621.
- [100] Falleh, H.; Ksouri, R.; Chaieb, K.; Karray-Bouraoui, N.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Abdelly, C., "*Phenolic composition of Cynara cardunculus L. organs, and their biological activities*", Comptes rendus biologiques, V. 331, (2008), 372-379.
- [101] Hodgson, J.M.; Croft, K.D., "*Tea flavonoids and cardiovascular health*", Molecular aspects of medicine, V. 31, (2010), 495-502.
- [102] Balkis, M.; Leidich, S.; Mukherjee, P.; Ghannoum, M., "*Mechanisms of Fungal Resistance*", Drugs, V. 62, (2002), 1025-1040.
- [103] Ju, J.Y.; Polhamus, C.; Marr, K.A.; Holland, S.M.; Bennett, J.E., "*Efficacies of fluconazole, caspofungin, and amphotericin B in Candida glabrata-infected p47phox-/- knockout mice*", Antimicrobial agents and chemotherapy, V. 46, (2002), 1240-1245.
- [104] Hirsch, H., "*Vulvovaginal candidosis: definition of the disease and its special problems and treatment in pregnancy*", Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau, V. 25, (1985), 1-5.

- [105] Hemaiswarya, S.; Kruthiventi, A.K.; Doble, M., "Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases", *Phytomedicine*, V. 15, (2008), 639-652.
- [106] Báidez, A.; Gómez, P.; Del Río, J.; Ortuño, A., "Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, V. 69, (2006), 224-229.
- [107] Battinelli, L.; Daniele, C.; Cristiani, M.; Bisignano, G.; Saija, A.; Mazzanti, G., "In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit", *Phytomedicine*, V. 13, (2006), 558-563.
- [108] Del Río, J.; Báidez, A.; Botía, J.; Ortuño, A., "Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp", *Food Chemistry*, V. 83, (2003), 75-78.
- [109] Fleming, H.; Walter Jr, W.; Etchells, J., "Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives", *Applied microbiology*, V. 26, (1973), 777-782.
- [110] Furneri, P.M.; Marino, A.; Saija, A.; Uccella, N.; Bisignano, G., "In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein", *International journal of antimicrobial agents*, V. 20, (2002), 293-296.
- [111] Soler-Rivas, C., "García-Rosado A. Polonia I., Junca-Blanch G., Marin RF, Wichers JH Microbiological effects of olive mill waste addition to substrates for *Pleurotus pulmonarius* cultivation", *International Biodeterioration and Biodegradation*, V. 57, (2006), 37-44.
- [112] Sousa, A.; Ferreira, I.C.; Calhella, R.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A.; Pereira, J.A., "Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'", *Bioorganic and medicinal chemistry*, V. 14, (2006), 8533-8538.
- [113] Winkelhausen, E.; Pospiech, R.; Laufenberg, G., "Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace", *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, V. 24, (2005), 41-46.
- [114] Singh, S.P.; Qureshi, A.; Hassan, W., "Mechanisms of action by antimicrobial agents: A review", *McGill Journal of Medicine*, V. 19, (2021).
- [115] Zhang, H.; Kong, B.; Xiong, Y.L.; Sun, X., "Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere

- packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 C*", Meat science, V. 81, (2009), 686-692.
- [116] Casas-Sanchez, J.; Alsina, M.A.; Herrlein, M.K.; Mestres, C., "*Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes*", Colloid and Polymer Science, V. 285, (2007), 1351-1360.
- [117] Caturla, N.; Pérez-Fons, L.; Estepa, A.; Micol, V., "*Differential effects of oleuropein, a biophenol from Olea europaea, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes*", Chemistry and physics of lipids, V. 137, (2005), 2-17.
- [118] Halliwell, B., "*How to characterize a biological antioxidant*", Free radical research communications, V. 9, (1990), 1-32.
- [119] Halliwell, B., "*Free radicals and antioxidants: a personal view*", Nutrition reviews, V. 52, (1994), 253-265.
- [120] Nimse, S.B.; Pal, D., "*Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms*", RSC advances, V. 5, (2015), 27986-28006.
- [121] Shimizu, H.; Kiyohara, Y.; Kato, I.; Kitazono, T.; Tanizaki, Y.; Kubo, M.; Ueno, H.; Ibayashi, S.; Fujishima, M.; Iida, M., "*Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study*", Stroke, V. 35, (2004), 2072-2077.
- [122] Berset, C.; Cuvelier, M.-E., "*Revue: méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et mesure du pouvoir antioxydant*", Sciences des aliments, V. 16, (1996), 219-245.
- [123] Bouzid, W.; Yahia, M.; Abdeddaim, M.; Aberkane, M.; Ayachi, A., "*Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne*", Lebanese Science Journal, V. 12, (2011), 59-69.
- [124] McKenzie, R.L.; Björn, L.O.; Bais, A.; Ilyasd, M., "*Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface*", Photochemical and Photobiological Sciences, V. 2, (2003), 5-15.
- [125] Cefali, L.; Ataide, J.; Moriel, P.; Foglio, M.; Mazzola, P., "*Plant-based active photoprotectants for sunscreens*", International journal of cosmetic science, V. 38, (2016), 346-353.
- [126] Martini, M.-C., "*Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*", 3rd edn, Lavoisier, France, (2011).
- [127] Sax, B., "*Educating Consumers about sun protection*", Pharmacy Times, V. 66, (2000), 48-54.

- [128] Dutra, E.A., "*Determination of Sun Protection Factor (SPF) of Sunscreen by Ultraviolet Spectrophotometry*", Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, V. 40, (2004), 381-385.
- [129] Latha, M.; Martis, J.; Shobha, V.; Shinde, R.S.; Bangera, S.; Krishnankutty, B.; Bellary, S.; Varughese, S.; Rao, P.; Kumar, B.N., "*Sunscreening agents: a review*", The Journal of clinical and aesthetic dermatology, V. 6, (2013), 16.
- [130] Urbach, F., "*The historical aspects of sunscreens*", Journal of photochemistry and photobiology B: Biology, V. 64, (2001), 99-104.
- [131] Baker, L.A.; Marchetti, B.; Karsili, T.N.; Stavros, V.G.; Ashfold, M.N., "*Photoprotection: extending lessons learned from studying natural sunscreens to the design of artificial sunscreen constituents*", Chemical Society Reviews, V. 46, (2017), 3770-3791.
- [132] Schalka, S.; Reis, V.M.S.d., "*Sun protection factor: meaning and controversies*", Anais brasileiros de dermatologia, V. 86, (2011), 507-515.
- [133] Ahmida, M.; Zadam, M.H.; Boumendje, A.; Messarah, M.; Moncef, Z.; Hocine, D.; Bensouici, C.; Boumendjel, M., "*UPLC-MS/MS Analysis and Evaluation of the Photoprotective, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Enzymatic Properties of Ethyl Acetate and n-Butanol Fractions from Algerian Juniperus oxycedrus L. Leaves*", Tropical Journal of Natural Product Research, V. 8, (2024), 7639.
- [134] Galanakis, C.M.; Aldawoud, T.M.; Rizou, M.; Rowan, N.J.; Ibrahim, S.A., "*Food ingredients and active compounds against the coronavirus disease (COVID-19) pandemic: A comprehensive review*", Foods, V. 9, (2020), 1701.
- [135] Adrio, J.L.; Demain, A.L., "*Improvements in the formation of cephalosporins from penicillin G and other penicillins by bioconversion*", Organic process research & development, V. 6, (2002), 427-433.
- [136] Mahyuni, S., "*Microbial bioconversion to produce nutraceutical and pharmaceutical bioactive compounds*", Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia, V. 9, (2022), 126–138.
- [137] Schalchli, H.; Hormazábal, E.; Astudillo, Á.; Briceño, G.; Rubilar, O.; Diez, M.C., "*Bioconversion of potato solid waste into antifungals and biopigments using Streptomyces spp*", PLoS One, V. 16, (2021), e0252113.
- [138] Wang, Y.; Du, J.; Li, Q.; Tao, Y.; Cheng, Y.; Lu, J.; Wang, H., "*Bioconversion of cellulose and hemicellulose in corn cob into L-lactic acid*"

- and xylo-oligosaccharides*", International Journal of Biological Macromolecules, V. 253, (2023), 126775.
- [139] Dias, B.; Lopes, M.; Ramôa, R.; Pereira, A.S.; Belo, I., "*Candida tropicalis as a promising oleaginous yeast for olive mill wastewater bioconversion*", Energies V. 14, (2021), 640.
- [140] Romeo, F.V.; Granuzzo, G.; Foti, P.; Ballistreri, G.; Caggia, C.; Rapisarda, P., "*Microbial application to improve olive mill wastewater phenolic extracts*", Molecules, V. 26, (2021), 1944.
- [141] Piotrowska, A.; Rao, M.A.; Scotti, R.; Gianfreda, L., "*Changes in soil chemical and biochemical properties following amendment with crude and dephenolized olive mill waste water (OMW)*", Geoderma, V. 161, (2011), 8-17.
- [142] Arous, F.; Azabou, S.; Jaouani, A.; Zouari-Mechichi, H.; Nasri, M.; Mechichi, T., "*Biosynthesis of single-cell biomass from olive mill wastewater by newly isolated yeasts*", Environmental Science and Pollution Research, V. 23, (2016), 6783-6792.
- [143] Bellou, S.; Makri, A.; Sarris, D.; Michos, K.; Rentoumi, P.; Celik, A.; Papanikolaou, S.; Aggelis, G., "*The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by Zygomycetes*", Journal of Biotechnology, V. 170, (2014), 50-59.
- [144] Dourou, M.; Kancelista, A.; Juszczak, P.; Sarris, D.; Bellou, S.; Triantaphyllidou, I.-E.; Rywinska, A.; Papanikolaou, S.; Aggelis, G., "*Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products*", Journal of Cleaner Production, V. 139, (2016), 957-969.
- [145] Sarris, D.; Matsakas, L.; Aggelis, G.; Koutinas, A.A.; Papanikolaou, S., "*Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by Saccharomyces cerevisiae under non-aseptic conditions*", Industrial Crops and Products, V. 56, (2014), 83-93.
- [146] Fountoulakis, M.S.; Dokianakis, S.N.; Kornaros, M.; Aggelis, G.; Lyberatos, G., "*Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus Pleurotus ostreatus*", Water research, V. 36, (2002), 4735-4744.
- [147] Wähner, R.; Mendez, B.; Giulietti, A., "*Olive black water as raw material for butanol production*", Biological wastes, V. 23, (1988), 215-220.

- [148] Tomati, U.; Lena, G.d.; Galli, E.; Grappelli, A.; Buffone, R., "*Indolacetic acid production from olive waste water by *Arthrobacter spp**", *Agrochimica*, V. 34, (1990), 223-228.
- [149] Mercade, M.; Manresa, M., "*The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production*", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, V. 71, (1994), 61-64.
- [150] Hamza, M.; Khoufi, S.; Sayadi, S., "*Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater*", *Food Chemistry*, V. 131, (2012), 1430-1436.
- [151] Yürekli, F.; Yesilada, O.; Yürekli, M.; Topcuoglu, S., "*Plant growth hormone production from olive oil mill and alcohol factory wastewaters by white rot fungi*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V. 15, (1999), 503-505.
- [152] Ruiz-Bravo, A.; Jimenez-Valera, M.; Moreno, E.; Guerra, V.; Ramos-Cormenzana, A., "*Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7*", *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, V. 8, (2001), 706-710.
- [153] Pozo, C.; Martinez-Toledo, M.; Rodelas, B.; Gonzalez-Lopez, J., "*Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source*", *Journal of biotechnology*, V. 97, (2002), 125-131.
- [154] Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G., "*Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade*", *Molecules*, V. 12, (2007), 1679-1719.
- [155] Jemai, H.; Bouaziz, M.; Sayadi, S., "*Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of Tunisian sweet olive cultivar with regard to fruit ripening*", *Journal of agricultural and food chemistry*, V. 57, (2009), 2961-2968.
- [156] Romero, C.; Brenes, M.; García, P.; Garrido, A., "*Hydroxytyrosol 4- $\beta$ -D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 50, (2002), 3835-3839.

- [157] Ziogas, V.; Tanou, G.; Molassiotis, A.; Diamantidis, G.; Vasilakakis, M., "Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits", *Food chemistry*, V. 120, (2010), 1097-1103.
- [158] Briante, R.; La Cara, F.; Febbraio, F.; Barone, R.; Piccialli, G.; Carolla, R.; Mainolfi, P.; De Napoli, L.; Patumi, M.; Fontanazza, G., "Hydrolysis of oleuropein by recombinant  $\beta$ -glycosidase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* immobilised on chitosan matrix", *Journal of biotechnology*, V. 77, (2000), 275-286.
- [159] Limioli, R.; Consonni, R.; Ottolina, G.; Marsilio, V.; Bianchi, G.; Zetta, L., "1 H and 13 C NMR characterization of new oleuropein aglycones", *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, V., (1995), 1519-1523.
- [160] Kumar, R.A.; Jayaraman, A.; Lakshmanan, M.; Gunasekaran, P., "Bioconversion of gallic acid into pyrogallol by immobilized *Citrobacter freundii* TB3", *Journal of fermentation and bioengineering*, V. 74, (1992), 159-162.
- [161] Bonnin, E.; Lesage-Meessen, L.; Asther, M.; Thibault, J.F., "Enhanced bioconversion of vanillic acid into vanillin by the use of 'natural' cellobiose", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V. 79, (1999), 484-486.
- [162] Álvarez-Rodríguez, M.L.; Belloch, C.; Villa, M.; Uruburu, F.; Larriba, G.; Coque, J.-J.R., "Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples", *FEMS microbiology letters*, V. 220, (2003), 49-55.
- [163] Plaggenborg, R.; Overhage, J.; Loos, A.; Archer, J.A.; Lessard, P.; Sinskey, A.J.; Steinbüchel, A.; Priefert, H., "Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol", *Applied microbiology and biotechnology*, V. 72, (2006), 745-755.
- [164] Overhage, J.; Priefert, H.; Rabenhorst, J.; Steinbüchel, A., "Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene", *Applied microbiology and biotechnology*, V. 52, (1999), 820-828.
- [165] Zhou, H.; Gao, S.; Zeng, W.; Zhou, J., "Improving bioconversion of eugenol to coniferyl alcohol by constitutive promoters in *Escherichia coli*", *Biochemical Engineering Journal*, V. 168, (2021), 107953.
- [166] Evans, C.T.; Conrad, D.; Hanna, K.; Peterson, W.; Choma, C.; Misawa, M., "Novel stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine", *Applied microbiology and biotechnology*, V. 25, (1987), 399-405.

- [167] Brunati, M.; Marinelli, F.; Bertolini, C.; Gandolfi, R.; Daffonchio, D.; Molinari, F., "*Biotransformations of cinnamic and ferulic acid with actinomycetes*", *Enzyme and Microbial Technology*, V. 34, (2004), 3-9.
- [168] Chen, P.; Yan, L.; Zhang, S.; Wu, Z.; Li, S.; Yan, X.; Wang, N.; Liang, N.; Li, H., "*Optimizing bioconversion of ferulic acid to vanillin by Bacillus subtilis in the stirred packed reactor using Box-Behnken design and desirability function*", *Food science and biotechnology*, V. 26, (2017), 143-152.
- [169] Muheim, A.; Lerch, K., "*Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin*", *Applied microbiology and biotechnology*, V. 51, (1999), 456-461.
- [170] Escobar-Muciño, E.; Luna-Guevara, M.; Ramos-Cassellis, M.; Amador-Espejo, G.; Castañeda-Lucio, M.; Arenas-Hernández, M., "*Evaluation of process involved in the production of aromatic compounds in Gram-negative bacteria isolated from vanilla (Vanilla planifolia ex. Andrews) beans*", *Journal of applied microbiology*, V. 128, (2020), 1086-1098.
- [171] Ghosh, S.; Pawar, H.; Pai, O.; Banerjee, U.C., "*Microbial transformation of quinic acid to shikimic acid by Bacillus megaterium*", *Bioresources and Bioprocessing*, V. 1, (2014), 1-6.
- [172] Hu, H.; Li, L.; Ding, S., "*An organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase from Bacillus licheniformis for the efficient bioconversion of hydroxycinnamic acids to vinyl phenol derivatives*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 99, (2015), 5071-5081.
- [173] Ciafardini, G.; Zullo, B., "*Microbiological activity in stored olive oil*", *International journal of food microbiology*, V. 75, (2002), 111-118.
- [174] Aly, A.; Maraei, R.; Rezk, A.; Diab, A., "*Phytochemical constitutes and biological activities of essential oil extracted from irradiated caraway seeds (Carum carvi L.)*", *International Journal of Radiation Biology*, V. 99, (2023), 318-328.
- [175] Pauli, A., "*Antimicrobial properties of essential oil constituents*", *International Journal of Aromatherapy*, V. 11, (2001), 126-133.
- [176] de Cássia Da Silveira e Sá, R.; Andrade, L.N.; De Sousa, D.P., "*Sesquiterpenes from essential oils and anti-inflammatory activity*", *Natural product communications*, V. 10, (2015), 1934578X1501001033.
- [177] Machado, T.Q.; da Fonseca, A.C.; Duarte, A.; Robbs, B.K.; de Sousa, D.P., "*A narrative review of the antitumor activity of monoterpenes from essential oils: An update*", *BioMed Research International*, V. 2022, (2022), 6317201.

- [178] Silva, R.C.e.; Costa, J.S.d.; Figueiredo, R.O.d.; Setzer, W.N.; Silva, J.K.R.d.; Maia, J.G.S.; Figueiredo, P.L.B., "*Monoterpenes and sesquiterpenes of essential oils from Psidium species and their biological properties*", *Molecules*, V. 26, (2021), 965.
- [179] Sousa, D.P.d.; Nóbrega, F.F.; Lima, M.R.d.; Almeida, R.N.D., "*Pharmacological activity of (R)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils*", *Zeitschrift für Naturforschung C*, V. 66, (2011), 353-359.
- [180] Allouche, N.; Fki, I.; Sayadi, S., "*Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 52, (2004), 267-273.
- [181] Ben Saad, A.; Jerbi, A.; Khlif, I.; Ayedi, M.; Allouche, N., "*Stabilization of refined olive oil with phenolic monomers fraction and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewater*", *Chemistry Africa*, V. 3, (2020), 657-665.
- [182] Adams, R.P., "*Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*", 4th edn, Allured publ, Carol Stream, IL, USA, (2007).
- [183] Weinstein, M.P.; Lewis, J.S., "*The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes*", *Journal of clinical microbiology*, V. 58, (2020), 10-1128.
- [184] Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Moyá, M.L.; Troncoso, A.; García-Parrilla, M., "*Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical*", *Talanta*, V. 71, (2007), 230-235.
- [185] Molyneux, P., "*The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*", *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, V. 26, (2004), 211-219.
- [186] Zubia, M.; Fabre, M.S.; Kerjean, V.; Le Lann, K.; Stiger-Pouvreau, V.; Fauchon, M.; Deslandes, E., "*Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts*", *Food chemistry*, V. 116, (2009), 693-701.
- [187] Blois, M.S., "*Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*", *Nature*, V. 181, (1958), 1199-1200.
- [188] Mansur, J.d.S.; Breder, M.N.R.; Mansur, M.C.d.A.; Azulay, R.D., "*Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria*", *Anais Brasileiros de Dermatologia*, V. 61, (1986), 121-4.

- [189] Sayre, R.M.; Agin, P.P.; LeVee, G.J.; Marlowe, E., "A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas", *Photochemistry and Photobiology*, V. 29, (1979), 559-566.
- [190] Paredes, C.; Cegarra, J.; Bernal, M.; Roig, A., "Influence of olive mill wastewater in composting and impact of the compost on a Swiss chard crop and soil properties", *Environment international*, V. 31, (2005), 305-312.
- [191] Noubigh, A.; Abderrabba, M.; Provost, E., "Temperature and salt addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water", *The Journal of Chemical Thermodynamics*, V. 39, (2007), 297-303.
- [192] Hafidi, M.; Amir, S.; Revel, J.C., "Structural characterization of olive mill wastewater after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and <sup>13</sup>C NMR", *Process Biochemistry*, V. 40, (2005), 2615-2622.
- [193] Jimenez-Lopez, C.; Carpena, M.; Lourenço-Lopes, C.; Gallardo-Gomez, M.; Lorenzo, J.M.; Barba, F.J.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J., "Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil", *Foods*, V. 9, (2020), 1014.
- [194] Zakia, G.; Kenza, K.; Kamel, N., "Extraction and quantification of polyphenols of olive oil mill wastewater from the cold extraction of olive oil in the region of Khenchela-Algeria", *Genetics & Biodiversity Journal*, V. 5, (2021), 116-122.
- [195] Suárez Montenegro, Z.J.; Álvarez-Rivera, G.; Sánchez-Martínez, J.D.; Gallego, R.; Valdés, A.; Bueno, M.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E., "Neuroprotective effect of terpenoids recovered from olive oil by-products", *Foods*, V. 10, (2021), 1507.
- [196] Vichi, S.; Guadayol, J.M.; Caixach, J.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S., "Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons of virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, V. 1125, (2006), 117-123.
- [197] Termopoli, V.; Piergiovanni, M.; Cappiello, A.; Palma, P.; Famiglini, G., "Tyrosol and Hydroxytyrosol Determination in Extra Virgin Olive Oil with Direct Liquid Electron Ionization–Tandem Mass Spectrometry", *Separations*, V. 8, (2021), 173.
- [198] Yang, Z.; Baldermann, S.; Watanabe, N., "Recent studies of the volatile compounds in tea", *Food Research International*, V. 53, (2013), 585-599.
- [199] Brkić Bubola, K.; Koprivnjak, O.; Sladonja, B.; Lukić, I., "Volatile compounds and sensory profiles of monovarietal virgin olive oil from Buža, Črna and

- Rosinjola cultivars in Istria (Croatia)*", Food Technology and Biotechnology, V. 50, (2012), 192-198.
- [200] Cerretani, L.; Salvador, M.D.; Bendini, A.; Fregapane, G., "*Relationship between sensory evaluation performed by Italian and Spanish official panels and volatile and phenolic profiles of virgin olive oils*", Chemosensory Perception, V. 1, (2008), 258-267.
- [201] Vichi, S.; Castellote, A.I.; Pizzale, L.; Conte, L.S.; Buxaderas, S.; Lopez-Tamames, E., "*Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection*", Journal of Chromatography A, V. 983, (2003), 19-33.
- [202] Angerosa, F.; Servili, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Esposto, S.; Montedoro, G., "*Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality*", Journal of Chromatography A, V. 1054, (2004), 17-31.
- [203] Genovese, A.; Caporaso, N.; Leone, T.; Paduano, A.; Mena, C.; Perez-Jimenez, M.A.; Sacchi, R., "*Use of odorant series for extra virgin olive oil aroma characterisation*", Journal of the Science of Food and Agriculture, V. 99, (2019), 1215-1224.
- [204] Kesen, S.; Kelebek, H.; Selli, S., "*Characterization of the volatile, phenolic and antioxidant properties of monovarietal olive oil obtained from cv. Halhali*", Journal of the American Oil Chemists' Society, V. 90, (2013), 1685-1696.
- [205] Demyttenaere, J.C., "*Biotransformation of terpenoids by microorganisms*", Studies in natural products chemistry, V. 25, (2001), 125-178.
- [206] Aissam, H.; Errachidi, F.; Penninckx, M.; Merzouki, M.; Benlemlih, M., "*Production of tannase by Aspergillus niger HA37 growing on tannic acid and olive mill waste waters*", World Journal of Microbiology and Biotechnology, V. 21, (2005), 609-614.
- [207] Bose, S.K.; Yadav, R.K.; Mishra, S.; Sangwan, R.S.; Singh, A.; Mishra, B.; Srivastava, A.; Sangwan, N.S., "*Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in Mentha arvensis L*", Plant physiology and biochemistry, V. 66, (2013), 150-158.
- [208] Flamini, G.; Cioni, P.L.; Morelli, I., "*Volatiles from leaves, fruits, and virgin oil from Olea europaea Cv. Olivastra Seggianese from Italy*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, V. 51, (2003), 1382-1386.

- [209] Zheng, C.J.; Yoo, J.-S.; Lee, T.-G.; Cho, H.-Y.; Kim, Y.-H.; Kim, W.-G., "*Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids*", FEBS letters, V. 579, (2005), 5157-5162.
- [210] Thormar, H., "*Lipids and essential oils as antimicrobial agents*". John Wiley & Sons, Ltd, London, UK, (2010).
- [211] McGaw, L.; Jäger, A.; Van Staden, J., "*Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants*", South African journal of botany, V. 68, (2002), 417-423.
- [212] Skalicka-Woźniak, K.; Los, R.; Głowniak, K.; Malm, A., "*Antimicrobial activity of fatty acids from fruits of *Peucedanum cervaria* and *P. alsaticum**", Chemistry & Biodiversity, V. 7, (2010), 2748-2754.
- [213] Leouifoudi, I.; Harnafi, H.; Zyad, A., "*Olive mill waste extracts: Polyphenols content, antioxidant, and antimicrobial activities*", Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences, V. 2015, (2015), 714138.
- [214] Kedare, S.B.; Singh, R., "*Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*", Journal of food science technology, V. 48, (2011), 412-422.
- [215] Chouit, H.; Touafek, O.; Brada, M.; Benssouici, C.; Fauconnier, M.-L.; El Hattab, M., "*GC-MS analysis and biological activities of Algerian *Salvia microphylla* essential oils*", Journal of the Mexican Chemical Society, V. 65, (2021), 582-601.
- [216] Ratnasooriya, W.; Pathirana, R.; Dissanayake, A.; Samanmali, B.; Desman, P., "*Evaluation of invitro sun screen activities of salt marshy plants *Suaeda monoica*, *Suaeda maritima* and *Halosarcia indica**", International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences, V. 5, (2016), 15-20.
- [217] Mbanga, L.; Mulenga, M.; Mpiana, P.; Bokolo, K.; Mumbwa, M.; Mvingu, K., "*Determination of sun protection factor (SPF) of some body creams and lotions marketed in Kinshasa by ultraviolet spectrophotometry*", International Journal of Advanced Research in Chemical Scienceis, V. 1, (2014), 7-13.
- [218] da Almeida, W.A.; dos Santos Antunes, A.; Penido, R.G.; da Correa, H.S.; do Nascimento, A.M.; Andrade, Â.L.; Santos, V.R.; Cazati, T.; Amparo, T.R.; de Souza, G.H.B., "*Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas*", Revista Brasileira de Farmacognosia, V. 29, (2019), 373-380.

- [219] Mehrabani, M.; Khazaeli, P., "Screening of sun protective activity of the ethyl acetate extracts of some medicinal plants", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, V. 7, (2008), 5-9.
- [220] Dunaway, S.; Odin, R.; Zhou, L.; Ji, L.; Zhang, Y.; Kadekaro, A.L., "Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation", *Frontiers in pharmacology*, V. 9, (2018), 392.
- [221] Kittiwannachot, P.; Borisut, P.; Wanasawas, P.; Ponpanich, L.; Rattanasuk, O.; Chulasiri, M., "Antimutagenic potentials of hydroalcoholic herbal extracts towards UV-induced mutation", *Thai Journal of Toxicology*, V. 23, (2008), 27-27.
- [222] El Aanachi, S.; Gali, L.; Rammali, S.; Bensouici, C.; Aassila, H.; Dari, K., "In vitro study of the antioxidant, photoprotective, anti-tyrosinase, and anti-urease effects of methanolic extracts from leaves of six Moroccan *Lamiaceae*", *Journal of Food Measurement and Characterization*, V. 15, (2021), 1785-1795.
- [223] Lefahal, M.; Makhloufi, E.-H.; Trifa, W.; Ayad, R.; El Hattab, M.; Benahmed, M.; Keskin, M.; Akkal, S., "The Cosmetic Potential of The Medicinal Halophyte *Tamarix Gallica L.*(*Tamaricaceae*) Growing in The Eastern Part of Algeria: Photoprotective and Antioxidant Activities", *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, V. 24, (2021), 1671-1678.
- [224] Oliveira, F.G.d.S.; Veras, B.O.d.; Silva, A.P.S.A.d.; Araújo, A.D.d.; Barbosa, D.C.d.S.; Silva, T.d.C.M.; Ribeiro, E.R.F.R.; Maia, M.M.L.; Júnior, U.P.S.; Lima, V.L.d.M., "Photoprotective activity and HPLC-MS-ESI-IT profile of flavonoids from the barks of *Hymenaea martiana Hayne (Fabaceae)*: development of topical formulations containing the hydroalcoholic extract", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, V. 35, (2021), 504-516.
- [225] Napagoda, M.T.; Malkanthi, B.M.A.S.; Abayawardana, S.A.K.; Qader, M.M.; Jayasinghe, L., "Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka", *BMC complementary and alternative medicine*, V. 16, (2016), 1-6.
- [226] Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G., "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids", *Free radical biology and medicine*, V. 20, (1996), 933-956.
- [227] Rodrigues, F.; Palmeira-de-Oliveira, A.; das Neves, J.; Sarmiento, B.; Amaral, M.H.; Oliveira, M.B.P., "Coffee silverskin: a possible valuable cosmetic ingredient", *Pharmaceutical Biology*, V. 53, (2015), 386-394.

- [228] Song, H.; Kumar, P.; Arivazhagan, G.; Lee, S.-I.; Yoon, H.-M.; Kim, I.-H.; Kwon, H.-J.; Kim, J.-M.; Hakkim, F.L., "*Antioxidant property of leaves and calluses extracts of in-vitro grown 5 different Ocimum species*", Journal of Plant Biotechnology, V. 39, (2012), 146-153.
- [229] Deniz, F.S.S.; Orhan, I.E.; Duman, H., "*Profiling cosmeceutical effects of various herbal extracts through elastase, collagenase, tyrosinase inhibitory and antioxidant assays*", Phytochemistry Letters, V. 45, (2021), 171-183.
- [230] Suresh, J.; Ahuja, J.; Paramakrishnan, N.; Sebastian, M., "*Total phenolic and total flavonoids content of aerial parts of Artemisia abrotanum Linn. and A. pallens Wall*", Analytical Chemistry Letters, V. 2, (2012), 186-191.
- [231] Gueboudji, Z.; Kadi, K.; Nagaz, K., "*Extraction and quantification of polyphenols of olive oil mill wastewater from the cold extraction of olive oil in the region of Khenchela-Algeria*", Genetics & Biodiversity Journal, V. 5, (2021), 116-122.
- [232] Gueboudji, Z.; Kadi, K.; Nagaz, K., "*Anti-Inflammatory Activity Of Polyphenols From Olive Oil Mill Wastewaters*", Jordanian Journal of Engineering & Chemical Industries, V. 5, (2022), 18-23.
- [233] Bakhouch, I.; Aliat, T.; Boubellouta, T.; Gali, L.; Şen, A.; Bellik, Y., "*Phenolic contents and in vitro antioxidant, anti-tyrosinase, and anti-inflammatory effects of leaves and roots extracts of the halophyte Limonium delicatulum*", South African Journal of Botany, V. 139, (2021), 42-49.
- [234] Cushnie, T.T.; Lamb, A.J., "*Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*", International journal of antimicrobial agents, V. 38, (2011), 99-107.
- [235] El Yamani, M.; Sakar, E.H.; Boussakouran, A.; Benali, T.; Rharrabti, Y., "*Antibacterial and antioxidant potentials of phenolic extracts from olive mill wastewater and their use to enhance the stability of olive oil*", Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, V. 97, (2020), 31-42.
- [236] Laganà, P.; Anastasi, G.; Marano, F.; Piccione, S.; Singla, R.K.; Dubey, A.K.; Delia, S.; Coniglio, M.A.; Facciola, A.; Di Pietro, A., "*Phenolic substances in foods: Health effects as anti-inflammatory and antimicrobial agents*", Journal of AOAC International, V. 102, (2019), 1378-1387.
- [237] Russo, E.; Spallarossa, A.; Comite, A.; Pagliero, M.; Guida, P.; Belotti, V.; Caviglia, D.; Schito, A.M., "*Valorization and Potential Antimicrobial Use of Olive Mill Wastewater (OMW) from Italian Olive Oil Production*", Antioxidants, V. 11, (2022), 903.

- [238] Tafesh, A.; Najami, N.; Jadoun, J.; Halahlih, F.; Riepl, H.; Azaizeh, H., "*Synergistic antibacterial effects of polyphenolic compounds from olive mill wastewater*", Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, V. 2011, (2011), 431021.
- [239] Didry, N.; Seidel, V.; Dubreuil, L.; Tillequin, F.; Bailleul, F., "*Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra**", Journal of ethnopharmacology, V. 67, (1999), 197-202.
- [240] El Moudden, H.; El Idrissi, Y.; Belmaghraoui, W.; Belhoussaine, O.; El Guezzane, C.; Bouayoun, T.; Harhar, H.; Tabyaoui, M., "*Olive mill wastewater polyphenol-based extract as a vegetable oil shelf life extending additive*", Journal of Food Processing and Preservation, V. 44, (2020), e14990.
- [241] Gueboudji, Z.; Kadi, K.; Nagaz, K.; Addad, D.; Secrafi, M.; Yahya, L.B.; Lachehib, B., "*Phenolic compounds and biological activities of phenolic extract of olive oil mill wastewater issue from the cold extraction of olive oil from Khenchela (Algeria)*", Research Square, V., (2021), 19.
- [242] Muflihah, Y.M.; Gollavelli, G.; Ling, Y.-C., "*Correlation study of antioxidant activity with phenolic and flavonoid compounds in 12 Indonesian indigenous herbs*", Antioxidants, V. 10, (2021), 1530.
- [243] Ladhari, A.; Zarrelli, A.; Ghannem, M.; Ben Mimoun, M., "*Olive wastes as a high-potential by-product: Variability of their phenolic profiles, antioxidant and phytotoxic properties*", Waste and Biomass Valorization, V. 12, (2021), 3657-3669.
- [244] Caesar, L.K.; Cech, N.B., "*Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1+ 1 does not equal 2*", Natural Product Reports, V. 36, (2019), 869-888.
- [245] Falcão, T.R.; de Araújo, A.A.; Soares, L.A.L.; de Moraes Ramos, R.T.; Bezerra, I.C.F.; Ferreira, M.R.A.; de Souza Neto, M.A.; Melo, M.C.N.; de Araújo, R.F.; de Aguiar Guerra, A.C.V., "*Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities*", BMC complementary and alternative medicine, V. 18, (2018), 1-12.
- [246] Lins, P.G.; Pugine, S.M.P.; Scatolini, A.M.; de Melo, M.P., "*In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes*", Heliyon, V. 4, (2018), e00805.

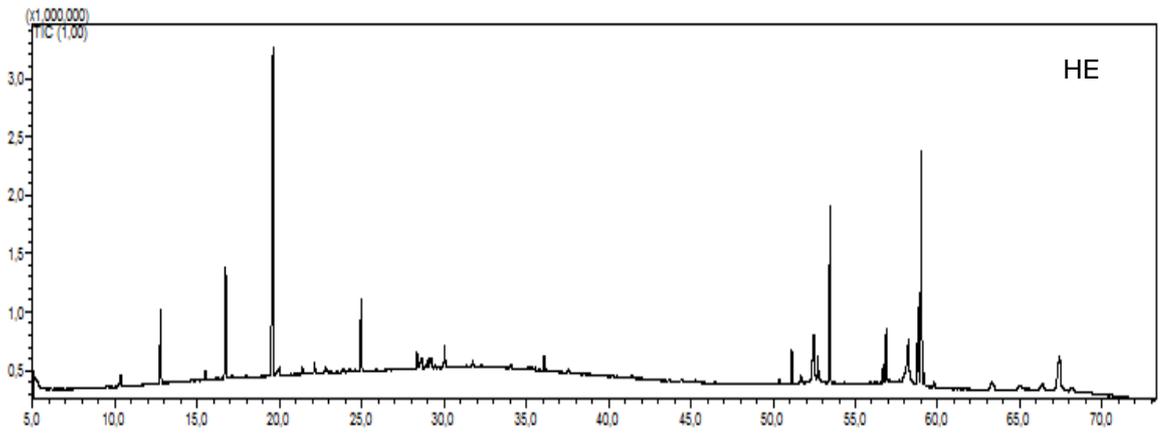
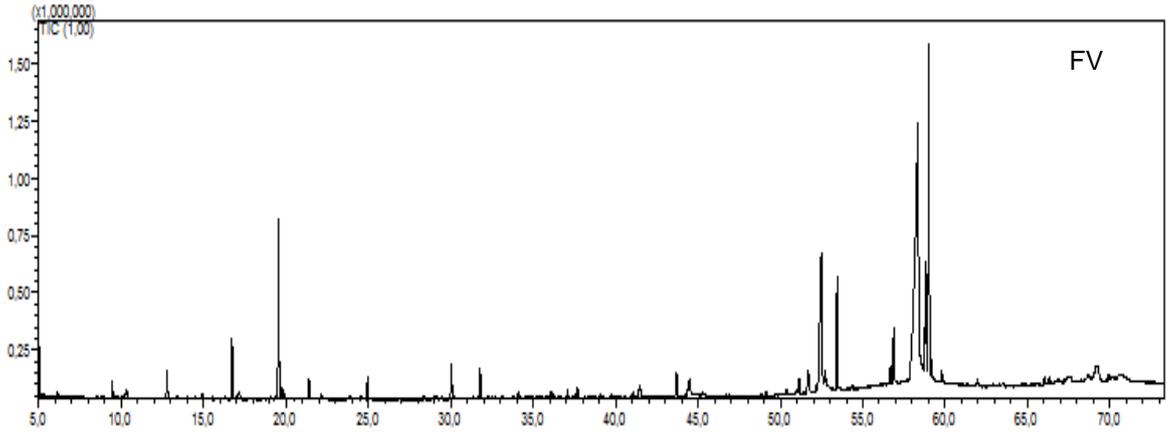
- [247] Saija, A.; Trombetta, D.; Tomaino, A.; Cascio, R.L.; Princi, P.; Uccella, N.; Bonina, F.; Castelli, F., "*In vitro* evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol", *International Journal of Pharmaceutics*, V. 166, (1998), 123-133.
- [248] Costa, S.C.; Detoni, C.B.; Branco, C.R.; Botura, M.B.; Branco, A., "*In vitro* photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 25, (2015), 413-418.
- [249] de Oliveira Jr, R.G.; Souza, G.R.; Guimarães, A.L.; de Oliveira, A.P.; Morais, A.C.S.; da Cruz Araújo, E.C.; Nunes, X.P.; da Silva Almeida, J.R.G., "*Dried extracts of Encholirium spectabile (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro*", *Journal of Young Pharmacists*, V. 5, (2013), 102-105.
- [250] Macedo, S.K.S.; Almeida, T.d.S.; Ferraz, C.A.A.; Oliveira, A.P.; Siqueira, F.J.A.; Arajo, E.C.d.C.; Almeida, J.R.G.d.S.; Silva, N.D.S.; Nunes, X.P., "*Identification of flavonol glycosides and in vitro photoprotective and antioxidant activities of Triplaris gardneriana Wedd*", *Journal of Medicinal Plants Research*, V. 9, (2015), 207-215.
- [251] Saewan, N.; Jimtaisong, A., "*Photoprotection of natural flavonoids*", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, V. 3, (2013), 129-141.
- [252] Silva, E.; Alencar-Filho, J.; Oliveira, A.; Guimaraes, A.; Siqueira-Filho, J.; Almeida, J.; Araujo, E., "*Identification of glycosil flavones and determination in vitro of antioxidant and photoprotective activities of Alternanthera* ", *Research Journal of Phytochemistry*, V. 8, (2014), 148-154.
- [253] Rodrigues, F.; Pimentel, F.B.; Oliveira, M.B.P., "*Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry*", *Industrial Crops and Products*, V. 70, (2015), 116-124.
- [254] Bharadvaja, N.; Gautam, S.; Singh, H., "*Natural polyphenols: a promising bioactive compounds for skin care and cosmetics*", *Molecular Biology Reports*, V. 50, (2023), 1817-1828.
- [255] Aguilera-Carbo, A.; Hernández, J.S.; Augur, C.; Prado-Barragan, L.A.; Favela-Torres, E.; Aguilar, C.N., "*Ellagic acid production from biodegradation of creosote bush ellagitannins by Aspergillus niger in solid state culture*", *Food and Bioprocess Technology*, V. 2, (2009), 208-212.

- [256] Lei, Z.; Jervis, J.; Helm, R.F., "Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic acid contents of wood and food products", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 49, (2001), 1165-1168.
- [257] Wilson, T.C.; Hagerman, A.E., "Quantitative determination of ellagic acid", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 38, (1990), 1678-1683.
- [258] Capote, F.P.; Jiménez, J.R.; De Castro, M.L., "Sequential (step-by-step) detection, identification and quantitation of extra virgin olive oil adulteration by chemometric treatment of chromatographic profiles", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, V. 388, (2007), 1859-1865.
- [259] Hayat, K.; Zhang, X.; Farooq, U.; Abbas, S.; Xia, S.; Jia, C.; Zhong, F.; Zhang, J., "Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace", *Food chemistry*, V. 123, (2010), 423-429.
- [260] Setianto, W.; Yoshikawa, S.; Smith Jr, R.; Inomata, H.; Florusse, L.; Peters, C., "Pressure profile separation of phenolic liquid compounds from cashew (*Anacardium occidentale*) shell with supercritical carbon dioxide and aspects of its phase equilibria", *The Journal of Supercritical Fluids*, V. 48, (2009), 203-210.
- [261] Martins, S.; Mussatto, S.I.; Martínez-Avila, G.; Montañez-Saenz, J.; Aguilar, C.N.; Teixeira, J.A., "Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review", *Biotechnology advances*, V. 29, (2011), 365-373.
- [262] Puri, M.; Sharma, D.; Barrow, C.J., "Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants", *Trends in biotechnology*, V. 30, (2012), 37-44.
- [263] Beichi, M.; Saidani, F.; Mechri, S.; Jaouadi, B.; El-Hattab, M.; Badis, A., "Isolation and characterization of actinobacteria from two marine algae *Asparagopsis armata* and *Zonaria tournefortii* with biotechnological interest", *AgroBiologia*, V. 11, (2021), 2600-2608
- [264] Saidani, F.; Beichi, M.; Ferradji, F.-Z.; El-Hattab, M.; Badis, A., "Inventory for biologically-actives substances (antimicrobial, proteolytic, hemolytic, and biosurfactants) of marine bacteria isolated from the red algae *Asparagopsis armata*", *AgroBiologia*, V. 11, (2021), 2801-2809.
- [265] Herrmann, K.M.; Weaver, L.M., "The shikimate pathway", *Annual review of plant biology*, V. 50, (1999), 473-503.

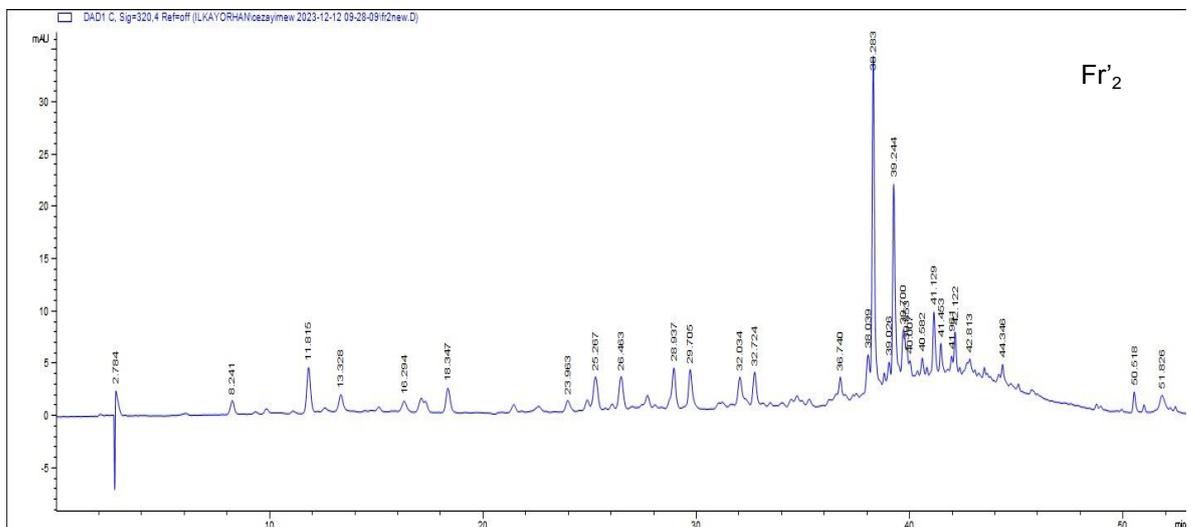
- [266] Huccetogullari, D.; Luo, Z.W.; Lee, S.Y., "*Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds*", *Microbial Cell Factories*, V. 18, (2019), 1-29.
- [267] Koma, D.; Yamanaka, H.; Moriyoshi, K.; Ohmoto, T.; Sakai, K., "*Production of aromatic compounds by metabolically engineered Escherichia coli with an expanded shikimate pathway*", *Applied and Environmental Microbiology*, V. 78, (2012), 6203-6216.
- [268] Qualley, A.V.; Widhalm, J.R.; Adebessin, F.; Kish, C.M.; Dudareva, N., "*Completion of the core  $\beta$ -oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, V. 109, (2012), 16383-16388.
- [269] Lucas, R.; Comelles, F.; Alcántara, D.; Maldonado, O.S.; Curcuroze, M.; Parra, J.L.; Morales, J.C., "*Surface-active properties of lipophilic antioxidants tyrosol and hydroxytyrosol fatty acid esters: A potential explanation for the nonlinear hypothesis of the antioxidant activity in oil-in-water emulsions*", *Journal of agricultural and food chemistry*, V. 58, (2010), 8021-8026.
- [270] Yamada, K.; Ogawa, H.; Hara, A.; Yoshida, Y.; Yonezawa, Y.; Karibe, K.; Nghia, V.B.; Yoshimura, H.; Yamamoto, Y.; Yamada, M., "*Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus*", *Antiviral research*, V. 83, (2009), 35-44.
- [271] Vivancos, M.; Moreno, J.J., "*Effect of resveratrol, tyrosol and  $\beta$ -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages*", *British Journal of Nutrition*, V. 99, (2008), 1199-1207.
- [272] Karković Marković, A.; Torić, J.; Barbarić, M.; Jakobušić Brala, C., "*Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health*", *Molecules*, V. 24, (2019), 2001.
- [273] Tofani, D.; Balducci, V.; Gasperi, T.; Incerpi, S.; Gambacorta, A., "*Fatty acid hydroxytyrosyl esters: structure/antioxidant activity relationship by ABTS and in cell-culture DCF assays*", *Journal of agricultural and food chemistry*, V. 58, (2010), 5292-5299.
- [274] Sun, Y.; Zhou, D.; Shahidi, F., "*Antioxidant properties of tyrosol and hydroxytyrosol saturated fatty acid esters*", *Food Chemistry*, V. 245, (2018), 1262-1268.

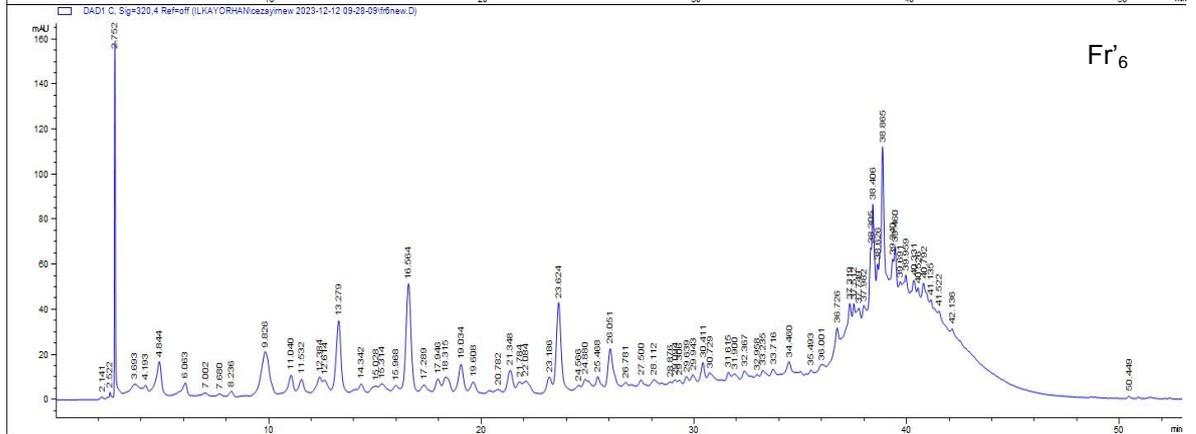
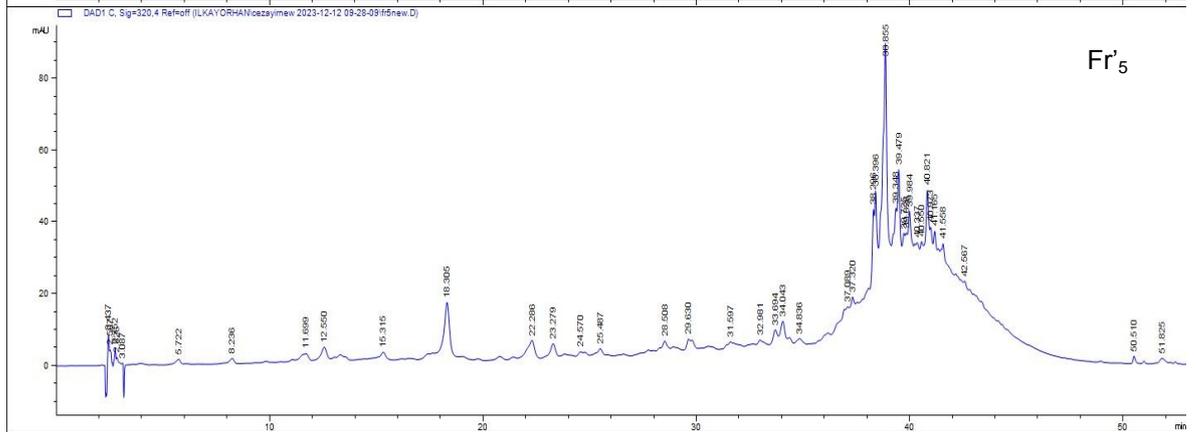
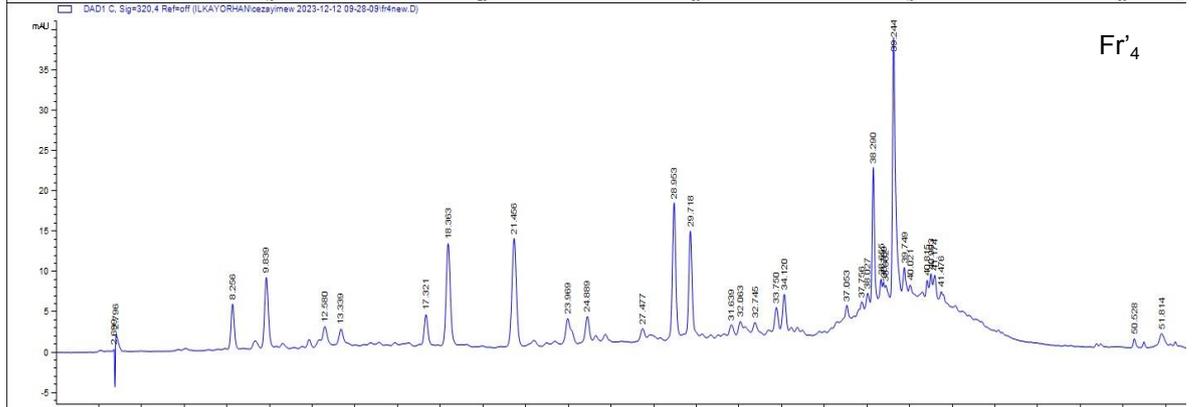
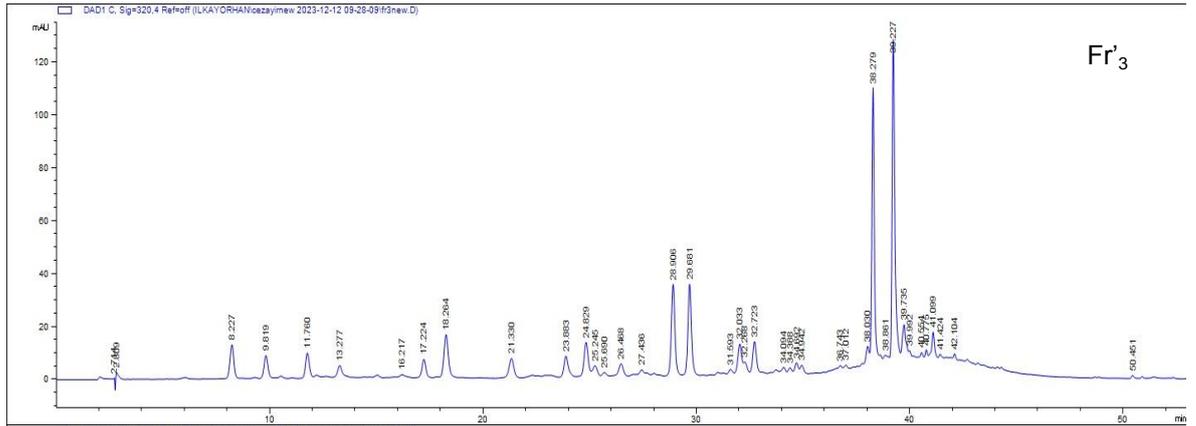
- [275] Vlachogianni, I.C.; Fragopoulou, E.; Kostakis, I.K.; Antonopoulou, S., "*In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives*", Food chemistry, V. 177, (2015), 165-173.
- [276] Aissa, I.; Sghair, R.M.; Bouaziz, M.; Laouini, D.; Sayadi, S.; Gargouri, Y., "*Synthesis of lipophilic tyrosyl esters derivatives and assessment of their antimicrobial and antileishmania activities*", Lipids in Health and Disease, V. 11, (2012), 1-8.
- [277] Ahn, E.-Y.; Jiang, Y.; Zhang, Y.; Son, E.M.; You, S.; Kang, S.-W.; Park, J.-S.; Jung, J.H.; Lee, B.-J.; Kim, D.-K., "*Cytotoxicity of p-tyrosol and its derivatives may correlate with the inhibition of DNA replication initiation*", Oncology Reports, V. 19, (2008), 527-534.
- [278] Fragopoulou, E.; Nomikos, T.; Karantonis, H.C.; Apostolakis, C.; Pliakis, E.; Samiotaki, M.; Panayotou, G.; Antonopoulou, S., "*Biological activity of acetylated phenolic compounds*", Journal of agricultural and food chemistry, V. 55, (2007), 80-89.
- [279] Crawford, D.L., "*Lignocellulose decomposition by selected Streptomyces strains*", Applied and Environmental Microbiology, V. 35, (1978), 1041-1045.
- [280] Li, N.; Su, J.; Wang, H.; Cavaco-Paulo, A., "*Production of antimicrobial powders of guaiacol oligomers by a laccase-catalyzed synthesis reaction*", Process Biochemistry, V. 111, (2021), 213-220.
- [281] Liu, H.; Lepoittevin, B.; Roddier, C.; Guerineau, V.; Bech, L.; Herry, J.-M.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Roger, P., "*Facile synthesis and promising antibacterial properties of a new guaiacol-based polymer*", Polymer, V. 52, (2011), 1908-1916.

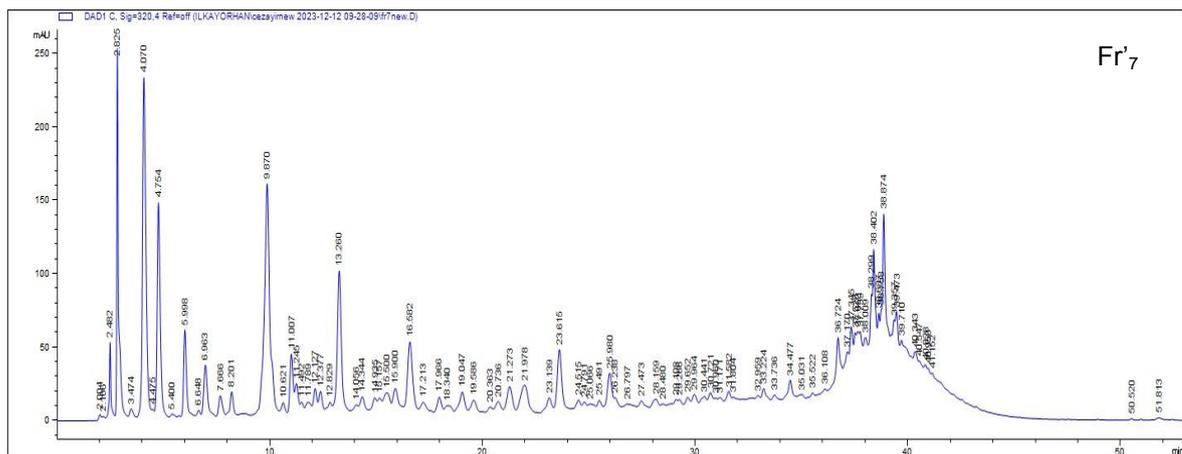
### APPENDICE A Profils chromatographiques



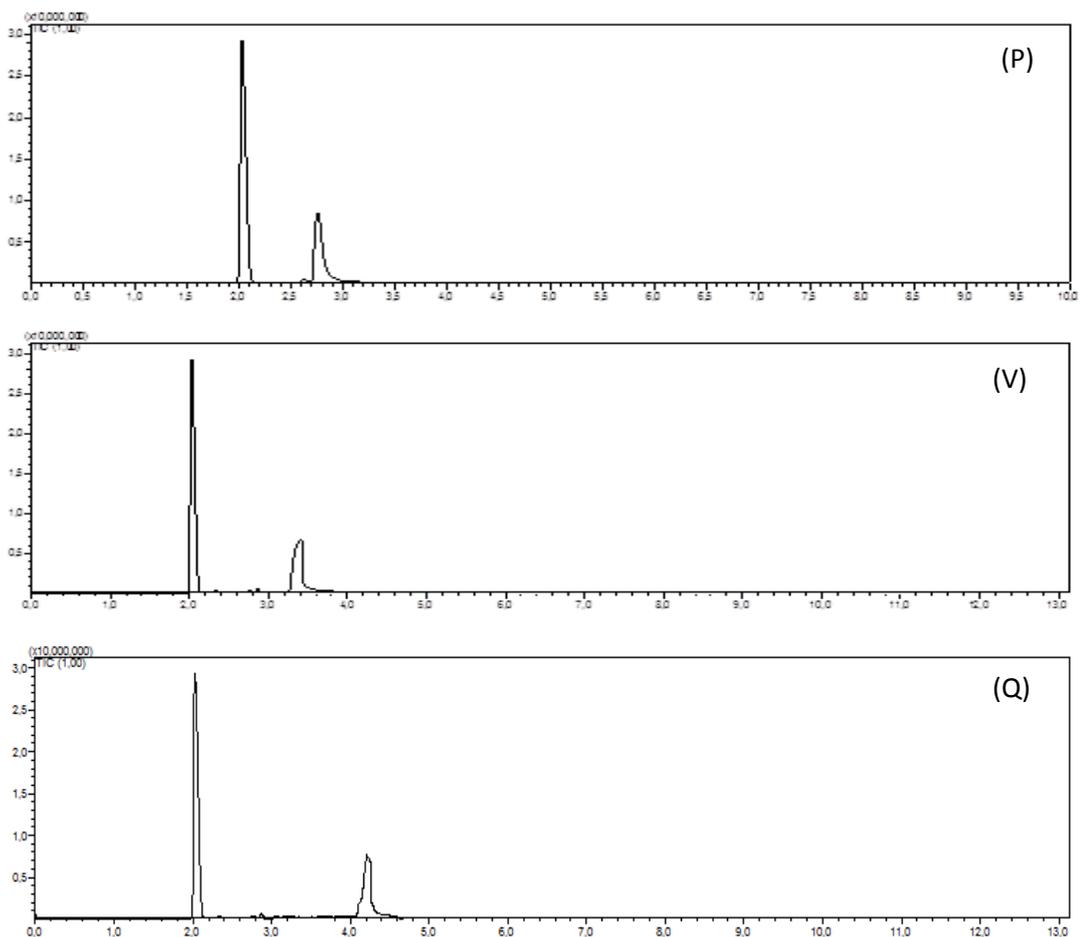
**Appendice A 1 : Profils chromatographiques CG/SM de l'HE et de la FV de margine**



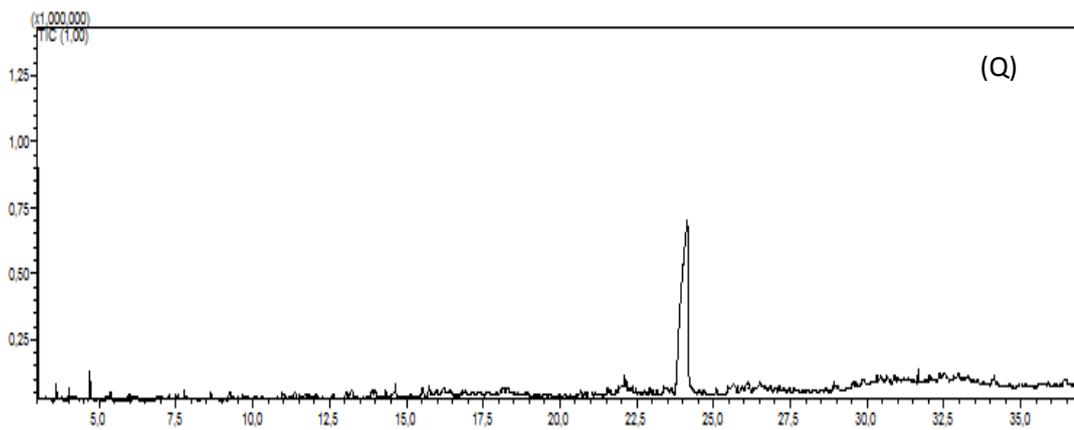
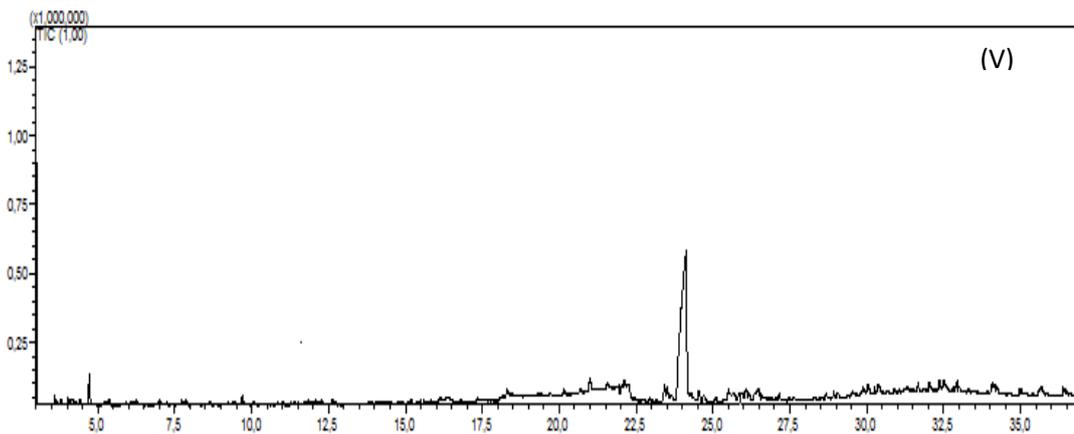
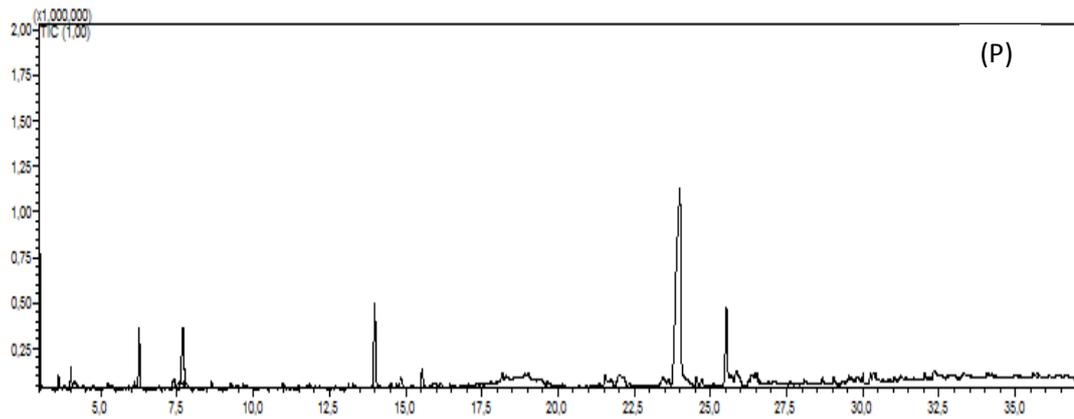




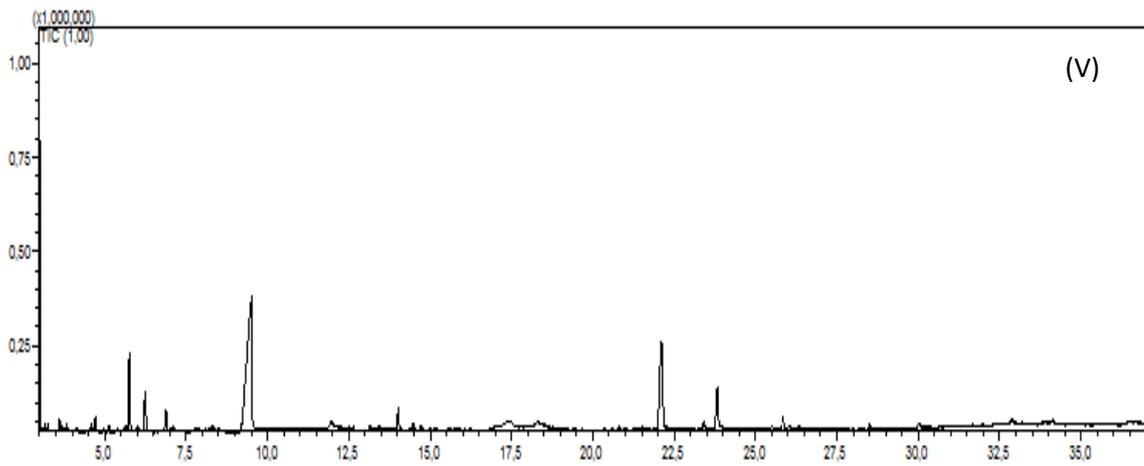
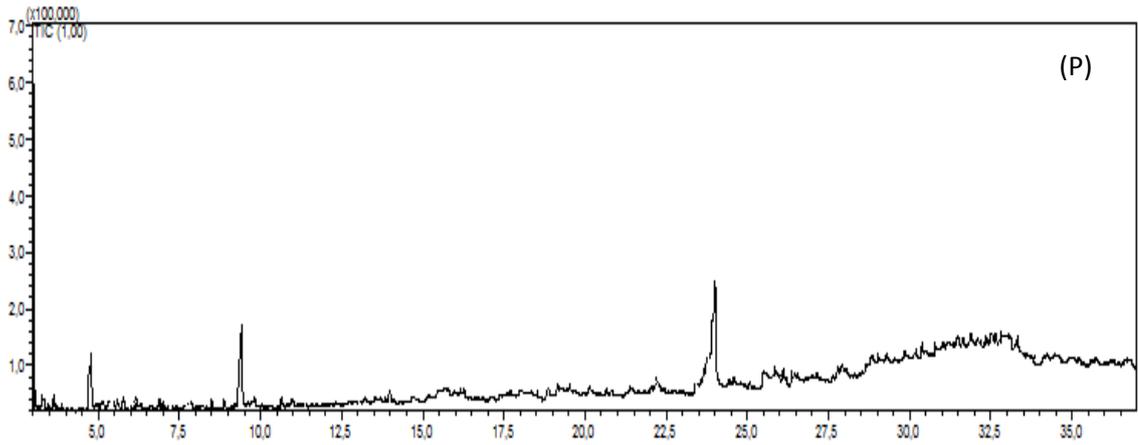
**Appendice A 2 : Profils chromatographiques HPLC des fractions de margine**



**Appendice A 3 : Profils chromatographiques CG/SM des acides phénoliques (P) : Acide pyrogallique, (V) : Acide vanillique, (Q) : Acide quinique**



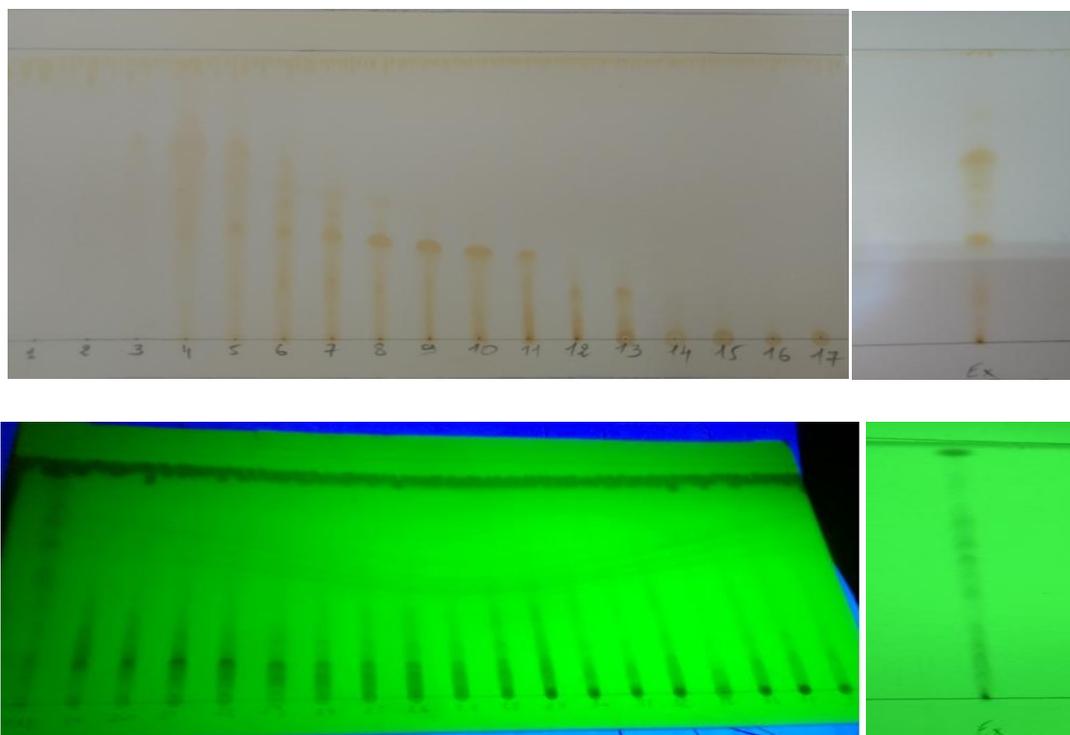
**Appendice A 4 :** Profils chromatographiques CG/SM de la bioconversion des 3 acides phénoliques par la souche 3R



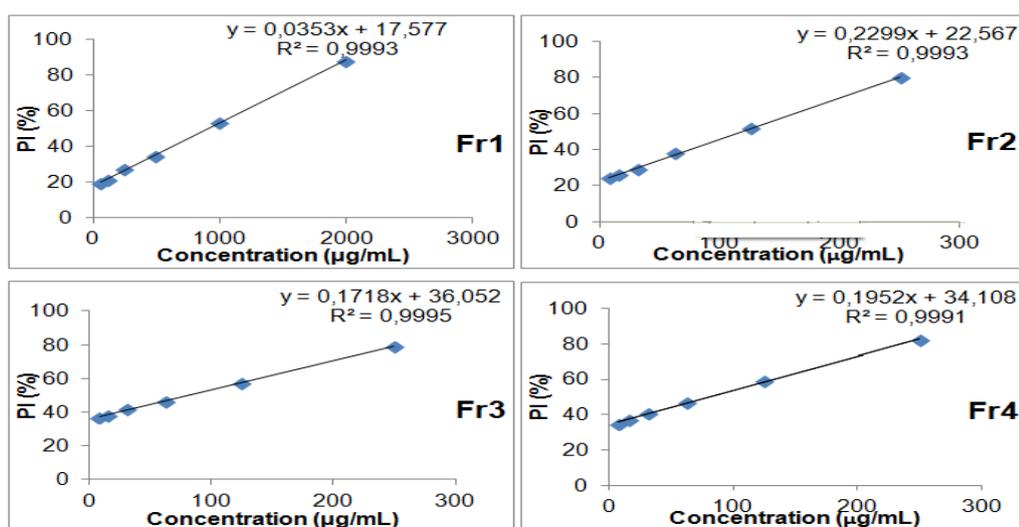
**Appendice A 5 :** Profils chromatographiques CG/SM de la bioconversion des 2 acides phénoliques par la souche AZ3

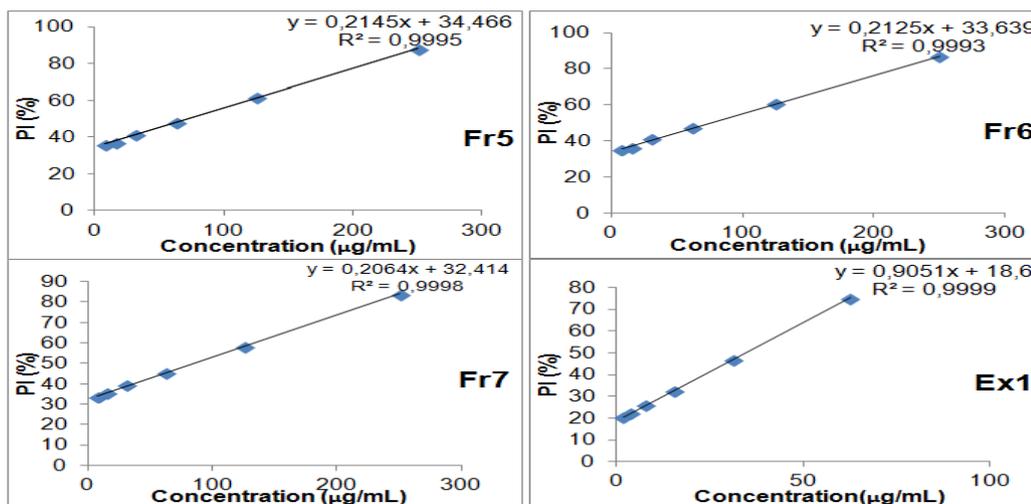
## Appendice B

### Analyse phytochimique et activités biologiques des différents échantillons testés

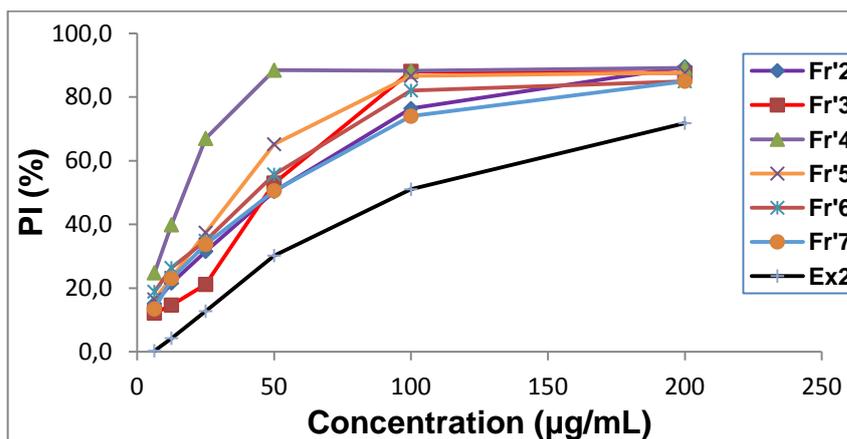


#### Appendice B 1 : Révélation des plaques CCM des extraits de margine et de leurs fractions





**Appendice B 2 :** Variations des PI (%) de l'Ex<sub>1</sub> de margine et ses fractions en fonction de concentration par la méthode de DPPH



**Appendice B 3 :** Variations des PI (%) de l'Ex<sub>2</sub> de margine et ses fractions en fonction de concentration par la méthode de DPPH

**Appendice B 4 :** Valeurs des absorbances [290-320 nm] des Fr [3-7] à différentes concentrations

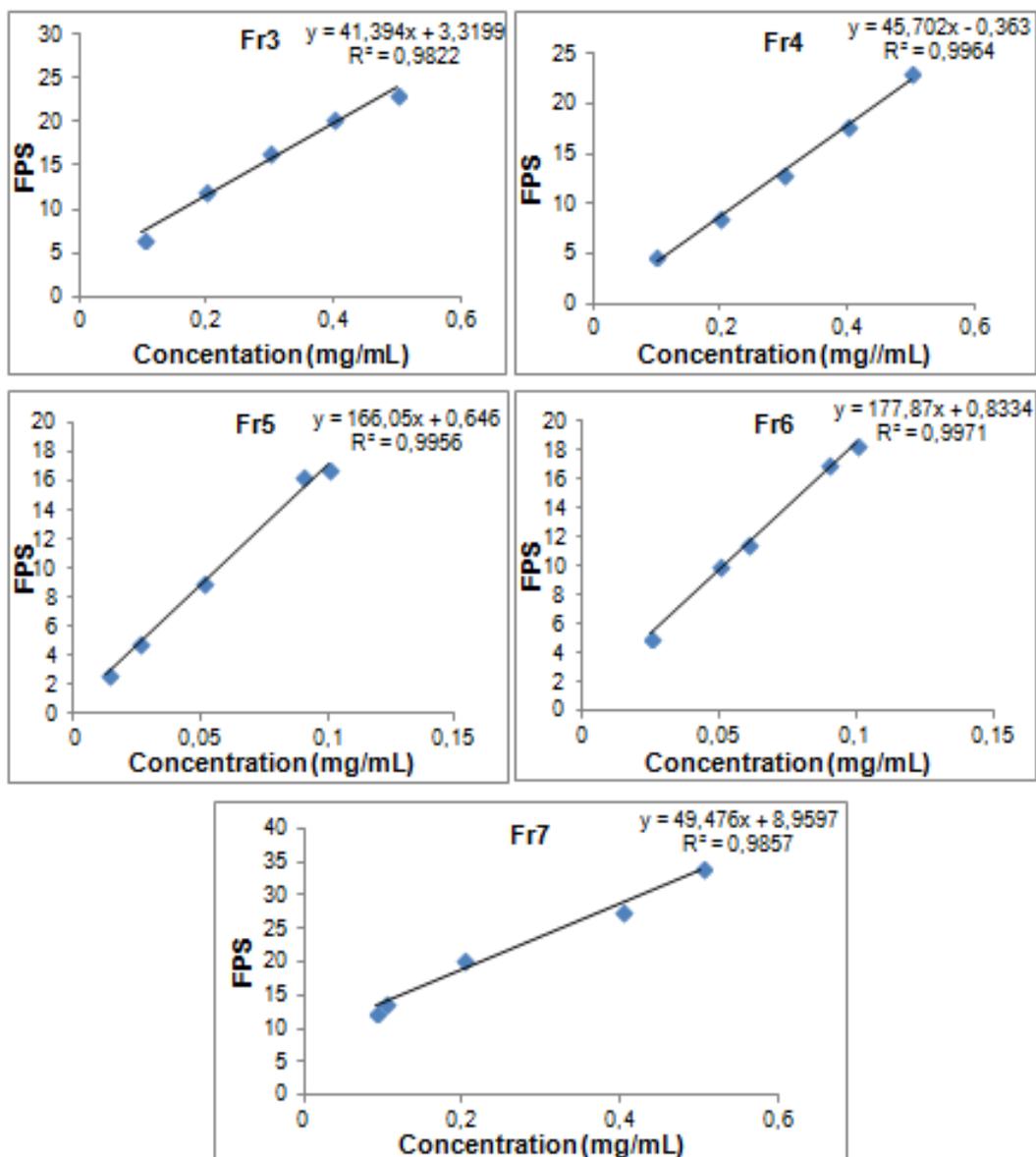
Fr <sub>3</sub>	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
290	2,512	2,471	2,26	1,848	1,115
295	2,413	2,262	1,959	1,461	0,818
300	2,371	2,085	1,713	1,241	0,675
305	2,273	2,025	1,586	1,143	0,619
310	2,189	1,944	1,561	1,118	0,602
315	2,291	1,973	1,594	1,131	0,612
320	2,251	1,991	1,631	1,164	0,632

<b>Fr<sub>4</sub></b>	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
290	3,406	2,37	1,768	1,153	0,643
295	2,671	2,015	1,495	1,01	0,554
300	2,572	1,953	1,38	0,895	0,499
305	2,123	1,687	1,252	0,826	0,454
310	2,103	1,651	1,156	0,788	0,429
315	1,92	1,515	1,124	0,748	0,415
320	1,861	1,557	1,115	0,736	0,406

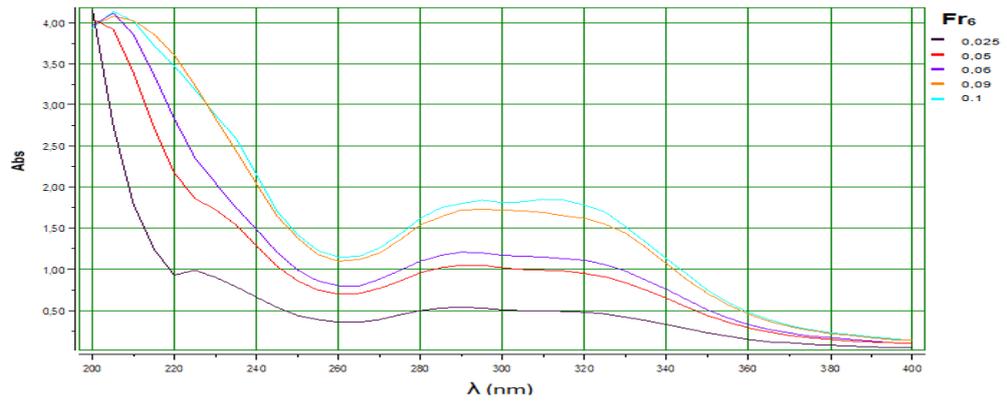
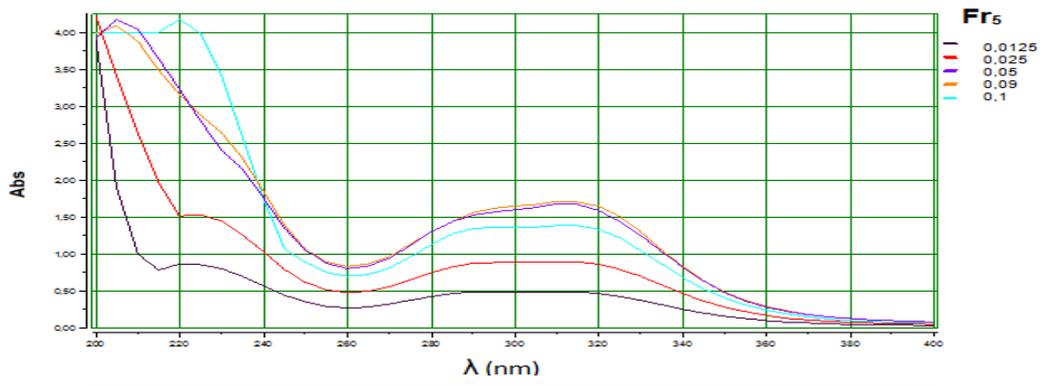
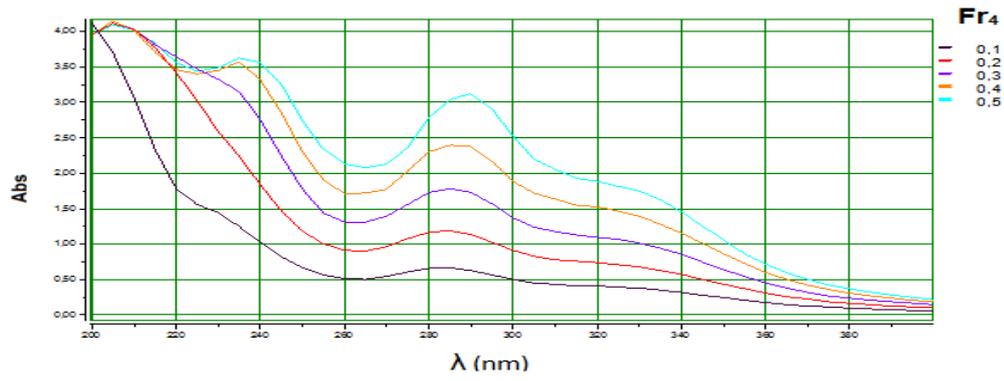
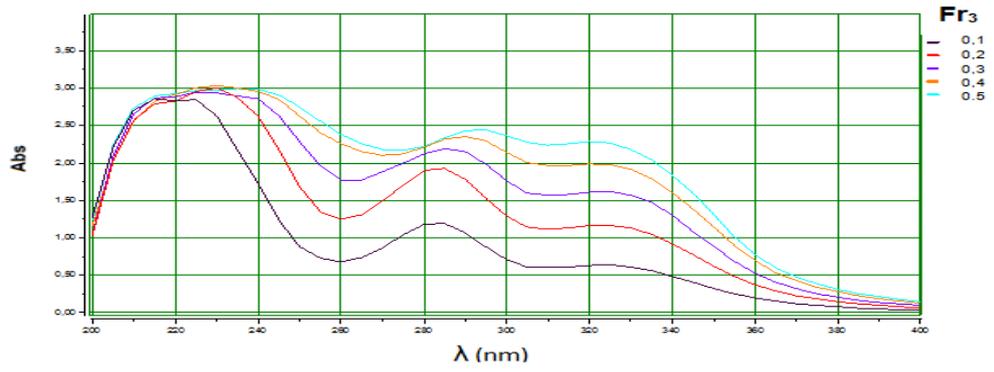
<b>Fr<sub>5</sub></b>	0,1	0,09	0,05	0,025	0,0125
290	1,567	1,593	0,878	0,491	0,267
295	1,581	1,523	0,873	0,486	0,265
300	1,699	1,597	0,895	0,487	0,264
305	1,646	1,611	0,881	0,483	0,26
310	1,692	1,716	0,901	0,488	0,264
315	1,704	1,655	0,9	0,488	0,263
320	1,71	1,617	0,877	0,472	0,253

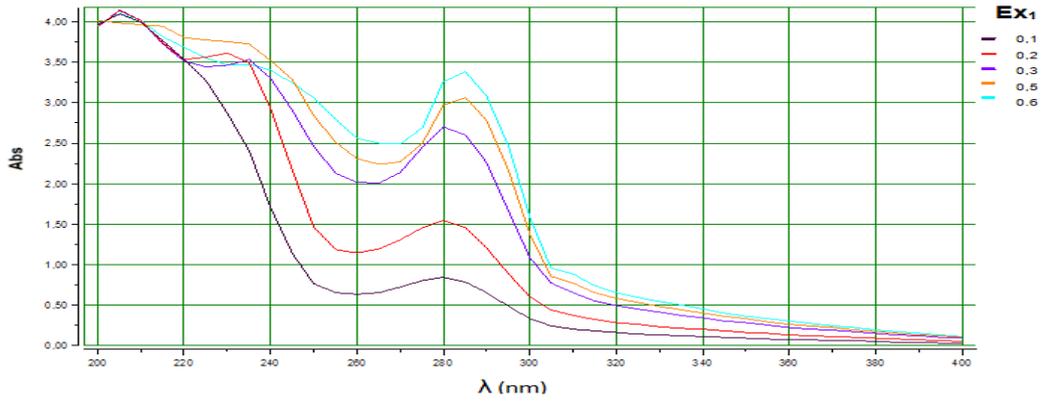
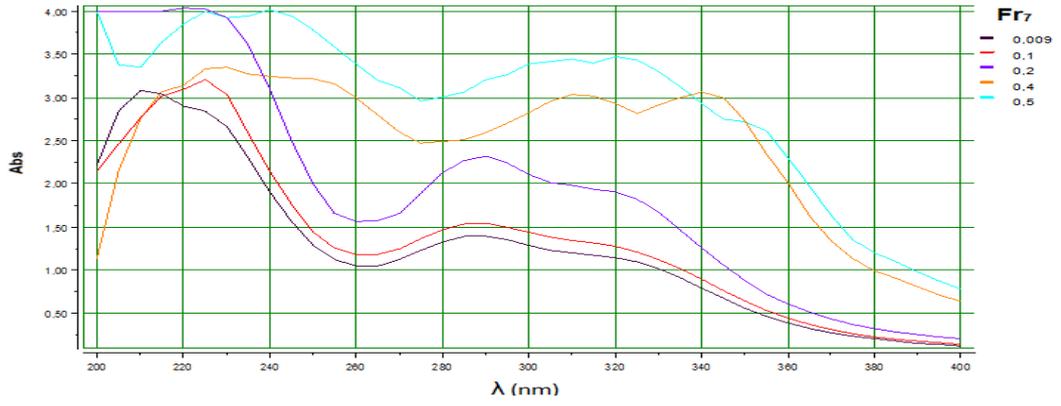
<b>Fr<sub>6</sub></b>	0,1	0,09	0,06	0,05	0,025
290	1,883	1,721	1,204	1,069	0,543
295	1,741	1,662	1,2	1,042	0,522
300	1,814	1,781	1,173	1,019	0,513
305	1,884	1,68	1,139	0,989	0,495
310	1,759	1,714	1,141	0,991	0,494
315	1,887	1,629	1,145	0,988	0,485
320	1,795	1,614	1,112	0,947	0,484

<b>Fr<sub>7</sub></b>	0,5	0,4	0,2	0,1	0,09
290	3,315	2,615	2,326	1,565	1,413
295	3,181	2,659	2,121	1,487	1,337
300	3,45	2,812	2,147	1,441	1,284
305	3,323	2,991	2,044	1,36	1,229
310	3,578	3,042	1,946	1,351	1,191
315	3,371	3,05	1,885	1,326	1,175
320	3,323	2,905	1,973	1,268	1,142

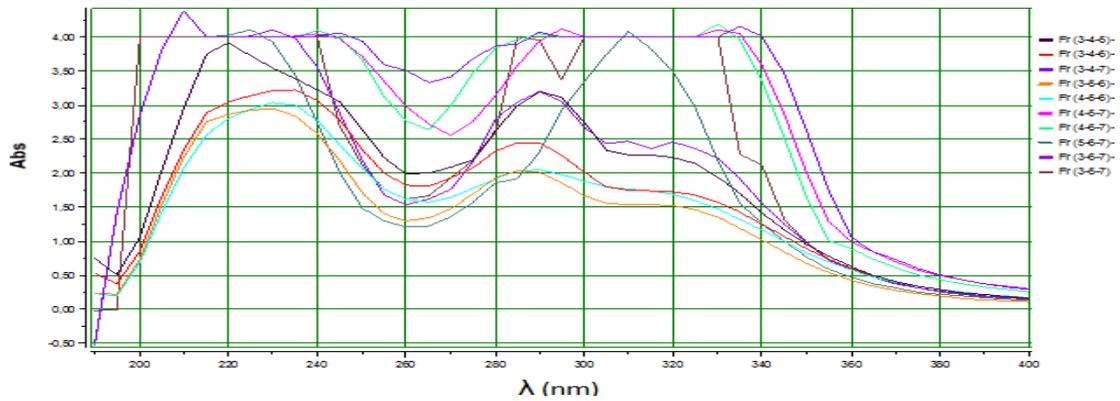
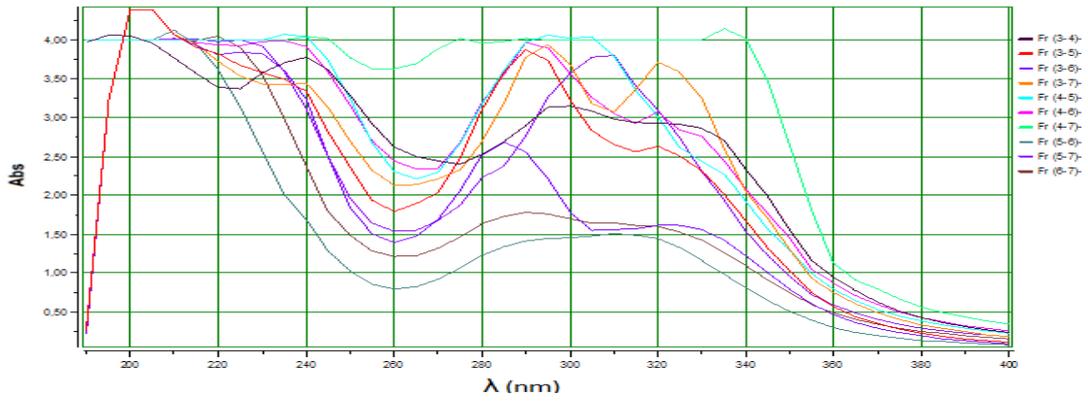


**Appendice B 5 :** Courbes de variation du FPS des Fr [3-7] en fonction de concentration





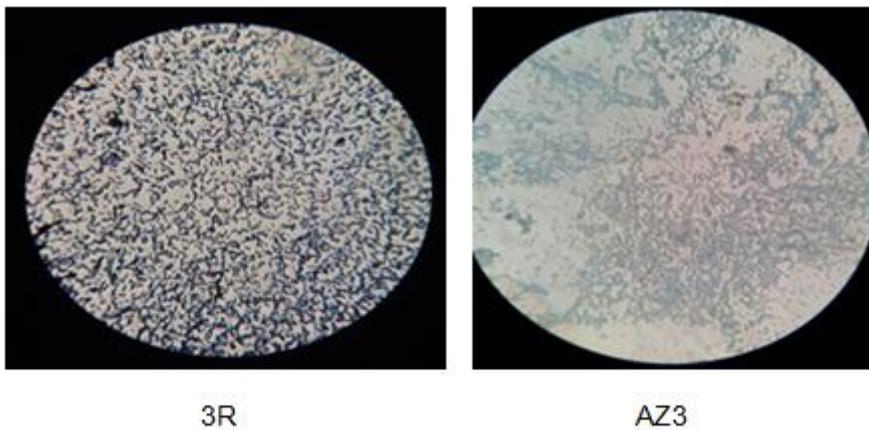
**Appendice B 6 : Spectres UV de l'EX<sub>1</sub> et de ses fractions [3-7] à différentes concentrations**



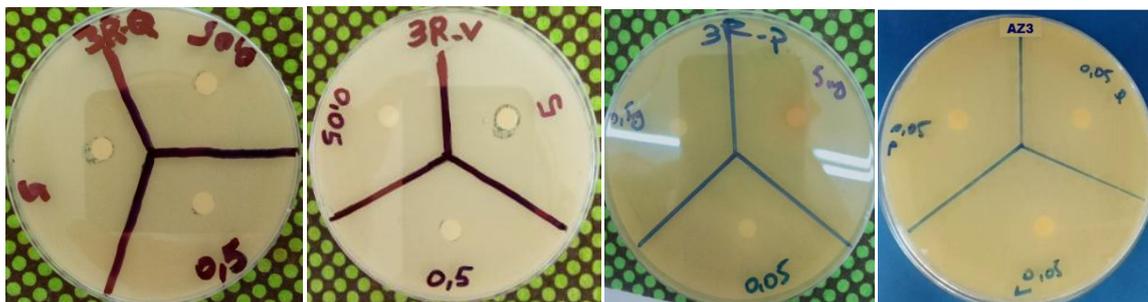
**Appendice B 7 : Spectres UV des combinaisons de fractions [3-7] à deux et à trois**

## Appendice C

### Bioconversion des composés phénoliques



Appendice C 1 : souches 3R et AZ3 sous microscope



Appendice C 2 : Sensibilité des acides phénoliques aux souches 3R et AZ3

