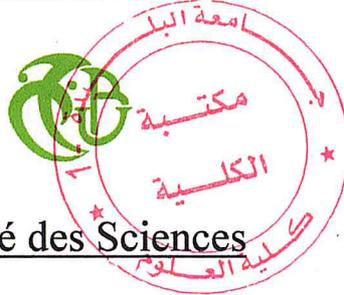


Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

Alaouache islam

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine Science de la matière
Filière Chimie
Option Chimie des substances naturelles

Titre

Etudes physico-chimique, extraction et analyse de l'extraits des margines

Soutenu en septembre 2014, devant le jury composé de :

Z. Daghbouche	Pr.	Présidente	Université de Blida 1
K. Boutemak	MCB	Examinatrice	Université de Blida 1
M. El hattab	Pr	Promoteur	Université de Blida 1
A. BADIS	Pr	Co-promoteur	Université de Blida 1

Dédicace

Je dédie ce travail à :

*Mes chères parents qui m'ont toujours soutenus et encouragé. que Dieu, le tout puissant,
leur préserve et accorde santé, longue vie et bonheur.*

A ma très chère sœur .

A mes très chères frères : Yacine et Riadh

*A mes très chères amis et mes collègues de laboratoire que j'ai vécu avec eux des beaux
moments au cours de mon cursus à l'université.*

A tous qui me connaisse de prés ou de loin.

Remerciement

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

*Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.*

*-J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Monsieur **EL HATTAB MOHAMED**, professeur au département de chimie, université de Blida, de m'avoir encadrer. Je vous dois le meilleur accueil que vous m'avez réservé, et la mise à ma disposition de tous les moyens pour me permettre de réaliser mon mémoire dans les meilleures conditions. Vous m'avez tant aidé et supporté au moment où j'en avais le plus besoin.*

*- Je remercie monsieur **A. BADIS** professeur à l'université de Blida pour mon pour son aide et ses conseils, et de m'avoir accueillir dans son laboratoire.*

*Je remercie monsieur **A. SAIBA** docteur à l'université de Medea pour l'énorme aide qu'il m'a apportée.*

- -J'adresse mes profonds remerciements au l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail et d'avoir assisté à ma soutenance.

*-Je remercie madame **S. KASMI** docteur à l'université de Blida et responsable de master de chimie des substances naturels pour sa gentillesse, sa compréhension et pour son aide dans tous les moments ou j'en avais besoin.*

Résumé

Notre travail porte sur l'étude Physico-chimique et l'activité antioxydante des polyphénols extraites à partir des margines d'une huilière dans la wilaya de Chlef.

Dans cette étude, ces polyphénols ont été extraits afin de les valoriser en tant qu'antioxydants naturels. Le test de piégeage de radical libre DPPH a été réalisé et comparé avec celui de l'antioxydant synthétique l'acide ascorbique (la vitamine C).

L'analyse par Chromatographie en phase liquide a haute performance nous a montré que l'extrait de margine contient des composés polaires. Alors que L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de l'extrait de margine nous a montré que ces composés sont principalement des composés phénoliques tels que l'Eucalyptol et le 1,2-Benzendiol.

Mots clé : Margines, extrait, polyphénols, activité antioxydante, CG-MS, CLHP.

Abstract

Our work concerns the Physico-chemical study and the antioxidant activity of polyphénols extracted from olive mill wastewater in the wilaya of Chlef.

In this study, these polyphenols were extracted to value them as ' natural antioxidants. The test of trapping of free radical DPPH was realized and compared with that of the synthetic antioxidant the ascorbic acid (the vitamin C).

The analysis by liquid Chromatography high performance showed us that the extract of margine contains polar compounds. While The analysis by the gas chromatography coupled with the mass spectrometry of the extract of margine showed us that these compounds are mainly phenolic compounds such as Eucalyptol and 1,2-Benzendiol.

Keywords: Olive mill wastewater, extract, polyphénols, activity antioxidant GC-MS, CLHP.

Table des matières

Dédicaces	i
Remerciement	ii
Résumé	iii
Abstract	iv
ملخص	v
Table des matières	vi
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Introduction générale	1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Introduction	4
I.2 Situation oléicole mondiale	4
I.3 Secteur oléicole en Algérie	5
I.4 Système d'extraction de l'huile d'olive	5
I.5 Sous produits de l'oléiculture	6
I.6 Les margines.....	8
I.6.1 Définition.....	8
I.6.2 Origine des margines.....	8
I.6.3 Estimation du débit des margines.....	8
I.6.4 Origine de la coloration.....	8
I.6.5 Caractérisation physico-chimique des margines	9
I.6.5.1 pH, conductivité et matière sèche des margines.....	10
I.6.5.2 Fraction minérale	11
I.6.5.3 Fraction organique.....	11
a. Sucres	11
b. Composés azotés	11
c. Vitamines	11
d. Acides organiques	12
e. Huiles	12
f. Composés phénoliques	12
I.7 Principales classes des composés phénoliques	14
I.7.1 Acides phénoliques simples	14
a. Acides hydroxybenzoïques	14
b. Acides hydroxycinnamiques	14
I.7.2 Les polymères phénoliques	15
I.7.3 Intérêt biologique des composés phénoliques	15
I.8 Toxicité des margines	16

I.9 Antioxydants et radicaux libres.....	16
I.9.1 Radicaux libres	16
I.9.1.1 Définition	16
I.9.1.2 Nature des radicaux libres	17
a. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)	17
b. Espèces libres non oxygénées	17
I.9.2 Antioxydants	18
I.9.2.1 Définition	18
I.9.2.2 Utilisation des antioxydants	18
I.9.2.3 Classification des antioxydants	18
a. Antioxydants de synthèses	18
b. Antioxydants d'origine végétale	18
I.10 intérêts biologiques des produits dérivants des margines	19

Chapitre II : Etude expérimental

II. Partie 1 : Matériels et méthodes

II.1.1 Introduction	22
II.1.2 origine des margines	22
II.1.3 Extraction des polyphénols de margines	23
II.1.3.1 Extraction des lipides	23
II.1.3.2 Extraction des composés phénoliques avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme	23
II.1.3.3 Rendement en extrait	24
II.1.4 Dosage des polyphénols totaux	25
II.1.4.1 Principe	25
II.1.4.2 Mode opératoire	25
II.1.5 Etude physico-chimique des margines	26
II.1.5.1 Détermination des paramètres organiques	27
II.1.5.1.1 Acidité (pH)	27
II.1.5.1.2 Matières en suspension (MES)	27
II.1.5.1.3 Matière sèche (MS)	27
II.1.5.1.4 Matières minérale et volatile	28
II.1.5.1.5 Turbidité	28
II.1.5.1.6 Demande chimique en oxygène (DCO)	28
II.1.5.1.7 Demande biochimique en oxygène	29
II.1.5.1.8 Sucres totaux	29
II.1.5.1.9 Matière grasse.....	30
II.1.5.2 Détermination des paramètres minéraux.....	30
II.1.5.2.1 Conductivité	30
II.1.5.2.2 Calcium et magnésium	30

II. 1.5. 2. 3 Chlorure	31
II. 1.5. 2. 4 Orthophosphates	31
II. 1.5. 2. 5 Azote total	31
II. 1.5. 2. 6 Ions ammoniums	32
II. 1.6 Analyse de l'extrait de margine par CG/SM	32
II. 1.7 Analyse de l'extrait acétate par chromatographie liquide couplée à la détection UV-Visible à barrettes de diodes (CLHP/DAD-UV).....	32
II.1.8 Etude cinétique de biodégradation des phénols dans les margines	33
II.1.9 Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques	33
II.1.9.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1 picrylhydrazyl)	33
II.1.9.2 Détermination du pouvoir antioxydant	35

II. Partie 2 : résultats et discussions

II.2.1 Analyse Physico-chimique	36
II.2.1.1 Acidité de margine (pH).....	36
II.2.1.2 Matières en suspension (MES)	36
II.2.1.3 Matière sèche (MS) matière volatile (MV) et matières volatiles en suspensions (MVS)	36
II.2.1.4 Turbidité	36
II.2.1.5 DCO et DBO5	36
II.2.1.6 Sucres totaux	37
II.2.1.7 Matière grasse	37
II.2.1.8 Conductivité	37
II.2.1.9 Teneur en calcium, et en magnésium.....	38
II.2.1.10 Teneur en Chlorures	38
II.2.1.11 Teneur en Orthophosphates et en azote total	38
II.2.1.12 Teneur en ions ammoniums	39
II.2.2 Rendement de l'extrait de margines	39
II.2.3 Dosage des polyphénols totaux	40
II.2.4 Etude cinétique de biodégradation des composés phénoliques	40
II.2.5 Analyse de l'extrait de margine par CG/SM	42
II.2.6 Analyse de l'extrait acétate par chromatographie liquide couplée à la détection UV-Visible à barrettes de diodes (CLHP/DAD-UV).....	44
II.2.7 Evaluation de l'activité antioxydant	45
II.2.8 détermination de la valeur EC50	48
Conclusion.....	49

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 1 : Processus d'extraction de l'huile d'olive.....	7
Figure 2 : Echantillon de margine provenant d'une huilière de Chlef.....	23
Figure 3 : Les différentes étapes appliquées pour l'extraction liquide-liquide de l'extrait de margine.....	24
Figure 4 : Organigramme de l'extraction et du dosage des polyphénols totaux.....	26
Figure 5 : Structure chimique du radical libre DPPH.....	34
Figure 6 : Mesure de l'absorbance par rapport a la concentration de D-Glucose.....	37
Figure 7 : Mesure de l'absorbance par rapport a la concentration du nitrates.....	38
Figure 8 : Mesure de l'absorbance par rapport a la concentration du Phosphate.....	38
Figure 9 : Mesure de l'absorbance par rapport a la concentration d'ions ammonium.....	39
Figure 10 : Mesure de l'absorbance par rapport a la concentration de Phloroglucinol.....	40
Figure 11 : Cinétique de dégradation des composés phénoliques avant l'ajout de jus de betterave.....	41
Figure 12 : Cinétique de dégradation des composés phénoliques après l'ajout de jus de betterave.....	41
Figure 13 : Chromatogramme CG/SM de L'extrait acétate d'éthyle	42
Figure 14 : Chromatogramme CLHP de l'extrait Acétate à 220 nm	44
Figure 15 : Chromatogramme CLHP de l'extrait Acétate à 280 nm	45
Figure 16 : Forme libre et réduite du DPPH.....	46
Figure 17 :Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait de margine en fonction des différentes concentrations	47
Figure 18 : Variation du taux de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre d'oliviers et les superficies occupées par les oliveraies dans les six principaux pays méditerranéens oléicoles.....	4
Tableau 2 : Structure des monomères phénoliques rencontrés dans les margines.....	13
Tableau 3 : Les principaux acides hydroxybenzoïques.....	14
Tableau 4 : Les principaux acides hydroxycinnamiques.....	15
Tableau 5 : Activités biologiques des composés polyphénols.....	15
Tableau 6 : Programme gradient d'analyse par CLHP.....	33
Tableau 7 : Principaux composés identifiés par CG/SM dans l'extrait obtenu par AcOEt...	43
Tableau 8 : Valeurs EC50 de l'extrait de margine et l'antioxydant standard.....	48

Liste des abréviations

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DBO : Demande Biochimique en Oxygène

PP : Polyphénols

ERO : Espèces réactives dérivées de l'oxygène

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

FCR : folin-ciocalteu

MgFp : Milligramme Equivalent de Phloroglucinol

µg: Microgramme

IC50 : Concentration inhibitrice de 50%

tr : Temps de rétention

MES : Matières en suspension

MS : Matière sèche

MV : Matières volatiles

MVS : Matières volatiles en suspensions

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CLHP/DAD-UV : Chromatographie liquide couplée à la détection UV-Visible à barrettes de diodes

INTRODUCTION GENERALE

L'industrie oléicole, fait partie de la vie des civilisations méditerranéennes depuis très longtemps. Elle a toujours répondu à de nombreux besoins essentiels du quotidiens avec notamment l'huile produite à partir des olives qui est l'une des huiles les plus prisées en raison de ses qualités nutritives.

Actuellement, la demande de l'huile d'olive ne cesse d'augmenter à cause de ses bienfaits sur la santé humaine. par conséquent, sa production augmente parallèlement [1]

au cours de périodes plus récentes, l'olivier a poursuivi son expansion au delà de la méditerranée, l'huile d'olive est la principale source de matières grasses du régime méditerranéen.

Si l'huile d'olive est un produit intéressant d'un point de vue nutritionnel, sa production enregistre des volumes importants de deux sous produits; l'un solide (les grignons) et l'autre liquide (les margines). Ces derniers posent de sérieux problèmes à l'environnement dans la plupart des pays oléicoles.

Les margines, rejets acides et polluants du fait de leur richesse en matières organiques posent de sérieux problèmes de contamination à l'environnement.

La problématique posée par les margines réside principalement dans leur teneur élevée en polyphénols (18- 125 mg/g) [2] dépassant même dix fois plus celle de la phase huileuse [3]. D'une part, ces composés difficilement biodégradables empêchent les cycles biologiques dans le sol et souillent les eaux naturelles [4].

Cependant, les polyphénols récupérés de ces rejets sont identifiés comme des antioxydants phénoliques naturels largement utilisés en agroalimentaire [5], ils sont connus par leur pouvoir de retarder la détérioration oxydative des lipides surtout des huiles végétales raffinées sensibles à l'oxydation [6].

les consommateurs ont une préférence pour tout ce qui est naturel [7] et rejettent tous les additifs alimentaires tel que les antioxydants synthétiques qui possèdent des effets toxiques et cancérigènes [8]. De ce fait l'utilisation des antioxydants naturels a connu un grand développement dans l'industrie agroalimentaire [9].

Il est clair qu'une tentative de débarrasser les margines des polyphénols aurait un double intérêt : d'une part, résoudre un problème environnemental majeur et d'une autre part, récupérer et valoriser les polyphénols pour des applications ultérieures en agroalimentaire ou en pharmacologie.

Notre objectif est de récupérer les composés phénoliques à partir des margines d'une usine de production d'huile d'olive, nous nous sommes intéressés à l'extraction des composés phénoliques, et à l'étude chimique et biologiques des extraits phénoliques pour une éventuelle application dans le secteur pharmaceutique et/ou agroalimentaire.

Le travail effectué comprend deux chapitres :

Chapitre I : synthèse bibliographique portant sur le secteur oléicole en Algérie, ainsi que sur le traitement des margines, les composés phénoliques, les antioxydants et les radicaux libres.

Chapitre II : étude expérimentale consacré à l'extraction, l'analyse, l'étude cinétique de dégradation des polyphénols et la détermination des tests antioxydants des polyphénols.

Chapitre I

Synthèse

Bibliographique

I.1 Introduction

La partie bibliographique est consacrée à un aperçu sur la situation oléicole mondiale et en Algérie, les systèmes d'extraction d'huile d'olive et les sous produits de l'oléiculture et des généralités sur les margines.

On adjoindra à ces généralités, des études portant sur la caractérisation physico-chimique des margines, sur les produits phénoliques et leur intérêts biologiques, ainsi que celles portant sur les antioxydants et les radicaux libres.

I.2 Situation oléicole mondiale

actuellement environ 930 millions oliviers représentent le patrimoine oléicole mondial[10]. 70% de ces arbres se trouvent en Europe méditerranéenne , 13% en proche orient , 13% en Afrique du nord , et 3% en Amérique [11].

La production d'Europe représente près de 75% de la production mondiale , l'Espagne et l'Italie sont les principaux producteur .

les principaux pays consommateurs sont également les principaux pays producteurs de cette huile, comme en méditerranée La culture des oliviers fait partie de la tradition des habitants , C'est un symbole de civilisation chez les méditerranéens et en même temps un délice nécessaire sur leurs tables.

les principaux pays méditerranéens producteurs de l'huile d'olive sont par ordre l'Espagne , l'Italie, la Grèce, la Turquie la Tunisie, le Maroc et l'Algérie.

le tableau 1 montre les différentes distributions des oliviers à travers ces pays

Tableau 1 : Nombre d'oliviers et les superficies occupées par les oliveraies dans les six principaux pays méditerranéens oléicoles [12]

Pays méditerranéen	Oliviers (10^6)	Superficie (10^6 ha)
Espagne	210	2
Italie	190	1.2
Grèce	95	0.7
Turquie	70	0.9
Tunisie	60	1.5
Maroc	62	0.55
Algerie	32	0.93

Si ces pays sont les plus grands consommateurs d'huile d'olive, ils représentent aussi les plus grands exportateurs de cette huile avec un taux de production dépassant 80% de la production mondiale [13]. L'Espagne se situe en premier rang avec 43% de la production mondiale suivie de l'Italie (28%), la Grèce (19%), la Turquie, la Tunisie le Maroc et l'Algérie.

Parallèlement à la production d'huile d'olive, ces pays rejettent des eaux usées appelées margines qui posent actuellement un vrai problème environnemental pour toute la région méditerranéenne [14]. En effet, plus de 30 106 m³ de margines sont produites annuellement dans le bassin méditerranéen par rapport à un volume mondial inférieur à 40 millions de m³/an [15]

I.3 Secteur oléicole en Algérie

L'Algérie, à l'instar des autres pays méditerranéens, renferme d'importantes ressources oléicoles. Elle offre à l'olivier un milieu bioécologique favorable [16].

En effet, la culture de l'olivier est traditionnelle en Algérie, elle représente l'activité arboricole la plus dominante du pays du point de vue superficie. L'Algérie se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs d'huile d'olive [17].

le nombre d'oliviers en Algérie est estimé à environ 32 millions et occupent une superficie de l'ordre de 930000 hectares [18] répartie dans 3 régions: le Centre, l'Est et l'Ouest avec 54.3%, 28.3% et 17% par ordre d'importance

La production annuelle en huile a atteint 35000 tonnes et celle de l'olive de table 80000 tonnes [19].

I.4 Système d'extraction de l'huile d'olive

Avec le développement du secteur oléicole, les systèmes traditionnels discontinus (lavage des olives, broyage mécanique, malaxage) sont actuellement remplacés par des équipements modernes. Ce perfectionnement, moins onéreux, permet d'extraire l'huile en continue à travers des phases successives et la séparation par centrifugation de l'huile des eaux de végétation [20].

Trois systèmes d'extraction sont à présent utilisés (figure 1) : procédés discontinus ou systèmes à presses et procédés continus ou systèmes à centrifugation. Ce dernier se déroule soit selon un procédé continu à trois phases ou en un procédé continu à deux phases (procédé écologique) [21].

I.5 Sous produits de l'oléiculture

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile (l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon), engendre la production de deux résidus : un liquide et l'autre solide [22].

Margines ou eaux de végétation : sont des effluents liquides, parfois appelés alpechines [23]. Le pressage d'une tonne d'olives produit en moyenne 1,5 tonnes de margines avec les modes de production modernes [23].

Grignons ou tourteaux d'olive : sont des résidus solides issus de la première pression ou centrifugation, ils sont formés des pulpes et des noyaux d'olives. Ce produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite : grignons d'olive après extraction chimique [24-25].

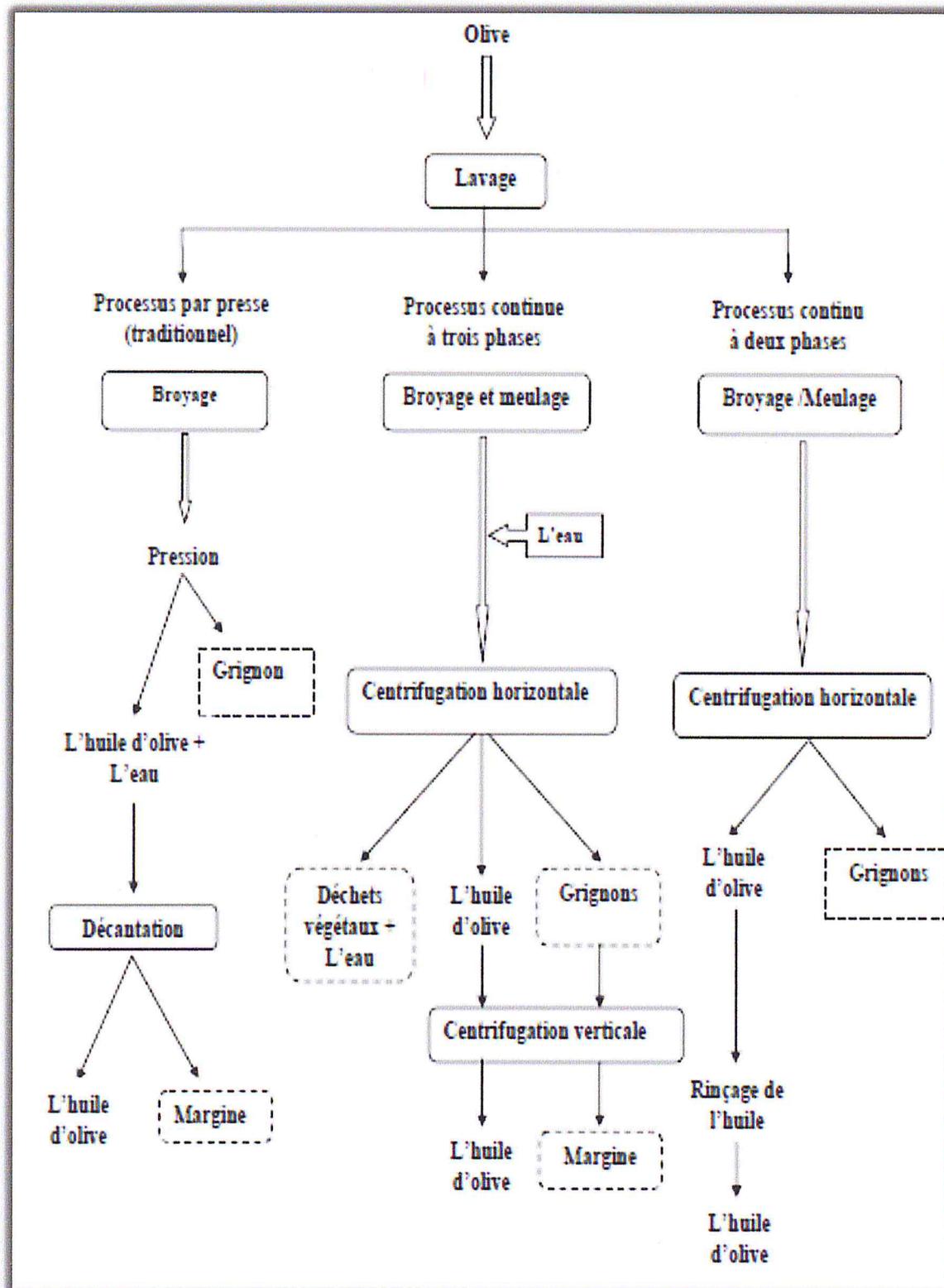


Figure 1 : Processus d'extraction de l'huile d'olive [21]

I. 6 Les margines

I.6.1 Définition

Les margines ou eaux de végétation sont des effluents liquides générés par la fabrication de l'huile. elles se présentent comme un liquide résiduel aqueux de couleur brune rougeâtre. Ce liquide à une odeur agréable qui rappelle celle de l'huile d'olive mais un gout amer.

Les margines sont caractérisées par un pH acide de 4 à 5 [26-28] et une très grande conductivité électrique due surtout aux ions potassium (4 g/L), chlorure, calcium et magnésium [29-30]. Sa couleur noire résulte de la présence de polyphénols [30-31].

I.6.2 Origine des margines

La qualité et la quantité des margines dépendent de l'opération d'extraction d'huile d'olive. Elle sont aussi influencées par la variété d'olive, la saison de cueillette, le taux de maturation des fruits et les conditions climatiques [26].

Le processus de trituration des olives produit principalement l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon (huile secondaire extraite par des solvants organiques) et engendre deux résidus l'un liquide, les margines et l'autre solide, les grignons. Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation [32]. Les margines sont composées de 40 à 50% de l'eau végétale qui provient du fruit (olive) et le reste de l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration [28-32].

I.6.3 Estimation du débit des margines

La quantité et la qualité des margines produites dépendent essentiellement du système d'extraction utilisé. En moyenne, 100 kg d'olives produisent 50 litres de margines via la centrifugation et environ 10 litres par le système classique de pression [32].

I.6.4 Origine de la coloration

En général, les margines sont de couleur brune-rougeâtre à noire. Cette variation de couleur est due à plusieurs facteurs [32-33]:

- ✚ Variété et degré de maturité des olives,
- ✚ Etat de fraîcheur des margines,
- ✚ Etat de dégradation des composés phénoliques,
- ✚ Proportion relative entre les deux groupes des composés phénoliques.

Le pigment brun ou catécholamine est un polymère de nature phénolique responsable de la couleur foncée des margines. Ce polyphénols ne se trouve pas dans les olives. Il se forme au cours du broyage à partir des ortho diphénols, très abondants dans la pulpe, sous l'action des phénoloxydases. Cette enzyme est inactive dans les drupes entières [34].

L'étude des composés phénoliques de différents échantillons de margines a montré qu'ils contiennent pratiquement les mêmes composés phénoliques simples, mais à des concentrations variables suivant la maturité des olives et la conservation des margines [35]. Cette fraction phénolique renferme deux groupes de composés :

- ✚ Composés de poids moléculaires inférieur à $2 \cdot 10^4$ qui sont responsables de la couleur rouge violette. Ces composés correspondent aux polymères phénoliques de faibles poids moléculaires (anthocyanes, tannins). Ils renferment également une classe de composés correspondant aux monomères et oligomères phénoliques qui sont responsables de la coloration jaune masquée par la coloration rouge [36].
- ✚ Composés phénoliques de poids moléculaire supérieur à $2 \cdot 10^4$ responsables de la coloration noire des margines. Ce sont des polymères phénoliques obtenus après oxydation des polyphénols du premier groupe [36,37].

Cette deuxième catégorie semble constituer une forme de la lignine (pseudolignine). Selon certaines études [36], la couleur des margines qui varie du rouge violet foncé au noir est sous la dominance d'un groupe de composés phénoliques par rapport à l'autre.

Durant le stockage des margines, il a été constaté que leur coloration devient de plus en plus noire. Ceci peut être expliqué par :

- ✚ l'oxydation des polyphénols du premier groupe qui se polymérisent et donnent les polyphénols du second groupe [36,37].
- ✚ La biodégradation naturelle des polyphénols du premier groupe.

I.6.5 Caractérisation physico-chimique des margines

Les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre à noire avec une forte odeur d'olive et un aspect trouble [34].

les composés fondamentaux des margines sont l'eau (83,2%), les substances organiques (15%), les substances minérales (1.8%) [38].

Les margines sont acides et extrêmement chargées en matières organiques qui contiennent essentiellement des sucres, des lipides, des acides organiques, des acides aminés et des composés phénoliques. le fruit d'olive est très riche en composés phénoliques mais

seulement 2% du contenu total du fruit passe dans la phase huileuse. le reste se retrouve dans la phase liquide et dans le grignon [28]

La caractérisation physico-chimique des margines est généralement tributaire des techniques et des systèmes retenus pour l'extraction d'huile d'olives et diffère d'un pays à l'autre.

En général, les margines présentent une composition chimique très complexe et hétérogène. Elles contiennent une variété de composés organiques et minéraux, de nature et de concentration très différentes.

Cette variation est due essentiellement aux facteurs suivants [32,33] :

- ✚ Stade de maturation des olives,
- ✚ Conditions climatiques,
- ✚ Variété des oliviers,
- ✚ Système de culture,
- ✚ Situation géographique,
- ✚ Temps de stockage des olives avant la trituration,
- ✚ Techniques et lieu de stockage,
- ✚ Nature de conservation des olives,
- ✚ Procédé d'extraction d'huile d'olive qui représente l'élément le plus important [39-40].

I.6.5.1 pH, conductivité et matière sèche des margines

Les margines ont un pH acide avec des valeurs comprises entre 4,2 et 5,9 [41]. Lors des traitements biologiques des margines, une correction du pH peut s'avérer nécessaire [42]. La chaux vive a été souvent utilisée pour ajuster le pH des margines. En effet, suite à des études [43] il faut 1 kg de chaux pour 1 m³ d'effluent afin de faire augmenter le pH d'un point.

La conductivité électrique est étroitement liée à la concentration des substances dissoutes et à leur nature. Dans le cas des margines, les valeurs de cette conductivité varient entre 18 et 50 ms.cm⁻¹ [44]. Cette mesure ne donne pas forcément une idée immédiate sur la charge minérale du milieu [45]. L'extrait sec des margines est extrêmement élevé et variable. Il est situé entre 15,5 et 266,5 kg.m⁻³ pour les margines de pression et entre 9,5 et 161,2 kg.m⁻³ pour les margines de centrifugation.

I.6.5.2 Fraction minérale

Les margines contiennent des quantités significatives en sels minéraux dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates), les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%) [44].

I.6.5.3 Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques :

- ✚ Fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives. Cette fraction représente les matières en suspension et colloïdales [35].
- ✚ Fraction soluble dans la phase aqueuse et contient les sucres, les lipides, les acides organiques et les composés phénoliques [35].

a. Sucres

Les études effectuées sur les margines par Hamdi et al. [46], ont montré que la teneur en glucides varie entre 2 et 8% du poids de la pulpe d'olive fraîche.

Les glucides rencontrés dans les margines contiennent principalement des composés lignocellulosiques et des pectines qui représentent respectivement 3% et 0,6% [47].

La présence d'autres sucres simples tels que : glucose, saccharose, mannose, arabinose, raffinose et xylose a été également signalée par Salvimini [48].

b. Composés azotés

La fraction azotée est représentée principalement par les protéines avec une concentration variante entre 1,2 et 2,4% (p/v). Presque tous les acides aminés sont présents dans les margines. Les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline et la glycine [48,52].

c. Vitamines

Plusieurs vitamines ont été identifiées. Les plus fréquentes sont les vitamines du groupe D et la vitamine PP avec une concentration de 124 mg.kg⁻¹ de margines [48].

d. Acides organiques

La proportion des acides organiques présente dans les margines varie entre 0,5 et 1,5% (p/v). Les principaux acides organiques rencontrés sont les acides fumarique, glycérique, lactique, malique et malonique [49,48].

e. Huiles

La concentration d'huile résiduelle contenue dans les margines est très variable selon le procédé d'extraction utilisé. Elle varie entre 0,02 et 1% (v/v) . L'acide oléique est l'acide gras le plus abondant avec un pourcentage de 65% par rapport à la totalité d'huile [50].

f. Composés phénoliques

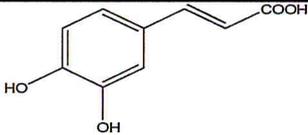
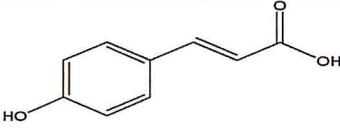
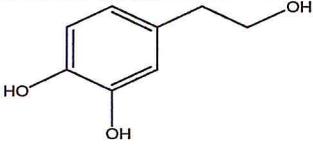
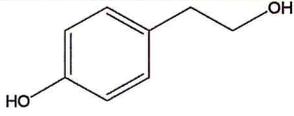
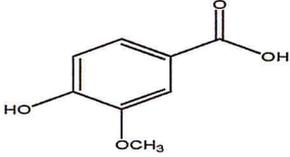
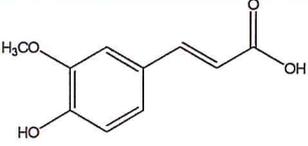
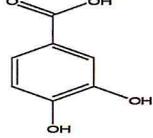
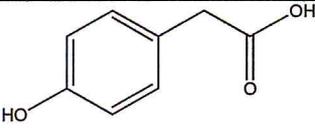
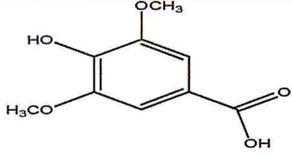
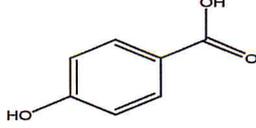
Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines [34]. Les caractéristiques organoleptiques de l'huile d'olive vierge dépendent de la présence des composés phénoliques et des substances volatiles [51].

La teneur en composés phénoliques dans les margines dépend du système d'extraction, le procédé de trituration, la variété d'olives et l'âge des margines [52]. En général, elle varie entre 3 et 5 g.L⁻¹ [52] et elle peut même dépasser 9 g.L⁻¹ [48-49].

La composition des margines en composés phénoliques diffère aussi selon la procédure d'extraction et la variété d'olive traitée [39]. Plus de 50 composés phénoliques ont été identifiés [53-55].

Les monomères les plus rencontrés dans les margines sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Structure des monomères phénoliques rencontrés dans les margines

Composés phénoliques	Structure	Références
Acide caféique		[56,57]
Acide <i>p</i>-coumarique		[56,57]
Hydroxytyrosol		[58,59]
Tyrosol		[58,59]
Acide vanillique		[60]
Acide ferrulique		[56,58]
Acide protocatéchuique		[60,61,62]
Acide 4-hydroxy-phénylacétique		[61,62]
Acide syringique		[61,62]
Acide <i>p</i>-hydroxybenzoïque		[61,62]

I.7 Principales classes des composés phénoliques

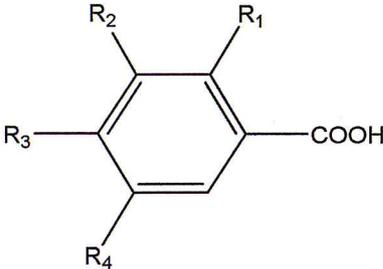
I.7.1 Acides phénoliques simples

a. Acides hydroxybenzoïques :

- ✚ Sont des dérivés de l'acide benzoïque.
- ✚ Ont une structure générale de base de type (C6-C1).
- ✚ Existents souvent sous forme d'esters ou de glycosides.

Les plus abondants sont répertoriés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Les principaux acides hydroxybenzoïques [63]

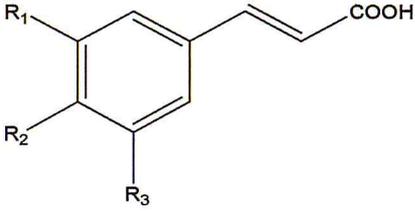
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy-Benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

b. Acides hydroxycinnamiques :

- ✚ Dérivent de l'acide cinnamique.
- ✚ Ont une structure générale de base de type (C6-C3).
- ✚ Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques.
- ✚ Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules.

Le tableau 4 représente les principaux acides hydroxycinnamiques.

Tableau 4 : Les principaux acides hydroxycinnamiques [63].

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p-caumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

I.7.2 Les polymères phénoliques

Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement :

- Les anthocyanes [64]
- Les tannins : leur structure est très complexe, leur concentration peut atteindre 12 g.l-1 [64].

Ils sont classés conventionnellement en tanins hydrolysables et tanins condensés [65]

Les tannins hydrolysables renferment trois groupes :

- * Esters d'acides phénoliques,
- * Esters d'acides phénoliques et sucres,
- * Glucosides, qui est le groupe le plus abondant où l'acide gallique est le plus dominant.

L'action de l'enzyme tannase chez *Aspergillus niger* hydrolyse ce type de tanins en glucose et en acide gallique. Les gallotanins sont les plus représentatifs de ce groupe.

I.7.3 Intérêt biologique des composés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent un grand intérêt dans les domaines agroalimentaire et pharmacologique. Le tableau 5 représente les principales activités des acides phénoliques.

Tableau 5 Activités biologiques des composés polyphénols

Polyphénols	Activités	Références
Acides phénols (Cinnamique et benzoïque)	-Antibactérien	[66]
	-Antifongique	[67]
	-Antioxydants	[68]

I.8 Toxicité des margines

Le pouvoir polluant des margines est dû à des causes diverses parmi lesquelles nous pouvons citer :

- ✚ Le PH qui est la première cause directe de la mort des poissons lorsque la margine est déversée dans des fleuves
- ✚ La teneur en matière grasse qui provoque la formation d'une couche à la surface de l'eau empêchant l'oxygénation et le passage de la lumière solaire et faisant obstacle au développement normal de la faune et la flore au sein des fleuves
- ✚ les substances phénoliques contenues dans les margines son potentiellement toxique et inhibent le développement des microorganismes [69], leur teneur élevée dépassant dix fois plus celle de la phase huileuse [70]. D'une part, ces composés sont difficilement biodégradable

I.9 Antioxydants et radicaux libres

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques. Les enzymes tels que les superoxyde-dismutases, les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme.

I.9.1 Radicaux libres

I.9.1.1 Définition

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De part sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses, Il existe deux grandes voies de formation de ces derniers [71] :

- ✚ La première voie consiste en un transfert d'électrons catalysé par les métaux de transition (Fe, Cu), ils transforment H_2O_2 en radical hydroxyle (OH^\cdot), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique.
- ✚ La deuxième voie se fait au niveau de la scission homolytique des liaisons covalentes des molécules. Cette voie nécessite de l'énergie qui pourra être fournie par les radiations ionisantes, par la lumière, la chaleur et les ultrasons.

I.9.1.2 Nature des radicaux libres

a. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme.

- *Ion superoxyde* ($^{\cdot-}O_2$) : c'est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.

- *Radical libre hydroxyle (OH)* : il est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons une réaction à titre d'exemple:

- la réaction de Fenton : elle est basée sur la production des radicaux hydroxyles à partir de la décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par des sels ferreux.



- Dans l'oxydation des lipides, la réaction de Fenton peut s'écrire de la manière suivante :



- *Oxygène singulet* (1O_2) : lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



b. Espèces libres non oxygénées :

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO). Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs.

Nous citerons, par exemple, les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.

Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives.

I.9.2 Antioxydants

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

I.9.2.1 Définition

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par HALLIWELL comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres [72].

I.9.2.2 Utilisation des antioxydants

- ✚ Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation,
- ✚ Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras,
- ✚ Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture.

I.9.2.3 Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés dans deux catégories différentes :

- 1- Les antioxydants de synthèses
- 2- Les antioxydants d'origine végétale

a. Antioxydants de synthèses : ils sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases. Leur concentration d'utilisation est généralement dix fois plus faible que celle des conservateurs et se situe entre 0,02 et 0,05 %. Ce sont :

- + le butylhydroxytoluène (BHT)
- + le butylhydroxyanisole (BHA)
- + les gallates de propyle, octyle et de dodécyle.

b. Antioxydants d'origine végétale : les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols.

I.10 intérêts biologiques des produits dérivants des margines

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les réactions biochimique qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres qui initient des réactions d'oxydation en chaine destructrices. Les antioxydants peuvent neutraliser ces radicaux libres et empêcher les réactions en chaine initialisées par ces derniers.

Les polyphénols préviennent le développement des maladies cancérigènes dans l'organisme en inhibant les réactions oxydatives et empêchant la formation d'ADN anormal [73].

Des études sur le cancer ont montré que les extraits phénoliques d'huile d'olive réduisent la capacité d'adhésion des cellules cancéreuses [74].

La présence de l'hydroxytyrosol et de quelques polyphénols est corrélée à une réduction de la formation des molécules pro-inflammatoires[75].

L'acide caféique , l'acide férulique ainsi que l'hydroxytyrosol sont impliqués dans la protection contre les maladies cardiovasculaires. Ils ont pour effet de bloquer l'augmentation de la concentration de Ca^{++} en réponse a l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein)[76].

Ainsi, en cosmétologie les composées phénoliques sont liés au propriété suivantes: propriété antioxydante, capacité de chélater les métaux, pouvoir anti-inflammatoire, effet antimicrobien et intervention sur l'activité de nombreuses enzymes. Aussi ils sont connus comme des protecteurs des protéines de la peau comme l'élastine et le collagène [77].

Chapitre II

Etude

Expérimentale

II.1 MATERIEL ET METHODES

II.1.1 Introduction

Cette partie est consacrée à l'étude des caractéristiques Physico-chimiques et de l'étude cinétique de dégradation des phénols et de l'activité antioxydante de l'extrait de margine. Elle comprend quatre sous-parties : La préparation de l'extrait de margine (extraction liquide-liquide), la caractérisation physico-chimiques de l'extrait de margine, l'étude cinétique de la biodégradation des phénols dans l'extrait et la détermination des propriétés antioxydante de l'extrait obtenu.

La préparation de l'extrait de margine ainsi que l'activité antioxydant (méthode de DPPH) ont été réalisés au laboratoire de chimie des substances naturelles (département de Chimie, Université Saad Dahlab), L'étude cinétique de la biodégradation des phénols a été réalisée au laboratoire de biochimie (Département de chimie industrielle Université Saad Dahlab) alors que la caractérisation physico-chimiques de l'extrait a été effectuée dans un laboratoire d'hygiène dans la région de Tipaza.

II.1.2 origine des margines

Les margines employées dans cette étude sont obtenues à partir d'olives de couleur noir (80%) et mi-noire à vert (20%), la plus part des olives utilisées proviennent de l'est du pays. Ces olives sont pressées dans une huilerie moderne selon un processus d'extraction à trois phases. Cette huilerie est située dans le chef lieu de la wilaya de Chlef, (Algérie). La collecte des olives a été réalisée pendant la période de cueillette hivernale.

L'échantillon est introduit dans des bidons en polypropylène qui une fois au laboratoire, il est stocké à l'obscurité dans un environnement non oxygéné à +4 °C. La figure 2 représente l'échantillon de margine utilisée pour l'expérimentation.



Figure 2: Echantillon de margine provenant d'une huilrière de Chlef

II.1.3 Extraction des polyphénols de margines

Une seule méthode d'extraction a été utilisée au cours de nos expériences, il s'agit de l'extraction liquide-liquide. Elle consiste en la délipidation des margines et la récupération des composés phénoliques [79,80].

II.1.3.1 Extraction des lipides

Après avoir aspiré le surnageant huileux à la surface de la margine, le volume restant est centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse (4000 tr/min pendant 10 min). Deux phases sont obtenues : une phase aqueuse et un précipité.

Dans une ampoule à décanter de capacité 250 mL, une prise d'essai de 50 mL de la phase aqueuse est mélangée avec 50 mL d'hexane. L'opération est répétée deux fois afin d'extraire le maximum de lipide. La durée d'une seule extraction est de 10 min.

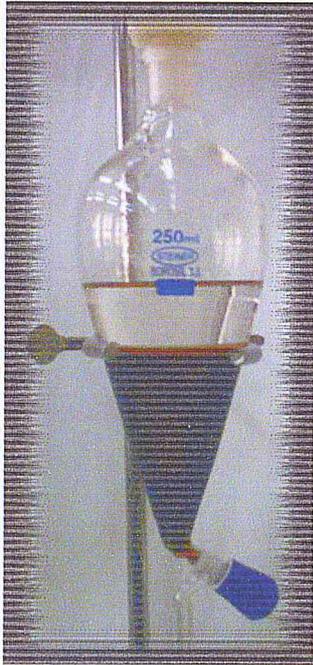
II.1.3.2 Extraction des composés phénoliques avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme

L'extraction des composés phénoliques est effectuée dans une autre ampoule à décanter d'une capacité de 250 mL. Une prise d'essai de 50 mL de margines délipidées est mélangée avec 50 mL de l'acétate d'éthyle. Le mélange subit ensuite une agitation suivie d'une décantation pendant 10 min. L'opération d'extraction est répétée deux fois dans le but de récupérer le maximum de composés phénoliques.

La phase organique riche en composés phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40 °C. La durée d'une extraction est de 20 min.

L'opération est répétée sur la phase liquide en remplaçant l'acétate d'éthyle par le chloroforme.

Le dispositif d'extraction liquide-liquide est donné sur la figure 3.



Etape 1



Etape 2



Etape 3

Figure 3: Les différentes étapes appliquées pour l'extraction liquide-liquide de l'extrait de margine

II.1.3.3 Rendement en extrait

Le rendement en extrait est estimé par le rapport des masses d'extrait et la matière utilisée. Il est exprimé en % et calculé par la formule suivante :

$$\eta (\%) = \frac{M_{ext}}{M_{mt}}$$

η (%) : rendement en extrait.

M_{ext} : masse de l'extrait (g).

M_{mt} : masse de la matière utilisée.

II.1.4 Dosage des polyphénols totaux

II.1.4.1 Principe

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce végétale à l'autre.

Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) est souvent utilisée.

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Lors de l'oxydation, il se réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présentes dans l'extrait analysé [81].

II.1.4.2 Mode opératoire

- ✓ Introduire 1 mL de l'extrait dilué de margine dans une fiole de 25 mL ;
- ✓ Ajouter 0.5 mL du réactif Folin-Ciocalteu ;
- ✓ Ajouter 5 mL d'eau distillée ;
- ✓ Après 2 min ajouter 6 mL d'une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à concentration de (290 g/L) ;
- ✓ La solution d'extrait de margine est maintenue à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante ;
- ✓ L'analyse de l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée par le phloroglucinol C₆H₆O₃ comme étalon en suivant les mêmes étapes de dosage précédentes.

La quantité des polyphénols totaux est calculée par l'équation suivante :

$$C = \frac{c * V}{m}$$

C : contenu total des polyphénols (mg équivalent phloroglucinol /g d'extrait).

c : concentration du phloroglucinol (mg/mL).

V : volume de l'extrait (mL).

m : masse de l'extrait pur de margine (mg).

La figure 4 représente l'organigramme de l'extraction et du dosage des polyphénols totaux.

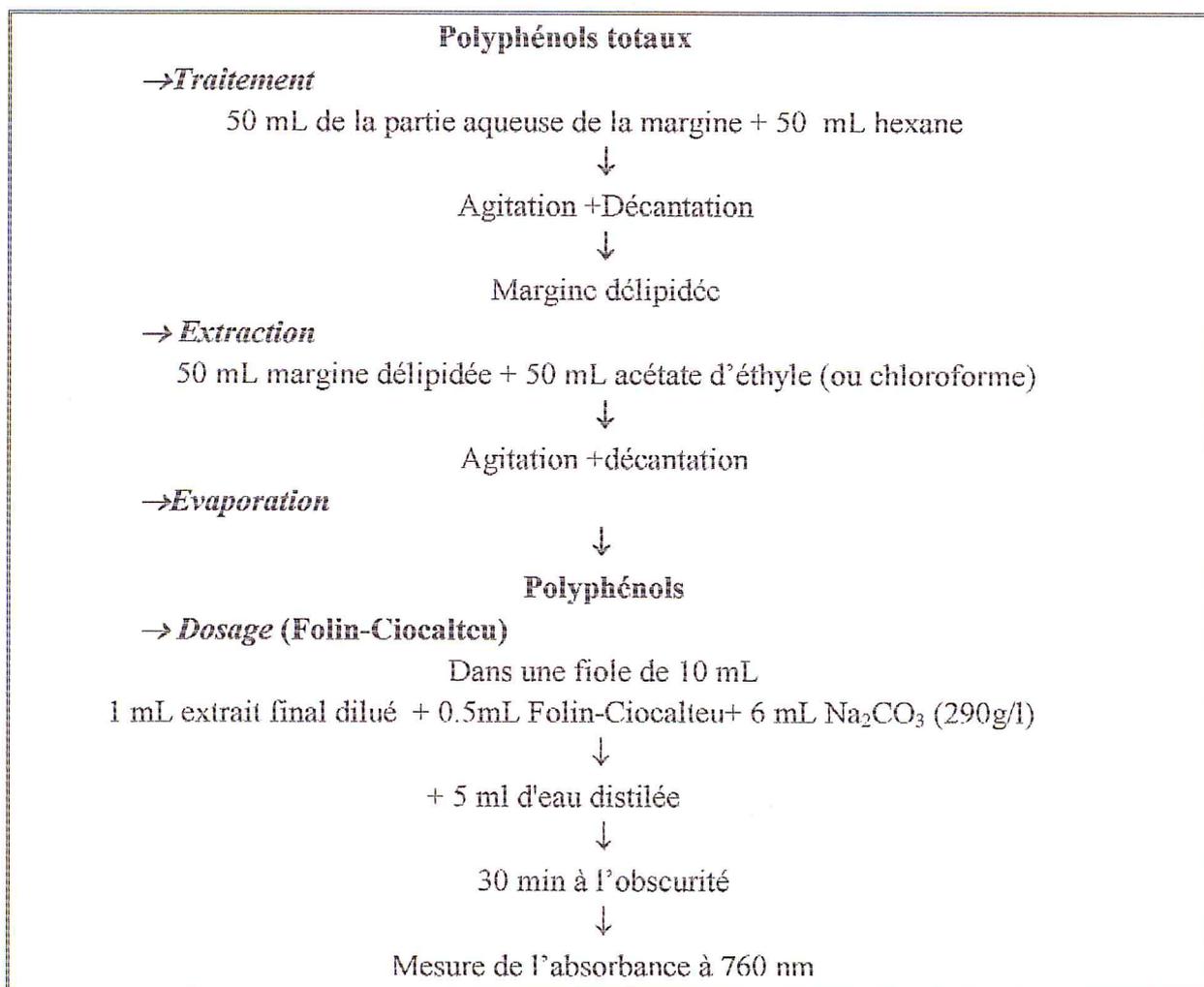


Figure 4 : Organigramme de l'extraction et du dosage des polyphénols totaux

II. 1.5 Etude physico-chimique des margines

La caractérisation physico-chimique et minéralogique a été basée sur l'étude des paramètres suivants : Acidité (pH), matières en suspension (MES), matière sèche (MS), matière volatile (MV), demande chimique en oxygène (DCO), composés phénoliques, sucres totaux, matière grasse, conductivité, azote total, ions ammoniums, orthophosphates, chlorures, calcium, magnésium.

Avant de procéder au dosage des différents paramètres physico-chimiques, les échantillons de margines sont centrifugés (4000 tr/min). Pour la détermination des MES, MS et MV, les échantillons des margines sont utilisés sans centrifugation.

II. 1.5. 1 Détermination des paramètres organiques

II. 1.5. 1. 1 Acidité (pH)

La mesure de pH a été faite pour trois échantillons de margines non diluées à l'état brut. Après étalonnage du pH-mètre (HANNA Instrument), l'électrode de mesure pH a été introduit dans un bêcher contenant 30 à 50 mL de margin.

II. 1.5. 1. 2 Matières en suspension (MES)

La séparation des MES a été faite par centrifugation. 0,1 L de margine est centrifugé à grande vitesse (3250 tr/mn) pendant 20 mn. Le culot récupéré a été versé dans une capsule en porcelaine préalablement séchée. Le tout a été séché à 105 °C pendant 24 heures.

La teneur en MES est calculée à partir de la formule suivante :

$$[\text{MES}] (\text{g.L}^{-1}) = (\text{M2} - \text{M1}) / \text{V}_E \dots\dots\dots \text{Equation 1}$$

M2 : masse de la capsule et du culot après séchage (g),

M1 : masse de la capsule vide (g),

V_E : volume de margine centrifugé (L).

II. 1.5. 1. 3 Matière sèche (MS)

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organique et inorganique, en solution ou en suspension, contenues dans les margines. La détermination de leur MS consiste à évaporer un échantillon de 0,1 L dans un bêcher à 105°C pendant 24 heures. Elle est exprimée en g.L-1 par rapport au poids frais [82].

La teneur en MS est calculée à partir de la formule suivante :

$$[\text{MS}] (\text{g.L}^{-1}) = (\text{M4} - \text{M3}) / \text{V}_E \dots\dots\dots \text{Equation 2}$$

V_E : volume de margine

M3 : masse du bêcher vide (g),

M4 : masse du bêcher avec margine après évaporation (g),

II. 1.5. 1. 4 Matières minérale et volatile

Pour la détermination des matières minérale et volatile, la margine a été centrifugée à grande vitesse comme pour le cas des MES. Après récupération du culot et le séchage à 105°C, le culot a été mis au four à moufle à 525°C pendant 2 heures [82].

La teneur en matières minérales en suspension est donnée par la formule suivante :

$$[MMS] \text{ (g.L}^{-1}\text{)} = (M7 - M1) / V_E \dots\dots\dots \text{Equation 4}$$

M7 : masse de capsule avec culot à la sortie de four (g).

La différence entre les concentrations des MES et MMS représente les matières volatiles MVS.

$$[MVS](\text{g.L}^{-1}) = [MES] - [MMS] \dots\dots\dots \text{Equation 5}$$

II. 1.5. 1. 5 Turbidité

La turbidité est la mesure du caractère trouble de la margine. Elle est causée par les matières en suspension, telles que l'argile, les particules organiques, le plancton et les autres organismes microscopiques.

La turbidité est mesurée par un turbidimètre type WTW turb 550. L'échantillon est laissé au repos. Après décantation l'échantillon est analysé par le turbidimètre.

II. 1.5. 1. 6 Demande chimique en oxygène (DCO)

La valeur de la DCO caractérise la quantité de substances chimiquement oxydables présentes dans l'eau. C'est un des paramètres indicateur de pollution. Il s'agit de la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder principalement les composés organiques présentes dans l'eau.

La mesure de la DCO se fait selon la méthode suivante : 1 mL de margine est versé dans un tube du DCO-mètre dont lequel est ajouté 99 mL d'eau distillée et 5 mL de dichromate de potassium qui contient 0,4 g de sulfate mercurique. Quelques granules régulateurs d'ébullition sont ajoutés. Après agitation, 15 mL de sulfate d'argent sont additionnés lentement et en agitant soigneusement le tube avec un refroidissement sous un courant d'eau froide. Ainsi, le tube est placé dans un bloc chauffant jusqu'à ébullition pendant 2 h. Le tube est laissé refroidi, sur lequel il est versé 75 mL d'eau distillée.

L'excès de dichromate est titré par le sel de Mohr en présence de 1 à 2 gouttes de ferroïne (virage bleu-vert à brun-rouge).

Un essai à blanc est préparé en remplaçant la margine par l'eau distillée pour réduire la totalité de dichromate dans l'échantillon d'essai à blanc (témoin) [82].

La demande chimique en oxygène DCO est donnée par la formule suivante :

$$\text{DCO (mg d'O}_2\text{/l)} = \frac{8000 \times C_{Fe} (V_T - V_E)}{E} \dots\dots\dots \text{Equation 6}$$

C_{Fe} : normalité de sel de Mohr

V_E : volume de sel de Mohr pour l'échantillon de margine

V_T : volume de sel de Mohr pour le témoin

II. 1.5. 1. 7 Demande biochimique en oxygène

La demande biochimique en oxygène est la quantité d'oxygène (mg.L-1) que des bactéries utilisent pour décomposer partiellement ou totalement en CO₂ des substances organiques dans l'eau, en un temps donné, à l'aide de leur système enzymatique. La DBO₅ est une mesure de la teneur dans l'eau en substances biochimiquement dégradables et ceci pendant 5 jours.

La mesure de la DBO₅ est faite par une méthode respirométrique en utilisant un DBO-mètre selon la méthode suivante : 2,5 ml. de margine brut est dilué 100 fois avec de l'eau distillée dont laquelle est ajouté 2 ou 3 pastilles de NaOH. L'ensemble est introduit dans une bouteille de DBO-mètre. La dépression due à la consommation d'oxygène et l'adsorption du gaz carbonique par la potasse est mesurée à l'aide du manomètre à mercure. Les valeurs de la DBO₅ sont exprimées comme suit : DBO₅ (mg d'O₂/l) = Valeurs lues × facteur dilution.

II. 1.5. 1. 8 Sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés par spectrophotométrie, selon la méthode de Dubois[84]. Les sucres simples, oligosaccharides, polysaccharides et leurs dérivés réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orange. La réaction est sensible, et la coloration reste stable pendant plusieurs heures. Pour les margines (diluée 10 fois), 1mL de l'échantillon est mélangé à 1 mL d'une solution phénolique (5%) et 5 mL d'acide sulfurique concentré (96%) et le mélange est agité immédiatement. Les tubes sont placés au bain-marie à 30-40°C pendant 20 minutes puis refroidis sous eau glacée, les tubes sont conservés à l'obscurité pendant 10 min. Les sucres réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orange. La densité optique est

mesurée à 490 nm. La concentration des sucres totaux est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage d'une solution de glucose à des concentrations allant de 10 à 100 mg.L-1[85].

II. 1.5.1.9 Matière grasse

La méthode utilisée pour la détermination de la teneur en matières grasses des margines est celle décrite par Aissam . Dans une ampoule à décanteur de capacité 500mL, sont mélangés respectivement 100 mL de margines, 75 mL de chloroforme et 100 mL de méthanol. Après agitation suivie d'une décantation, le mélange est divisé en deux phases. La phase supérieure constituée de margines et de méthanol est éliminée, alors que la phase inférieure contenant le chloroforme et les lipides soluble est évaporée dans un rotavapeur. Le chloroforme s'évapore et les lipides sont récupérés. Le volume de lipides obtenu est évalué en pourcentage par rapport au volume de margines utilisé (v/v) [87].

$$[MG] (\%) = \frac{V(MG)}{V(M)} \times 100 \dots \dots \dots \text{Equation 7}$$

MG : Matières grasses

M : Margines

II. 1.5. 2 Détermination des paramètres minéraux

II. 1.5. 2. 1 Conductivité

La conductivité caractérise la résistance au passage du courant ou de la chaleur dans un matériau. La conductivité électrique est mesurée par un conductimètre de type HANNA Instrument, elle est exprimée en mS.cm-1.La sonde de conductimètre, une fois rincée, est plongée dans un bécher contenant 30 à 50 mL de margine à analyser [81].

II. 1.5. 2. 2 Calcium et magnésium

Le calcium et le magnésium présents dans les margines sont complexés par l'éthylène diamine tétra-acétate disodique (EDTA) en milieu tamponné. Le noir erichrome T (NET), qui donne une couleur rouge foncée ou violette en présence des ions Mg++et Ca++est utilisé comme indicateur coloré pour la détermination de la dureté totale.

Les ions Ca⁺⁺sont dosés par l'EDTA en milieu alcalin (pH 12) et en présence d'indicateur coloré. Les ions Mg⁺⁺sont précipités puis déterminés par différence entre la dureté totale et le calcium. Les deux sont exprimés en g.L-1 [81].

II. 1.5. 2. 3 Chlorure

Les chlorures sont dosés par la méthode de Mohr, en milieu neutre par une solution titrée de nitrate d'argent et en présence du chromate de potassium. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent.

Introduire 100 mL de margine diluée 100 fois, préalablement filtrée, dans une fiole conique de 250 mL. Ajouter 2 à 3 gouttes d'acide nitrique pur puis une pincée de carbonate de chaux et 3 gouttes de solution de chromate de potassium à 10%.

Au moyen d'une burette la solution de nitrate d'argent (0,1 N) est versée jusqu'à l'apparition d'une teinte rougeâtre, qui doit persister 1 à 3 minutes [81].

Pour une prise d'essai de 100 mL :

$V \times 10 \times 3,55$ donne la teneur en chlorures, exprimée en milligrammes de Cl^- par litre d'eau.

V : volume de nitrate d'argent (mL).

II. 1.5. 2. 4 Orthophosphates

Les orthophosphates sont dosés selon la méthode de Murphy et Riley (1962). La détermination de leur concentration est basée sur la formation d'un complexe antimoine-phosphate-molybdate. Ce complexe est réduit par l'acide ascorbique en composé fortement coloré en bleu. La densité optique est lue à une longueur d'onde de 880 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution de KH_2PO_4 à des concentrations comprises entre 0 et 0,8 mg de PO_4^{3-} -L-1 [81].

II. 1.5. 2. 5 Azote total

Les composés azotés présents dans les margines sont oxydés en nitrates par une solution alcaline de persulfate à l'autoclave (120°C). Ensuite, les nitrates sont dosés par la méthode de salicylate de sodium, ils donnent du paranitro-salicylate de sodium coloré en jaune et susceptible d'un dosage colorimétrique à une longueur d'onde de 415 nm.

La concentration de l'azote total est déterminée à partir d'une gamme étalon de KNO_3 à des concentrations comprises entre 0,5 et 5 mg de NO_3^- -L-1 [81].

II. 1.5. 2. 6 Ions ammoniums

Les ions ammoniums sont dosés par la méthode d'indophénol. En milieu alcalin et en présence de nitroprussiate de sodium comme catalyseur, ils réagissent avec le phénol et l'hypochlorite de sodium, et forment le bleu d'indophénol susceptible d'un dosage colorimétrique. La lecture de la densité optique au spectrophotomètre se fait à une longueur d'onde de 630 nm. La concentration des ions ammoniums est déduite à partir d'une gamme étalon d'une solution de NH_4Cl à des concentrations comprises entre 0,2 et 0,8 mg de $\text{NH}_4^+\text{-L}^{-1}$ [81].

II. 1. 6 Analyse de l'extrait de margine par CG/SM

L'analyse qualitative de la composition chimique de l'extrait a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM » dont les conditions opératoires sont les suivantes :

- Un chromatographe en phase gazeuse de type Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse de type DSQ II.
- Une colonne capillaire de type HP-5 de longueur de 30m, d'un diamètre interne de 0,32 mm et une épaisseur du film de 0,1 μm .
- Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à un débit de 1 ml/mn.
- La température de l'injection étant de 250°C.
- La programmation du four est : 100 (1) – 3°C/mn – 280 (1)

II.1.7 Analyse de l'extrait acétate par chromatographie liquide couplée à la détection UV-Visible à barrettes de diodes (CLHP/DAD-UV)

L'analyse a été effectuée sur une chaîne chromatographique de type Agilent 1260, muni d'un injecteur automatique (G1329B) avec un module de chauffage des échantillons, d'une pompe quaternaire (G1311B) équipée d'un système de programmation de débit, d'un four pour colonne (G1316A) équipé d'un module de chauffage par effet Peltier, et d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes (G1315D). Cet appareillage, piloté par le logiciel ChemStationAgilent, permet de travailler en mode isocratique ou en mode gradient.

La séparation a été réalisée à température ambiante sur une colonne analytique (Agilent RP 18 ; 5 μm ; Φ : 4,6mm, l : 250mm). L'extrait a été analysé par CLHP à polarité de phase

inversée en mode gradient d'élution Acétonitrile / Eau à un débit de 1 ml.min^{-1} , avec un volume d'injection de $10 \mu\text{l}$. La programmation d'élution est donnée dans le tableau 6

Tableau 6 : Programme gradient d'analyse par CLHP

Temps	Acétonitrile	Eau
0 – 10 min	20%	80%
10 – 20min	50%	50%
20 – 30 min	100%	0%

II.1.8 Etude cinétique de biodégradation des phénols dans les margines

Dans le but d'étudier la cinétique de biodégradation des phénols, nous avons introduit 2 erlenmayer stérilisés contenant chacune 50 ml de margine, dans un incubateur agitateur à 36°C . Les mesures ont été faites par prélavage quotidien de 5 ml de margine, et dosage par la méthode de Follin Ciocalteu décrite dans le dosage des phénols totaux.

II.1.9 Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques

Nous avons opté pour l'évaluation de l'activité antioxydant par la méthode de Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).

II.1.9.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1 picrylhydrazyl)

Pour étudier l'activité anti-radicalaire de notre extrait, nous avons utilisé la méthode qui utilise le DPPH (figure 5) comme radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm.

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydante afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphényl picryl-hydrazine, couleur jaune), le virage vers cette coloration et l'intensité de la couleur jaune reflète la capacité anti-radicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule.

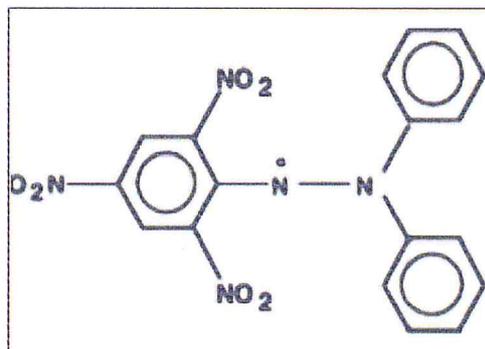


Figure 5: Structure chimique du radical libre DPPH•

Selon le protocole d'écrit [87] légèrement modifié ; La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol absolu pour avoir une concentration de 0,04%.

Les échantillons ont été préparés par dissolution de 0,5 mg d'extrait dans 1 mL de méthanol. Cette solution dite solution mère, subit ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de mg par mL. En parallèle, une solution méthanolique de la vitamine C été préparée par dissolution de 0,2 mg de la vitamine C dans 1 mL de méthanol. L'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

Dans des tubes secs et stériles, nous introduisons 1 mL de méthanol et les différentes concentrations de la solution à tester, auxquelles nous ajoutons 1 mL de la solution DPPH. Après agitation à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante (25 °C environ) pendant 30 min.

La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 518 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant des cuves en quartz de 2 mL. La lecture est mesurée par rapport un blanc qui constitue 1 mL de méthanol et 1 mL de la solution de DPPH.

La valeur EC50 est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur), ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constituée de méthanol et de la solution de DPPH.

II.1.9.2 Détermination du pouvoir antioxydant :

pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH à 50% (EC50), les résultats sont exprimés en activité antioxydante, qui exprime la capacité de piégeage du radical libre et elle est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. L'activité antioxydante « AA% » est donnée par la formule suivante :

$$\%inhibition = \frac{Abs_{control} - Abs_{blanc}}{Abs_{control}} \times 100 \quad [115].$$

Soit :

AA : Activité antioxydante.

Abs control: Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution méthanol + DPPH.

Abs test : Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

II.2 RESULTATS ET DISCUSSION

II.2.1 Analyse Physico-chimique

II.2.1.1 Acidité de margine (pH)

La mesure du pH de margines à donnée une valeur de l'ordre de 4.56. Cette valeur se trouve dans l'intervalle citée dans la littérature (4,2 à 5,9)[88].

Les margines sont donc des effluents acides en raison de la présence des acides organiques (acides phénoliques, acides gras, ... etc.).

II.2.1.2 Matières en suspension (MES)

Les margines sont très riches en matières en suspension, La teneur de matières en suspension dans notre margine brute est de 2,2 g.L-1, Cette valeur est similaire à celles décrite par d'autres auteurs dans les margines industrielles[89]

II.2.1.3 Matière sèche (MS) matière volatile (MV) et matières volatiles en suspensions (MVS)

Les teneurs moyennes des margines en matière sèche et en matière volatile et matière volatile en suspension sont de l'ordre de 13,049 g.L-1 ; 11,843 g.L-1 et 2,09 g.L-1 respectivement. La MV représente 90% de la MS, ce qui montre la nature organique des margines.

Ces valeurs sont proches de celles décrites par plusieurs auteurs [90].

II.2.1.4 Turbidité

La valeur de turbidité de notre effluent est de 628 NTU. Cette valeur est très grande par rapport à celle de l'eau qui est presque nul, et montre que les margines sont des agents très polluants.

II.2.1.5 DCO et DBO₅

L'analyse de notre margine a permis de trouver une valeur exprimée en DCO de 155 g d'O₂.L-1 caractérisant la pollution oxydable totale, et une valeur de DBO₅ de 70 g d'O₂.L-1.

notre valeur est comparable à celles obtenues par plusieurs auteurs dans des margines issues du système de centrifugation [91]

II.2.1.6 Sucres totaux

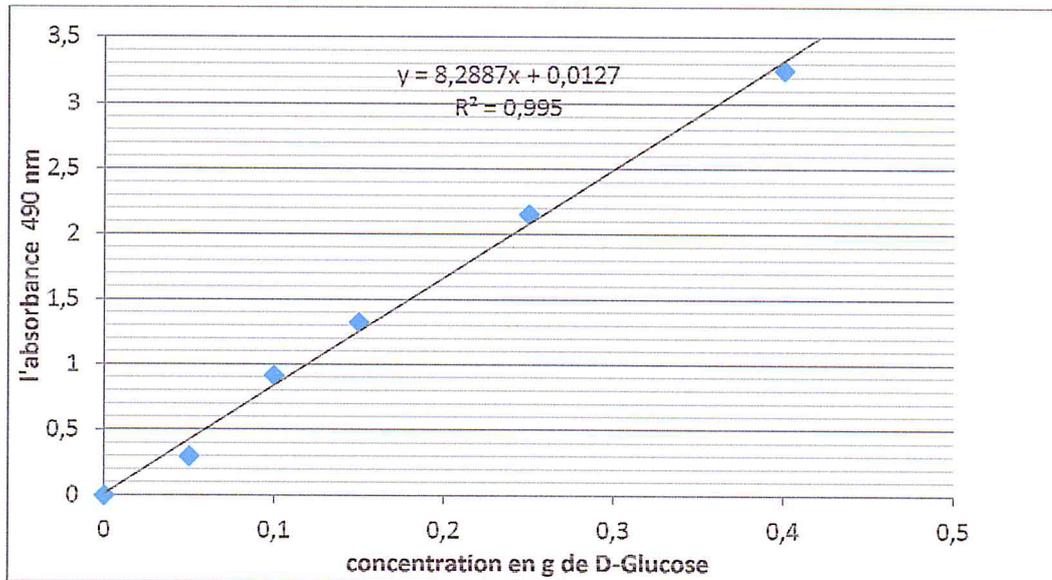


Figure 6 : Mesure de l'absorbance par rapport à la concentration de D-Glucose

L'absorbance mesuré est de 1,487

A partir de l'absorbance mesurée et de la courbe d'étalonnage de D-Glucose :

On déduit la présence de faible concentration en sucres (0,178 g.L-1)

Cette faible concentration montre que les microorganismes dans les margines utilisent pour leur métabolisme les produits de dégradation des composés phénoliques, plutôt que celle des sources glucidiques.

II.2.1.7 Matière grasse

La quantité en matières grasses présente dans les margines, dépend du système d'extraction d'huile d'olive, La teneur obtenue dans notre cas qui représente 1,23 % (v/v), présente un aspect visqueux lié à la présence de la fraction huileuse

II.2.1.8 Conductivité

Les margines étudiées ont une conductivité électrique élevée de l'ordre de 9,90 mS.cm-1. Cette valeur reflète la teneur élevée en sels présents dans ces effluents.

II.2.1.9 Teneur en calcium, et en magnésium

Les margines sont riches en Ca^{++} , Mg^{++} leurs teneurs sont de l'ordre 0,035 g.L-1 ; 0,02 g.L-1 respectivement. ce résultat est similaire à ceux cités dans la littérature [92]

II.2.1.10 Teneur en Chlorures

La concentration moyenne des chlorures dans les margines est élevée (5,32 g.L-1). Elle est due à l'ajout du sel en quantité importante pour la conservation des olives. Cet élément a un pouvoir bio-oxydant sur la plupart des micro-organismes.

II.2.1.11 Teneur en Orthophosphates et en azote total

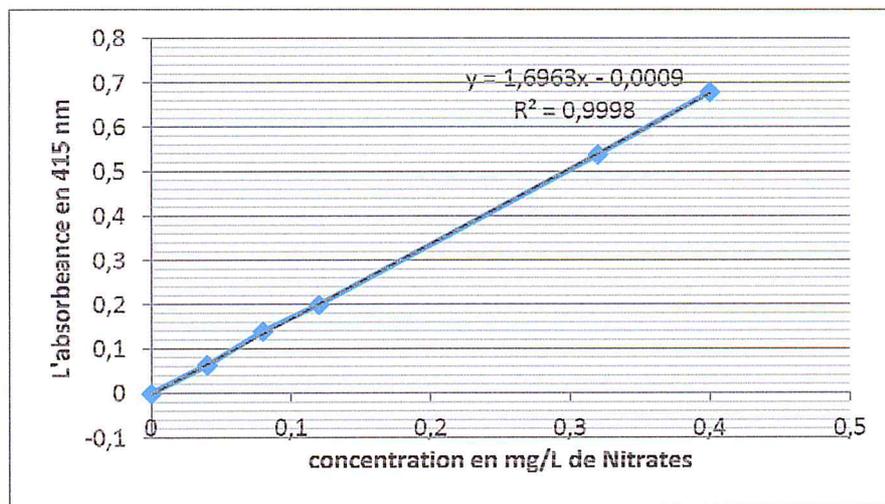


Figure 7: Mesure de l'absorbance par rapport a la concentration du nitrates

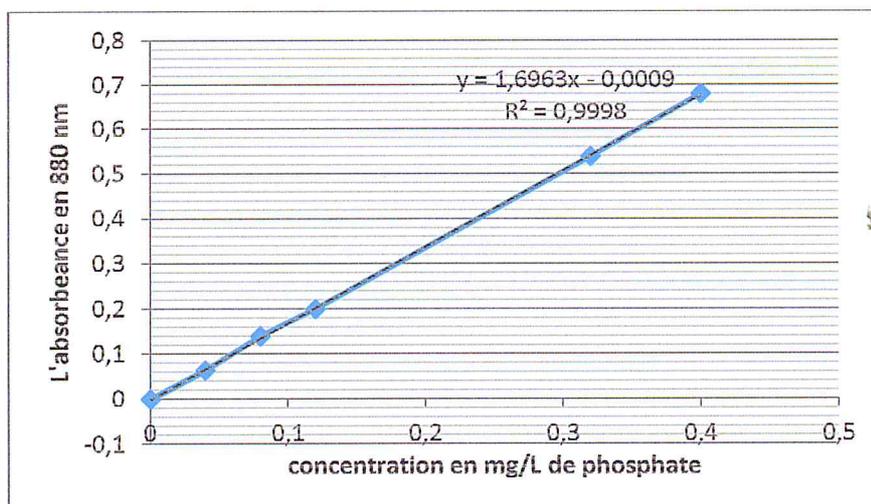


Figure 8: Mesure de l'absorbance par rapport a la concentration du Phosphate

A partir des absorbances mesurées qui sont 0.105 pour le phosphate et 0.116 pour l'azote et les courbes d'étalonnages, on déduit que les margines présentent des teneurs élevées en phosphates (0,062 g.L⁻¹) et en azote total (0,068 g.L⁻¹).

les concentrations en phosphate et en azote restent plus faibles par rapport à celle du carbone (DCO).

II.2.1.12 Teneur en ions ammoniums

A partir de la courbe d'étalonnage, l'absorbance mesurée qui est de valeur de 0.17 a montré que la concentration est assez faible (0,01 g.l⁻¹).

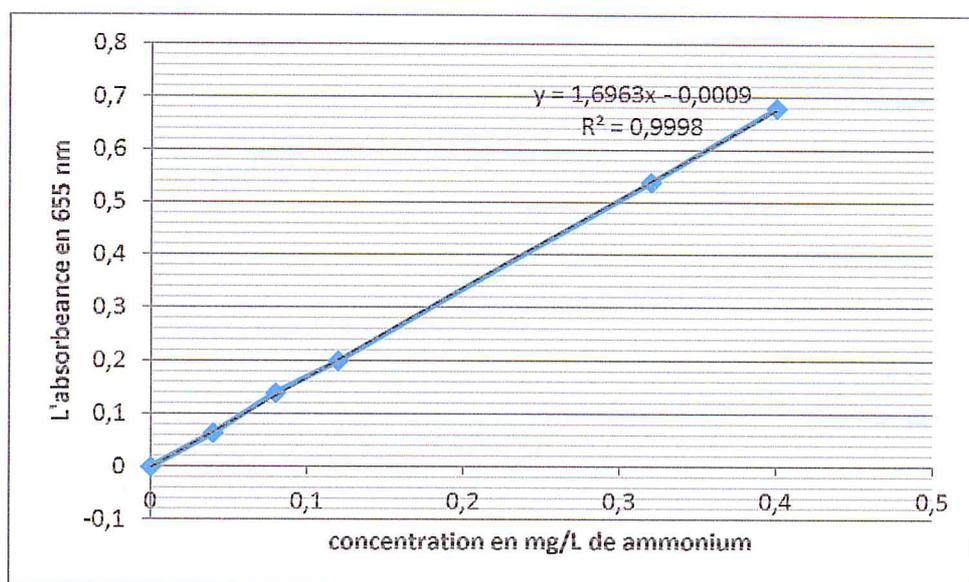


Figure 9 : Mesure de l'absorbance par rapport a la concentration d'ions ammonium

II.2.2 Rendement de l'extrait de margines

Dans le but de valoriser des composés phénoliques contenus dans les margines et effectuer des études physico-chimiques, des tests d'activités antioxydants, nous avons suivi une série d'extraction avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme

Le rendement obtenu pour l'acétate d'éthyle exprimé en pourcentage est de 0,53%, équivalent de 5,32 g/l. Cette valeur est située dans l'intervalle des valeurs obtenus par plusieurs chercheurs (entre 3 et 6 g/L) [93]

Le rendement obtenu pour le chloroforme est de 0,12 % (rendement faible)

II.2.3 Dosage des polyphénols totaux

La teneur des composés phénoliques contenant dans l'extrait de margines a été calculé à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent de Phloroglucinol par gramme de margines (mg EP/g).

la courbe d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution de Phloroglucinol à des concentrations de 0.02 mg/ml à 0.07 mg/ml, et par mesure de l'absorbance par un appareil UV/VIS à 760 nm.

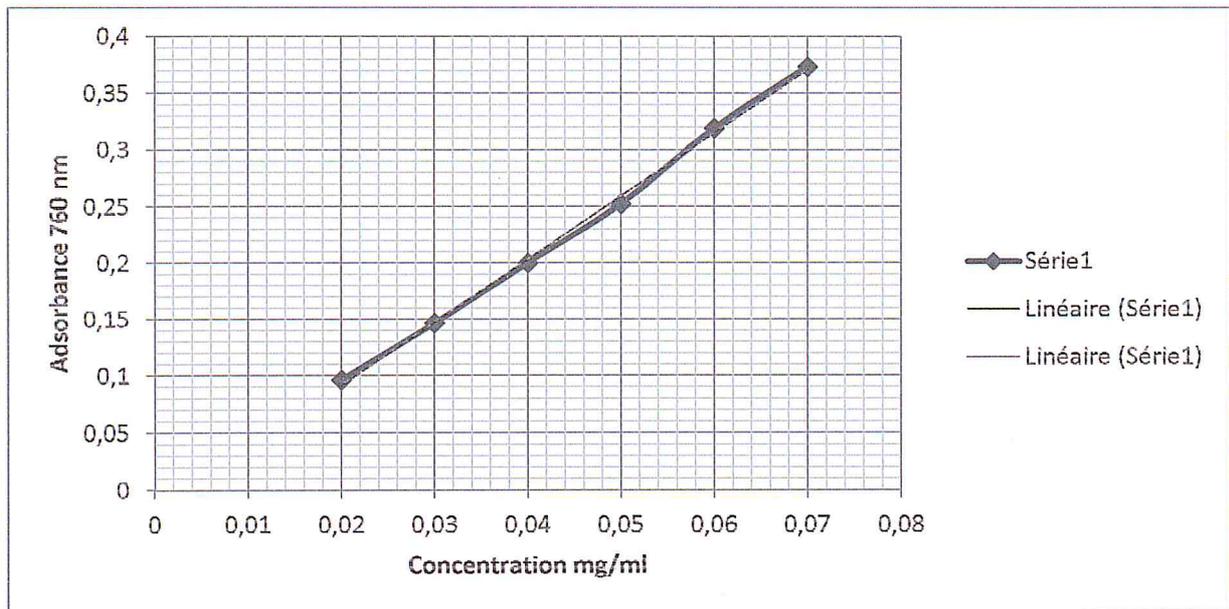


Figure 10 : Mesure de l'absorbance par rapport à la concentration de Phloroglucinol

L'absorbance enregistrés est de valeur de 0.28, en comparant avec la courbe d'étalonnage en déduit que la teneur en composés phénoliques est de 5,36 mg EP/g.

La quantité des composés phénoliques d'extrait de margines étudié dépend essentiellement des conditions citées auparavant (procède de trituration, variété d'olive, l'âge des margines, procédé d'extraction).

II.2.4 Étude cinétique de biodégradation des composés phénoliques

Les concentrations des composés phénoliques ont été calculés à partir de la courbe d'étalonnage de Phloroglucinol par la méthode de folin-ciocalteu et exprimée en milligrammes équivalent de Phloroglucinol par gramme de margines (mg EP/g).

Après 6 jours d'incubation, on a ajouté le jus de Betterave comme source de Carbone.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 11 et 12.

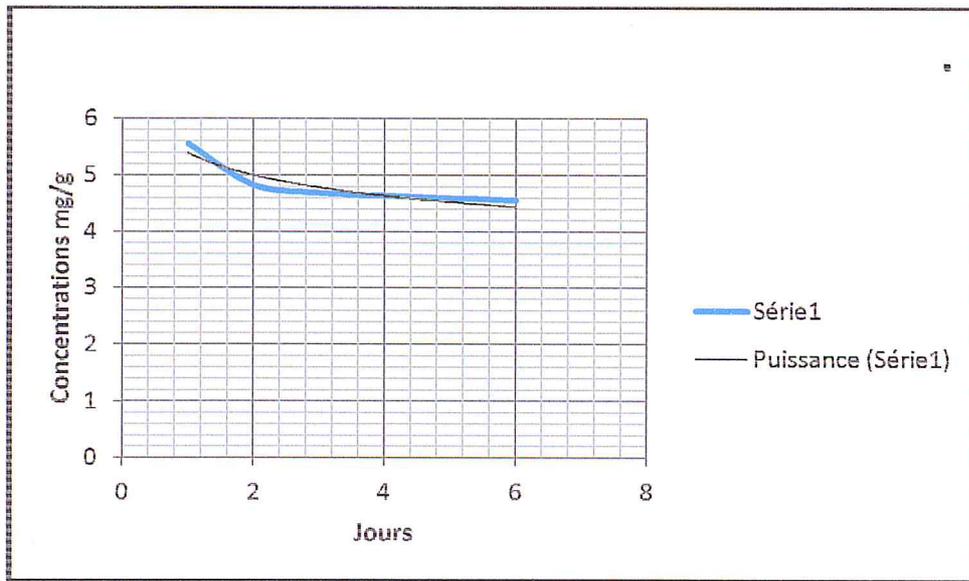


Figure 11 : Cinétique de dégradation des composés phénoliques avant l'ajout de jus de betterave

Après 6 jours d'incubation on a ajouté le jus de betterave

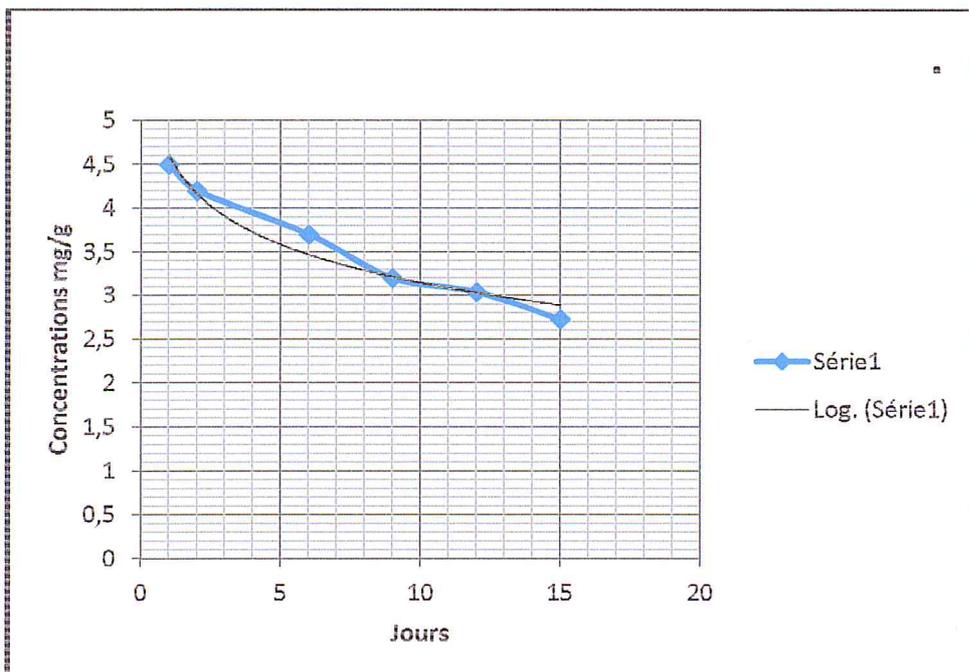


Figure 12 : Cinétique de dégradation des composés phénoliques après l'ajout de jus de betterave

La teneur initiale des margines été de 5.36 mg/g , après 4 jours d'incubation la teneur s'est diminuer de 14 % et à enregistré une valeur de 4.6 mg/g, ensuite elle est resté stable pendant deux jours.

Après 15 jours d'incubation. on a ajouté le jus de betterave, et on a enregistré une diminution de 48 % de la valeur initiale.

II.2.5 Analyse de l'extrait de margine par CG/SM

L'analyse par CG/SM dans les conditions citées précédemment (& II.1.6) nous a permis d'enregistrer un chromatogramme (fig13), qui nous a aidé a l'identification des composés regroupés dans le tableau 7

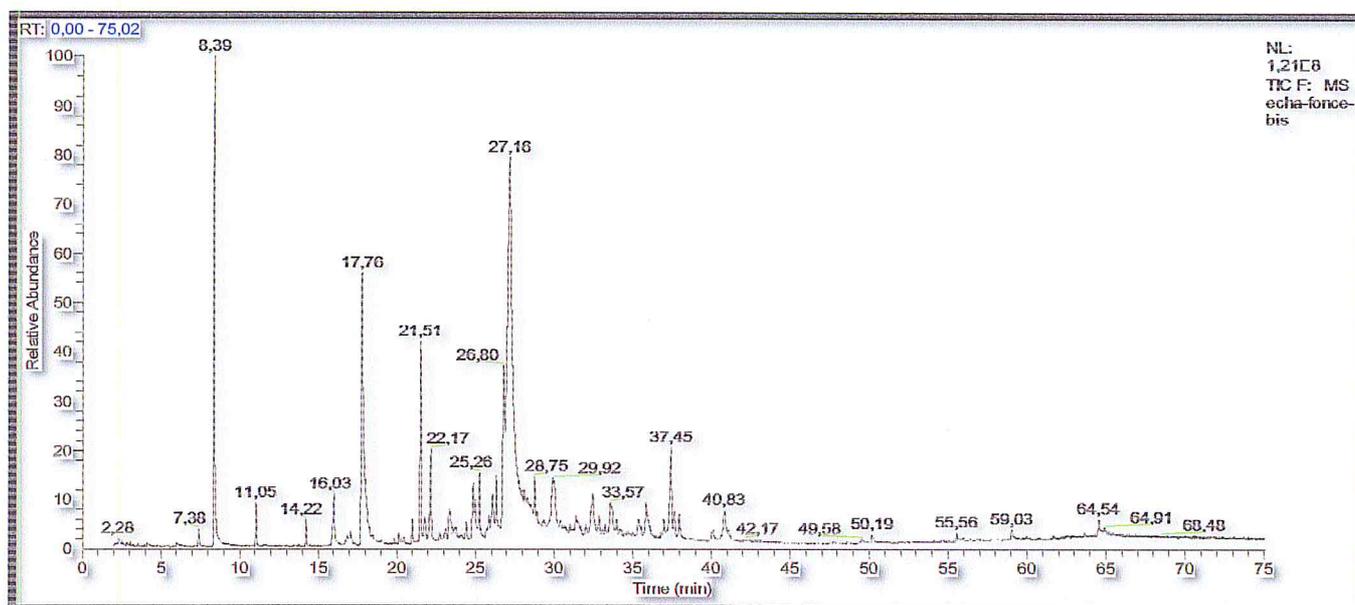
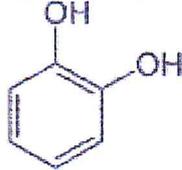
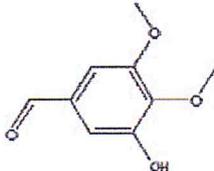
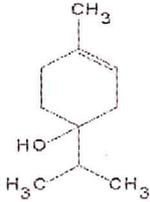
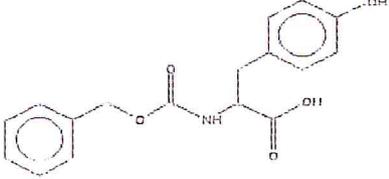
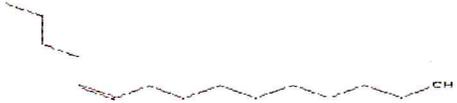
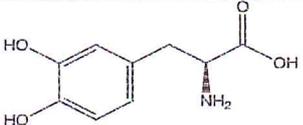
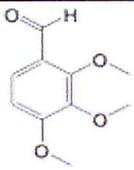


Figure 13 : Chromatogramme CG/SM de L'extrait acétate d'éthyle

Tableau 7 : Principaux composés identifiés par CG/SM dans l'extrait obtenus par AcOEt

Composés	Structure	Temps de rétention
1,2-Benzendiol		8,39
Eucalyptol		11,05
3,4dimethoxy-5-hydroxybenzaldehyde		14,23
3-cyclohexa-1-ol-4-methyl-1-(1-methylethyl)		16,03
N-Benzyloxycarbonyl-L-tyrosine		17,76
9-tetradecen-1-ol		21,51
leyodopa		27,16
2,3,4-trimethoxybenzaldehyde		37,45

II.2.6 Analyse de l'extrait acétate par chromatographie liquide couplée à la détection UV-Visible à barrettes de diodes (CLHP/DAD-UV)

L'analyse par CLHP en mode gradient montre un profil chromatographique (fig 14 et 15), caractérisé par la présence d'une zone très riche en produits polaires.

La présence de ces produits polaires est tout a fait objectif dans la mesure, ou ils sont élués par un éluant polaire, et d'autre part parce que la composition chimique de l'extrait est caractérisée par la présence de produits polaires de nature phénolique.

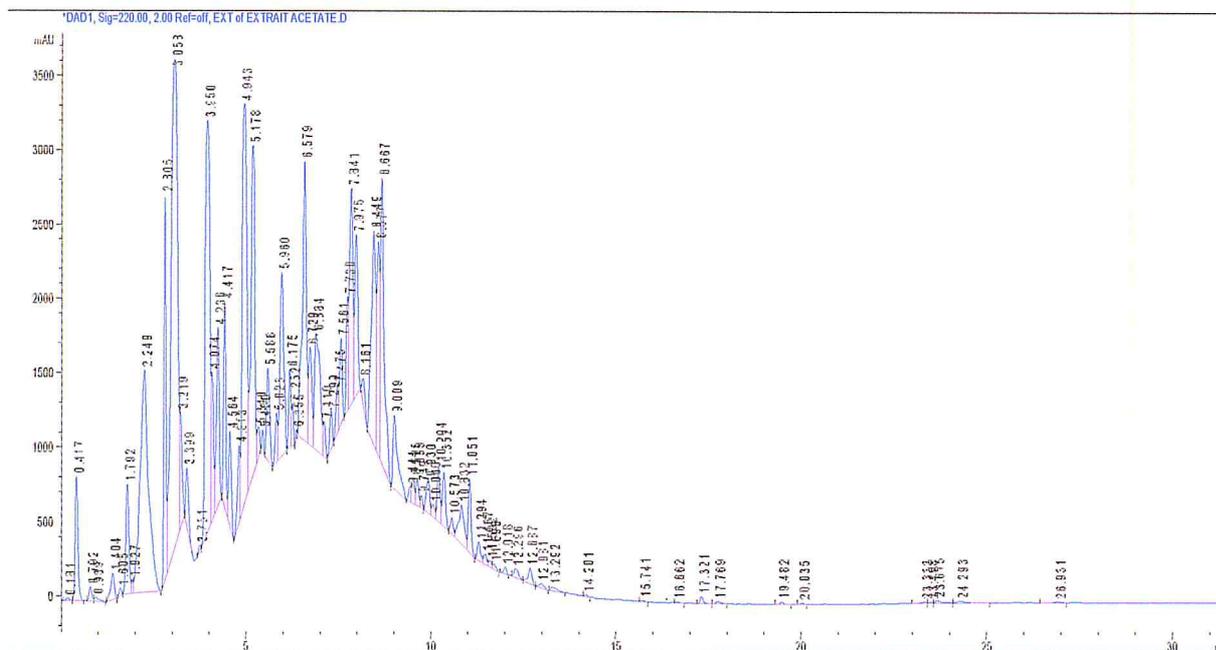


Figure 14 : Chromatogramme CLHP de l'extrait Acétate d'éthyle à 220 nm

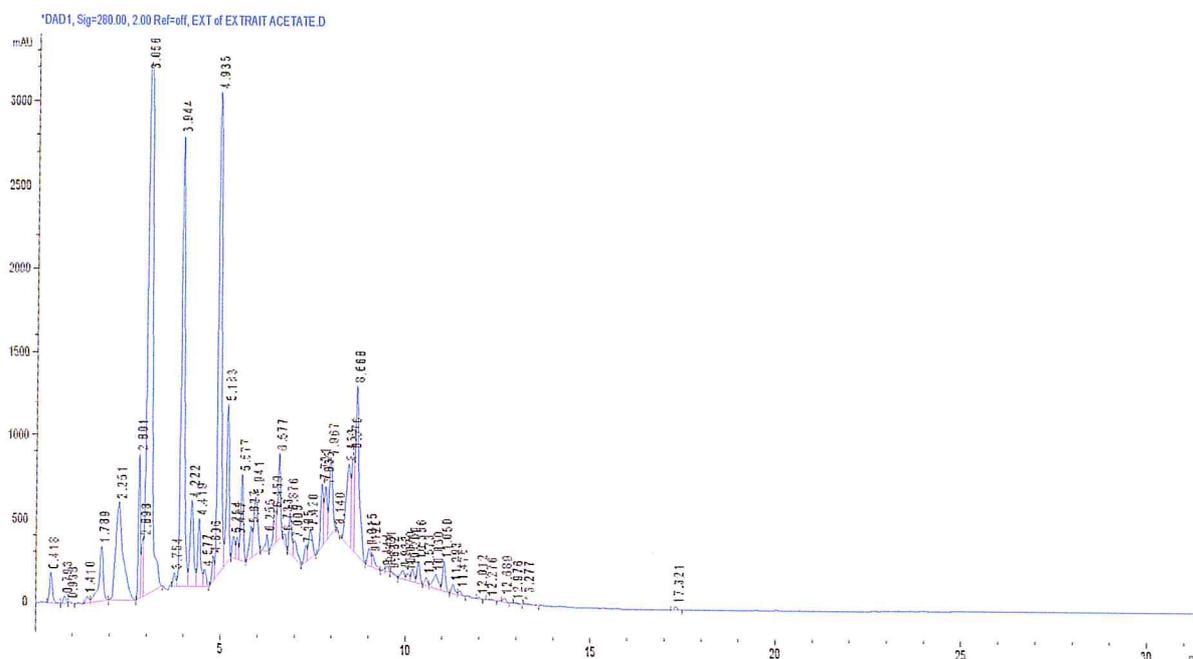


Figure 15 : Chromatogramme CLIP de l'extrait Acétate d'éthyle à 280 nm

II.2.7 Evaluation de l'activité antioxydant

L'activité antioxydant exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour notre extrait, nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre synthétique présente une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite conférée à la solution a une coloration jaune pâle (figure 16). Le virage vers cette coloration et l'intensité de la couleur jaune reflète la capacité anti-radicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule. L'absorbance est mesurée à 518 nm.

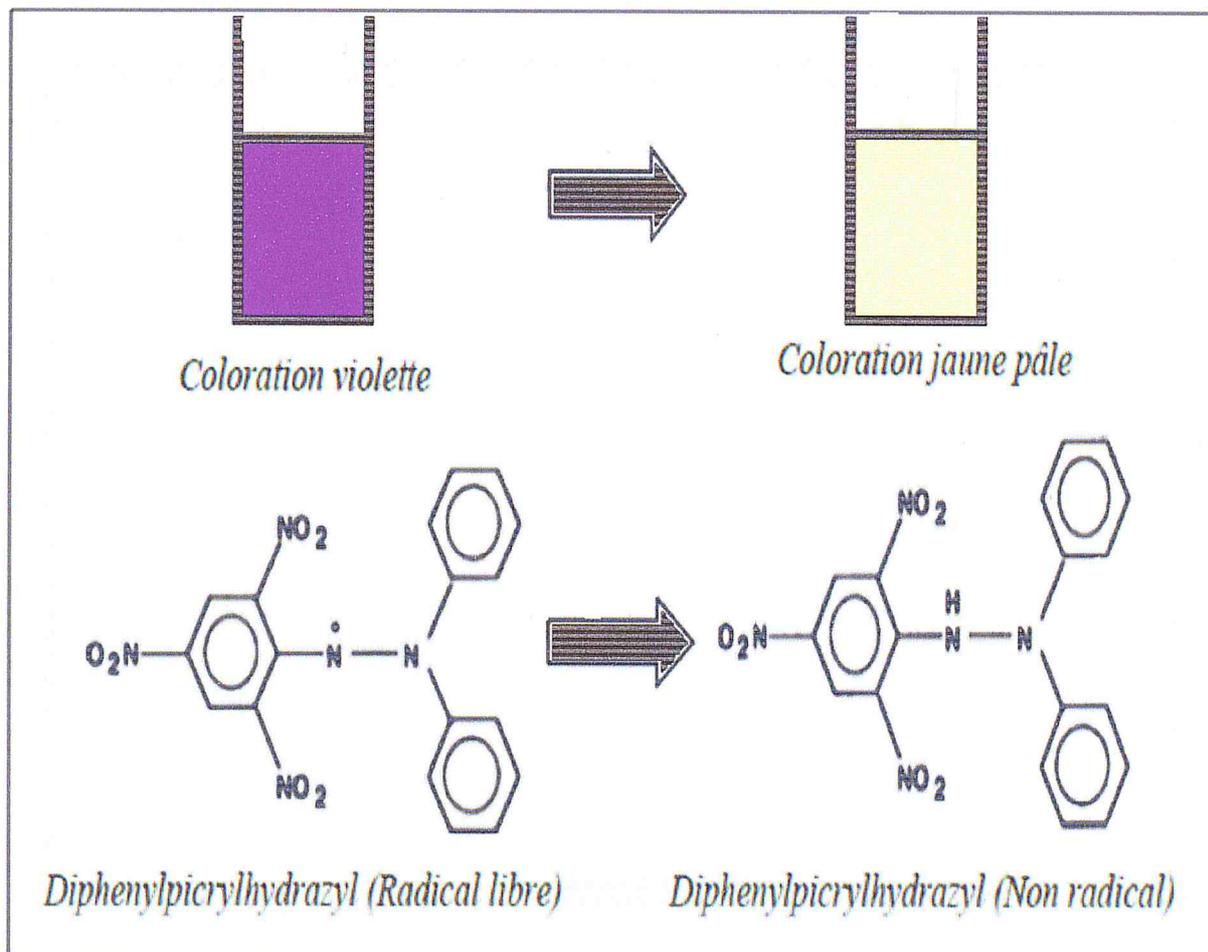


Figure 16 : Forme libre et réduite du DPPH [91]

Pour l'évaluation de cette activité, nous avons préparé une gamme d'échantillon dilués allant de 0,002 à 0,018 mg/ml. pour l'acide ascorbique, de 0,005 à 0,045 mg/ml. pour l'extrait brut.

Les différentes densités optiques ont permis de tracer une courbe d'allure exponentielle, ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel (figure 17 et 18).

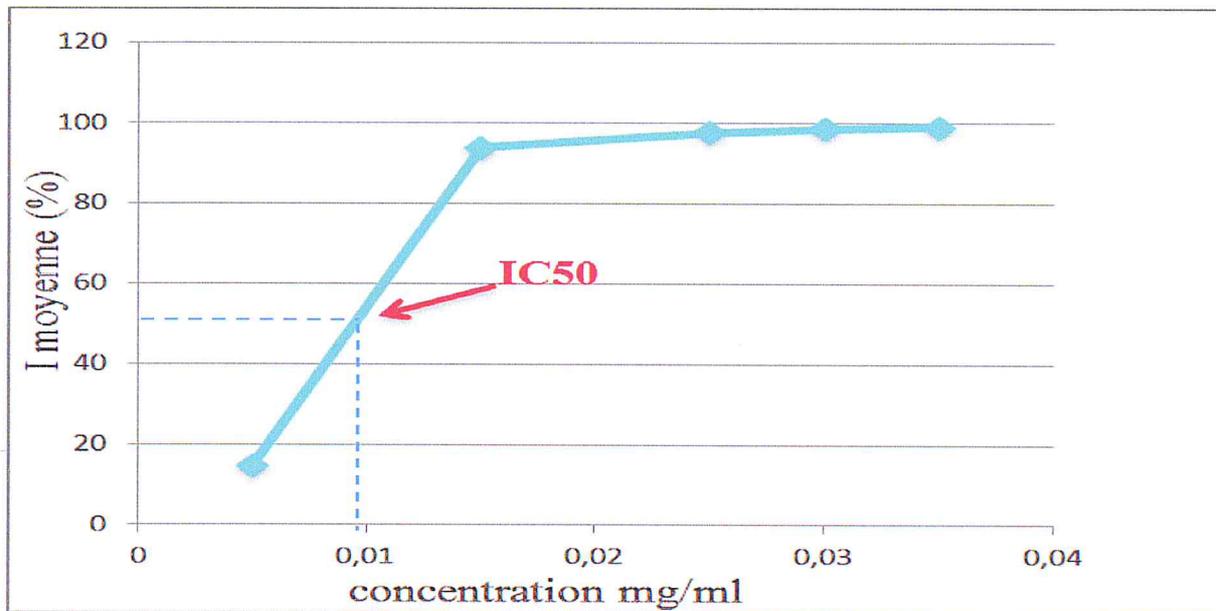


Figure 17 :Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait de margine en fonction des différentes concentrations

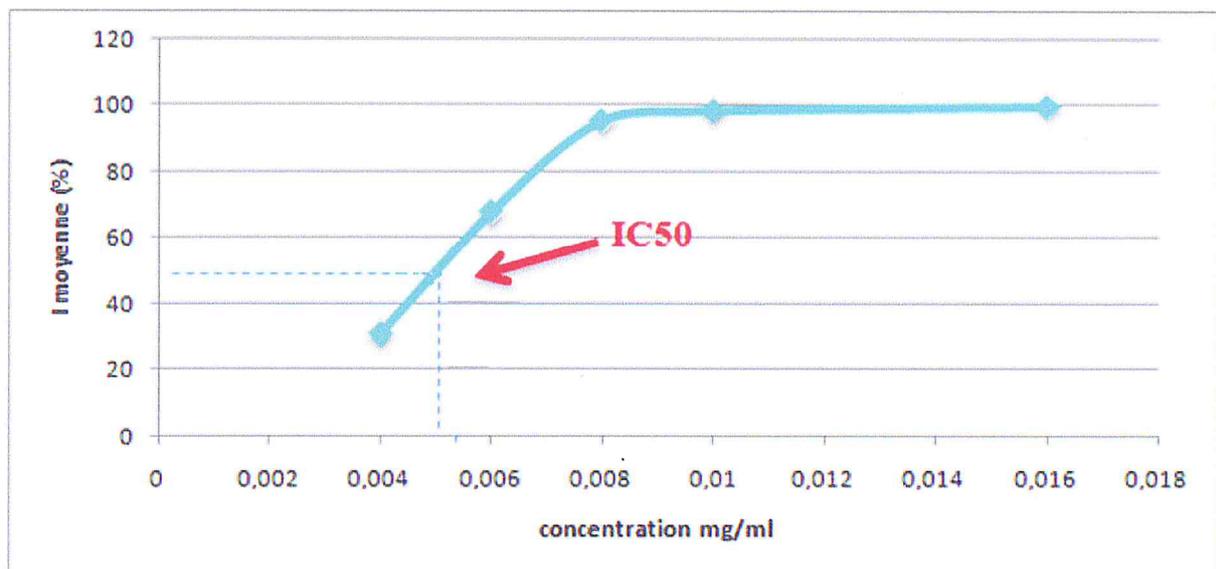


Figure 18: Variation du taux de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations

II.2.8 détermination de la valeur EC50

La EC50 a été introduit par Brand-williams et ses collaborateurs et elle a été ensuite employée par plusieurs groupes de chercheurs pour représenter leurs résultats. Elle définit la concentration efficace de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical libre « DPPH » [81].

Les EC50 de l'extrait de margine et l'antioxydant standard sont déterminées graphiquement, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonné représente l'activité antioxydant en (%). Les résultats déduits sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8: Valeurs EC50 de l'extrait de margine et l'antioxydant standard.

Composés	EC50 (µg/mL)
Extrait de margine	9,36
La vitamine C	5,03

D'après le tableau 8, nous remarquons que notre extrait possède des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes.

En fonction des résultats obtenus, nous pouvons dire que l'extrait des margines possède une bonne activité antioxydant.

CONCLUSION

La récupération des phénols prévoit un double intérêt de récupérer les molécules bioactives contenant dans les margines, d'une part, et lutter contre la pollution environnementale, d'autre part.

Notre travail est consacré à l'extraction liquide-liquide, l'analyse physico-chimique l'étude de la composition chimique de l'extrait dilué par CG-MS ainsi que l'analyse de l'extrait par CLHP, et la détermination de l'activité antioxydante de l'extrait de margine.

L'extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle nous a permis de récupérer un bon rendement de 0,53%, équivalent de 5,32 g/L. Alors que l'extraction avec le chloroforme nous a donné un rendement faible de 0,12 %.

L'analyse par CG-MS de l'extrait dilué a permis d'identifier des composés phénoliques tels que le 1,2-Benzendiol et l'Eucalyptol

L'analyse par CLHP nous a montré que l'extrait de margine est très riche en produits polaires.

Le potentiel antiradicalaire des composés phénoliques isolés a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats obtenus montrent que ces composés phénoliques possèdent une bonne activité, donc ces molécules sont considérés comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employés pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que : le cancer et les maladies cardiovasculaires.

La poursuite du présent travail pourra axer sur :

- l'extraction des phénols à partir des margines issues de diverses oléicultures algériennes ;
- la bioconversion des composés phénoliques de margines en produits utiles en agroalimentaires et en pharmacie.

- [1] M. Deiana, A. Rosa, C. Cao, F. Pirisi, G. Bandino, A. Dessi, Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: importance of α -tocopherol concentration, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 50, 4342-4346, 2002.
- [2] T.H. Gamel, A. Kiritsakis, Effect of methanol extracts of rosemary and olive vegetable water on the stability of olive oil and sunflower oil, *Grasas y Aceites*, 50, 345-350, 2001.
- [3] C. Léger, Co-produits de l'huilerie d'olive: les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques, *OCL. Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 6, 60-63, 1999.
- [4] C. Belaid, M. Kallel, B. Elleuch, Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive (margines), *Déchets sciences & technique*, 27, 30-34, 2002.
- [5] F. Visioli, A. Romani, N. Mulinacci, S. Zarini, D. Conte, F. Vincieri, C. Galli, Antioxidants and other biological activities of olive mill waste waters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3397-3401, 1999.
- [6] M. Van Aardt, S. Duncan, T. Long, S. O'Keefe, J. Marcy, S. Sims, Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: thermogravimetric analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 587-591, 2004.
- [7] A. Bianco, N. Uccella, Biophenolic components of olives, *Food Research International*, 33, 475-485, 2000.
- [8] R. Farag, G. El-Baroty, A. Basuny, The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil, *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 81-87, 2003.
- [9] B. Mompon, B. Lemaire, P. Mengal, M. Surbed, Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle, *Les colloques*, n°87, Bordeaux (France), Edition. INRA, Paris, 1998.
- [10] Faostat-FOO. (2001) Base de données agricoles
- [11] moretti MC, Comet G. (1985). Le livre de l'olivier. EDISUD
- [12] COI. (2000) Conseil Oléicole International, *Olivae* (2000).
- [13] Conseil Oléicole International (2009b). Consommation mondiale d'huile d'olive. Novembre 2009
- [14] Zimbalatti G. (1995) A new and alternative technology to reduce the pollution caused by oil mills; Seventh International Symposium on Agricultural and Food Processing Wastes (ISAFPW 95). American Society of Agricultural Engineers, 420-428.
- [15] Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1981) Différentes utilisations des margines. Actes du Séminaire International sur la valorisation des sous produits de l'olivier. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). 93-110. Tunisie.

- [16] Saoudi M.(1996) production et commercialisation d'huile d'olive en Algerie. Documentation de ministère de l'agriculture et de la pêche.
- [17] E. Tsagariki, N. Harris, Lazarides, B. P. Konstantinos, Olive mill waste water treatment, Springerlink, 133-157, 2007.
- [18] Conseil Oléicole Internationale (2009b). Indicateur macroéconomique et agricoles: L'oléiculture en Algérie
- [19] A. Bensemmane, Le trait d'union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural, 1^{er} forum méditerranéen de l'oléiculture, 1111-4762, 2009.
- [20] G.L. Francesco, Evaluations économiques sur l'innovation technologique, Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie, *Olivae*, 47, 15-20, 1993.
- [21] J. A. Morillo, B. Antizar-Ladislao, M. Monteoliva-Sánchez, A. Ramos-Cormenzana, N.J. Russell, Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes, *Applied Microbiology Biotechnology*, 82, 25–39, 2009.
- [22] A. Nefzaoui, Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous produits, *Option méditerranéennes*, 16, 101-108, 1991.
- [23] N. Benyahia, K. Zein, Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées, 2^{ème} Conférence Internationale Swiss Environmental Solution, Lausanne, Suisse, 2003.
- [23] B. Chiofalo, L. Liotta , A. Zumbo, V. Chiofalo, Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition, *Small Ruminant Research*, 55, 169–176, 2004.
- [25] A.I. Martin-Garcia, A. Moumen , D.R. Yanez-Ruiz, E. Molina-Alcaide, Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves, *Animal Feed Science and Technology*, 107, 61–74, 2003.
- [26] A. Yalcuk, N. Baldan Pakdil, S. Yaprak Turan, Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands, *Desalination*, 262, 209–214, 2010.
- [27] R. Hachicha, S Hachicha, I. Trabelsi, B. Steve Woodward, T. Mechichi, Evolution of the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: Maturity assessment of the end product, *Chemosphere*, 75, 1382–1386, 2009.
- [28] A. Yaakoubi, A. Chahlaoui, M. Rahmani, M. Elyachioui, Y. Oulhote, Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol, *Agrosolutions*, 20,1, 2009.

[29] E. Tsagariki, N. Harris, Lazarides, P.B Konstantinos, Olive mill waste water treatment, Springerlink, 133-157, 2007.

[30] S. Khoufi, F. Feki, Sayadi, Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes, Journal of Hazardous Materials, 142, 58-67, 2007.

[31] F.N. Bazoti, E. Gikas, A.L. Skaltsounis, A. Tsarbopoulos, Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters, Analytica Chimica Acta, 573–574, 258–26, 2006.

[32] Di-Giovacchino L., Mascolo A., Seghitti L. (1988) Sulle caratteristiche delle acque di vegetazione delle olive. La Rivista delle Sotanze Grasse. 65.

[33] G. Bambalov, C. Israilides, S. Tanchev, Alcohol Fermentation in olive Oil Extraction Effluents, Biological Wastes, 27, 71-75, 1989.

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

[35] M. Hamdi, Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive, Thèse de l'université de Provence, Marseille, France, 1991a.

[36] M. Hamdi, Thermoacidic precipitations of darkly coloured polyphénols of olive mill wastewaters, Environmental Technology, 14, 495-500, 1993b.

[37] L. Saez, J. Perez, J. Martinez, Low Molecular weight Phenolics Attenuation during Simulated Treatment of Wastewater from Olive Oil Mills in Evaporation Ponds, Wat. Res, 26, 1261-1266, 1992.

[38] Ramos-Cormenzana A. (1986) Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. In: Inter. Symp: On olive by-products valorisation. Sevilla-Spain. 41-60

[39] J.A. Field, G. Lettinga, Treatment and detoxification of aqueous spruce bark extracts by *Aspergillus niger*, Water Science and Technology, 24, 3/4 127-137, 1991.

[40] A. Annaki, M. Chaouch, M. Rafiq, Influence de la durée du stockage des olives sur l'évolution de la composition des margines, L'eau. L'industrie. Les nuisances, 218, 24-28, 1999b.

[41] E. Eroglu, I. Eroglu, U. Gündüz, M. Yücel, Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater, *Bioresource Technology*, 99, 6799-6808, 2008.

[42] H. El Hajjouji, G. Ait Baddi, A. Yaacoubi, H. Hamdi, P. Winterton, J.C. Revel, M. Hafidi, Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater, *Bioresource Technology*, 99, 5505-5510, 2008.

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

[44] M.G. Di Serio, B. Lanza, M.R. Mucciarella, F. Russi, E. Iannucci, P. Marfisi, A. Madeo, Effects of olive mill wastewater spreading on the physico-chemical and microbiological characteristics of soil, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62, 403-407, 2008.

[45] C. Paredes, J. Cegarra, M.P. Bernal, A. Roig, Influence of olive mill wastewater in composting and impact of the compost on a Swiss chard crop and soil properties, *Environment International*, 31, 305-312, 2005.

[47] M. Hamdi, Future prospects and constraints of olive mill waste waters use and treatment : A Review, *Bioprocess Engineering*, 8, 209-214, 1993a.

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

[49] F. Salvemini, Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercemente le acque di vegetazione delle olive, *Riv. Delle Sostanze Grasse*, 112, 559-564, 1985.

[50] M. Karapinar, M.J.T Worgan, Bioprotein production from the waste products of olive oil extraction, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 33, 185-188, 1983.

[51] R.A. Vazquez, Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile, *Revue française des corps gras*, 25 (1), 21-26, 1978.

[52] V. Balice, C. Carrieri, G. Carrieri, Trattamento chimico-fisico seguito dal biologico delle acque di vegetazione delle olive, *Ricerca*, 2, 50-53, 1979.

[53] C. Saiz-Jiménez, J.W. De Leeuw, G. Gomez Alarcom, Sludge from the waste water of the olive processing industry: A potential soil fertilizer, *Science of the total Environment*, 52, 445-452, 1987.

- [54] R. Casa, A. D'Annibale, F. Pieruccetti, S.R. Stazi, G. Giovannozzi Sermanni, B. Lo Cascio, Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability, *Chemosphere*, 50 (8), 959-66, 2003.
- [55] A. D'Annibale, S.R. Stazi, V. Vinciguerra, G. Giovannozzi, Oxiraneimmobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater, *Journal of Biotechnology*, 77 (2-3), 265-73, 2000.
- [56] A. D'Annibale, R. Casa, F. Pieruccetti, M. Ricci, R. Marabottini, *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability, *Chemosphere*, 54, 887-894, 2004.
- [57] H. El Hajjouji, N. Fakharedine, G.A. Baddi, P. Winterton, J.R. Bailly, J.C. Revel, M. Hafidi, Treatment of olive mill waste water by aerobic biodegradation: an analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy, *Bioresource Technology*, 98, 3513-3520, 2007.
- [58] I. Fki, N. Allouche, S. Sayadi, The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants, *Food Chemistry*, 93, 197-204, 2004.
- [59] F.E. Ergül, S. Sargin, G. Ongen, F.V. Sukan, Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, 1-6, 2009.
- [60] S. Azabou, W. Najjar, A. Gargoubi, A. Ghorbel, S. Sayadi, Catalytic wet peroxide photo-oxidation of phenolic olive oil mill wastewater contaminants: Part II. Degradation and detoxification of low-molecular mass phenolic compounds in model and real effluent, *Applied Catalysis B: Environmental*, 77, 166-174, 2007.
- [61] R.A. Vazquez, D.R. Maestro, C.E. Graciani, Compentes fenolicos de la aceituna. II. Polifenoles del alpechin, *Grasas y Aceites*, 25, 341-345, 1974.
- [62] A. Cichelli, M. Solinas, I composti fenolici delle olive e dell'olivo di oliva, *Riv. Merceol.*, 23, 55-69, 1984.
- [63] P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, Les polyphénols en agroalimentaire, Ed Lavoisier, 2-10, 2006.
- [64] Tanchev S., Joncheva N., Genov N., Codounis M. (1980) Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna*, 4, 5-73.

- [65] Balice V., Boari G., CERA O., Abbaticchio P. (1982) Indagine analitica sulle acque di vegetazione. Nota 1., Inquinamento, 7, 49-53
- [66] N. Didry, M. pinkas, M. Torck, sur la composition chimique et l'activité antibactériennes des feuilles de diverses espèces de *grindelia*, PI. Med. Phytoter, XVI, 7-15, 1982.
- [67] H. Ravn, C. Andary, G. Kovacs, P. Molgaard, caffeic acid ester as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria-and fungi, Biochem. Syst. Ecol, 17, 175-184, 1984.
- [68] F. Hayase, M. Kato, antioxidant compounds of sweet potatoes, Journal of Nutrition and Science Vitaminol, 30, 37-46, 1994.
- [69] Vercauteren J, Cheze C, Triaud J. (1998). Polyphenol. 18th international conference on polyphenos, N° 87. Ed. IRNA
- [70] Francesco GL. (1993). Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. Olivae. 74, 15-20.
- [71] J.F. Turrens, A. Alexandre, AL. Lehninger, Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria, Archives of Biochemistry and Biophysics , 237, 408-414, 1985.
- [72] B. Halliwell, How to characterize a biological antioxidant, Free Radical Research Commun, 9, 1-32, 1999.
- [73] Ross R. (1990). Atherosclerosis , an inflammatory disease. New England Journal of Medecine. 340 (2)pp 115-126
- [74] Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P. & Ghadirian P. (2003). Assesment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: a case control Study. Internatinal journal of Epidemiology. 32 (2)pp 200-209
- [75] Viera O, Laranjinha J, Madeira V (1998). Cholesterly ester hydroperoxyde formation in myoglobin-catalysed low density lipoprotein oxidation: concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascobate. Biochemical Pharmacology. 55 (3) pp 333-340
- [76] Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolite secondaire d'importance économique). Edition technique e documentation, Lavoisier.
- [77] Capasso R. (1997) The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. Curr. Top. Phytochem., Res. Trends, 1, 145-156.

- [78] E. De Marco., M. Savarese., A. Paduano et R. Sacchi, Characterisation and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chemistry*. 104: 858–867,(2007).
- [79] F. Visioli., A. Romani., N. Mulinacci ., S. Zarini ., D. Conte., F. Vincieri *et al*, Antioxidants and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 : 3397-3401,(1999).
- [80] G. Miliauskas, P.R. Venskutonis, T.A. Van Beek, screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract, *food chemistry*. 85,231-237, 2004.
- [81] Rodier J. (1996). *L'analyse de l'eau*, 8^{ème} édition. Dunod, Paris. France.
- [82] Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- [83] S. Sayadi, R. Ellouz, Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters, *Journal of Chemistry and Biotechnology*, 57,141-146, 1993.
- [84] Aissam, H. (2003). *Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase*. Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Dhar El Mehraz, Fes.
- [85] Murphy J., Riley J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Annal. Chim. Acta.*, 127.
- [86] Assas N., Marouani L., Hamdi M. (2000) Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum* *Bioprocess Engineering*, 22 (6), 503-507.
- [87] Balice V., Carrieri C., Carrieri G. (1997) *Trattamento chimico-fisico seguito dal biologico delle aque di vegetazione delle olive*, *Ricerca*, 2, 50-53.
- [88] Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi A., Zaid A., Borja R. (2003) Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International biodeterioration & biodegradation*, 51, 37-41.
- [89] Annaki A., Chaouch M., Rafiq M. (1999a) *Elimination des margines par évaporation naturelle*. *L'eau, L'industrie, Les nuisances*, 1, 99-107.
- [90] Capasso R., De Martino A., Cristinzio G. (2002b) Production, characterization, and effects on tomato of humic acid-like polymerin metal derivatives from olive oil mill waste waters. *J Agric Food Chem.*, 50 (14), 4018-24.

[91] A.M. Klibanov, T.M. Tu, K.P. Scott, Peroxidase catalysed removal of phenols from coal-conversion wastewater's, Science, 22, 259-261, 1983.

[92] C. Sanchez-Moreno, Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, Food Science and Technology International, 8 (3), 121-137, 2002.

[93] K. Al-Malah, M.O.J. Azzam, N.I. Abu-Lail, Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay, Separation and Purification Technology, 20, 225-234, 2002.

