

F.S.D. N° D'ordre ..

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

ABABSIA Naima

En vue d'obtenir le diplôme de Master

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

Titre

**ETUDE PHYTOCHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES DES
POLYPHENOLS EXTRAITS À PARTIR DES MARGINES**

Encadrée par : professeur **A.Badis** (université de Blida)

Promotion 2011/2012

Dédicace

Je dédie ce travail à :

La mémoire de mon père qui aurait été si fier de moi.

Mon adorable mère pour son soutien et ses encouragements et son sourire qui m'a tant réchauffé. Puise Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Ma grand-mère pour leur encouragement.

A mes très chères sœurs : Zineb et Djamila.

A mes très chères frères : Walid, Mohamed et Yassine.

A mes très chères amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université: Selma, Meriem, Zineb, Soumia et Amina.

A mes collègues de laboratoire : Dalila, Hamida, Selma, Djamila, Naima E, Naima K, Khadija, Nour, Soumia et Karima, Pour les moments inoubliables qu'on a passé ensemble.

A mes amies de lycée : Sarah, Kawther, Houda, Soumia, Tima, Imen, Amel, Fatiha.

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, je vous dois le meilleur accueil que vous m'avez réservé dans votre laboratoire, et la mise à ma disposition 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 n'oublie pas de remercier monsieur **Y. BOUTOUMI** docteur à l'université de Blida pour m'aider par leur connaissance.*

*Je remercie monsieur **A. BADIS** professeur à l'université de Blida pour avoir accepté de m'encadrer.*

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 **N. BOUZIDI** docteur à l'université de Blida et madame **S. KASMI** docteur à l'université de Blida, responsable de master de chimie des produits naturels pour leurs gentillesse et pour leurs aide dans tous les moments où j'en avais besoin.*

*Je remercie monsieur **A. SAIBA** docteur à l'université de Medea pour l'aide qu'il m'a apportée dans la correction de ce mémoire.*

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de la photochimie et l'activité antioxydant et antimicrobienne des polyphénols extraites à partir des margines de huilière de Sidi Abdelkader de la wilaya de Blida.

Dans cette étude, ces polyphénols ont été extraits afin de les valoriser en tant que 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 gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de la fraction volatile de l'extrait de *marginé* nous a permis d'identifier quelques composés phénoliques avec un taux de 20% et 43% d'acide gras, et cette dernière permet d'identifier quelques phénols contenant dans l'extrait de *marginé* à savoir ; tyrosol 29%, et l'alcool homovanilique 4%.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode de diffusion des disques et a montré une forte activité contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et contre la levure *Candida albicans*.

Mots clé : Margines, extrait, polyphénols, activités antioxydants et antimicrobiennes, CG-MS.

Abstract

Our work focuses on the study of photochemical, antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols extracted from olive mill wastewater (OMW) of Maâsra of Sidi Abdelkader, Blida (Algiers).

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

The GC-MS analysis of the volatile fraction of extract of olive mill wastewater allows us to identify a phenol with a rate of 20% and 43% of fatty acid, and this later allow identifies some phenol containing in the extracted of olive mill wastewater, as: tyrosol 29% and alcohol homovanillyl 4%.

The evaluation of antimicrobial activity was performed by the disk diffusion method and showed a high activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and against the yeast *Candida albicans*.

Keywords: Olive mill wastewater, extract, polyphenols, activity antioxidants and antimicrobials, GC-MS.

ملخص

عملنا يركز على دراسة الكيمياء الضوئية والنشاطات المضادة للأكسدة و الميكروبات للبوليفينول المستخرجة من المارجين المتواجدة في معصرة سيدي عبد القادر، البليدة-الجزائر.

على الرغم من احتوائها على مكونات ملوثة، المارجين المستخرجة من زيت الزيتون تعتبر كمصدر غني جدا بمضادات الأكسدة الطبيعية البوليفينول.

في هذه الدراسة تم استخراج البوليفينول من أجل استخدامها و تطويرها كمضادات أكسدة طبيعية، من أجل ذلك قمنا باختبار محاصرة الجذور الحرة لمستخلص المارجين و مقارنته مع مضاد أكسدة اصطناعي، حمض الأسكوربيك (فيتامين C).

إن التحليل بتقنية الكروماتوغرافيا الغازية المزدوجة مع مطيافية الكتلة للأجزاء الطيارة لمستخلص المارجين أظهرت وجود بعض المركبات الفينولية بنسبة (20 %) و الأحماض الدهنية (43 %)، كما أظهرت لنا وجود بعض الفينول مثل التيغيزول بنسبة (29 %) و الأوموفانيليل كحول بنسبة (4 %) في مستخلص المارجين.

تم تقييم النشاطات المضادة للميكروبات باستعمال طريقة الانتشار القرصي و قد أظهرت وجود نشاط عال ضد الايشريشيا القولية، المكورات العنقودية الدهنية، و الزائفة الزنجارية و ضد خميرة المبيضات البيض.

الكلمات المفتاحية : المارجين، مستخلص، البوليفينول، النشاطات المضادة للأكسدة و للميكروبات، الكروماتوغرافيا الغازية المزدوجة مع مطيافية الكتلة.

Table des matières

Dédicaces
Remerciement
Résumé

Abstract

ملخص

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Secteur oléique en Algérie.....	4
I.1.1 Système d'extraction l'huile d'olive.....	4
I.1.2 Sous produits de l'oléiculture.....	4
I.2 Les margines.....	6
I.2.1 Définition.....	6
I.2.2 Origine de margine.....	6
I.2.3 Origine de coloration.....	6
I.2.4 Caractérisation physico-chimique des margines.....	7
I.2.4.1 pH, conductivité et matière sèche.....	8
I.2.4.2 Fraction minérale.....	8
I.2.4.3 Fraction organique.....	9
a. Sucres.....	9
b. Composés azotés.....	9
c. Vitamines.....	9
d. Acide organiques.....	10
e. Huiles.....	10
f. Composés phénoliques.....	10
I.3 Les composés phénoliques	12
I.3.1 Généralités	12
I.3.2 Biosynthèse des composés phénoliques.....	13
I.3.2.1 La voie de schikimate.....	13
I.3.2.2 La voie de phénylpropaoide.....	14
I.3.3 Principales classes des composés phénoliques.....	15
I.3.3.1 Les acides phénoliques simples.....	15
a. Acides hydroxybenzoïques.....	15
b. Acides hydroxycinnamiques.....	16
I.3.4 Intérêt biologiques des flavonoïdes et des composés phénoliques.....	17

I.4 Antioxydant et Radicaux libre.....	17
I.4.1 Radicaux libre.....	17
I.4.1.1 Définition	17
I.4.1.2 Natures des radicaux libres.....	18
a. Espèces réactives dérivée de l'oxygène.....	18
b. Espèces libre non oxygénées.....	18
I.4.2 Les antioxydants.....	19
I.4.2.1 Définition.....	19
I.4.2.2 Utilisation des antioxydants.....	19
I.4.2.3 Classifications.....	19
a. Antioxydants de synthèse.....	19
b. Antioxydants d'origine végétal	20

Chapitre II : Etude expérimental

II. Partie 1 : Matériels et méthodes

II.1.1 Introduction.....	22
II.1.2 Echantillonnage.....	22
II.1.3 Acidité des margines (pH)	23
II.1.4 Extraction des polyphénols des margines	23
II.1.4.1 Extraction des lipides	23
II.1.4.2 Extraction avec l'acétate d'éthyle des composés phénoliques	23
II.1.4.3 Rendement en extrait	24
II.1.5 Dosage des polyphénols totaux	25
II.1.6 Préparation de la fraction volatile de l'extrait.....	26
II.1.6.1 Description du dispositif d'extraction	26
II.1.6.2 Extraction liquide-liquide de la fraction volatile	27
II.1.7 Analyses physico-chimiques de l'extrait de margine	27
II.1.7.1 Mesure des indices physiques.....	27
a. Détermination de la densité	27
II.1.7.2 Mesure des indices chimiques.....	27
a. Indice d'acide.....	27
b. Indice d'ester	28
II.1.8 Analyse de la fraction volatile par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	29
II.1.8.1 Description de l'appareil	29
II.1.8.2 Condition opératoire.....	29
II.1.9 L'évaluation de l'activité antioxydants des composés phénoliques.....	29
II.1.9.1 Piégeage du radical libre DPPH.....	30
II.1.10 Evaluation de l'activité antimicrobienne	32
II.1.10.1 L'aromatogramme.....	32

II.1.10.2 Souches microbienne choisies.....	33
---	----

II. Partie 2 : résultats et discussions

II.2.1 Acidité (pH)	35
II.2.2 Rendement en extrait de margine.....	35
II.2.3 Propriétés organoleptiques de l'extrait de margine.....	35
II.2.4 Caractéristiques physico-chimiques de l'extrait de margine.....	35
II.2.5 Dosage des polyphénols totaux.....	36
II.2.6 Etude analytique de la fraction volatile et l'extrait dilué par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	36
II.2.7 Evaluation de l'activité antioxydant.....	43
II.2.8 Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	45
Conclusion.....	49

Annexe

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure I.1. Processus d'extraction de l-huile d'olive.....	5
Figure I.2. La voie de shikimate.....	14
Figure I.3. La voie de phénylpropanoïde.....	15
Figure II.1. échantillon de margine	23
Figure II.2. Extraction liquide-liquide de l'extrait des margine.....	24
Figure II.3. Organigramme de l'extraction et du dosage des polyphénols totaux.....	26
Figure II.4. Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau de l'extrait	27
Figure II.5. Structure chimique du radical libre DPPH.....	31
Figure II.6. Illustration de la méthode des chromatogramme sur boîte de pétri.....	33
Figure II.7. Représentation de la Composition chimique de la fraction volatile.....	39
Figure II.8. Représentation de la composition chimique de l'extrait de margine.....	42
Figure II.9. Forme libre et réduit du DPPH.....	43
Figure II.10. Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait de margine en fonction des différentes concentrations.....	44
Figure II.11. Variation du taux de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations.....	44
Figure II.12. Chromatogramme de <i>S. aureus</i> avec l'extrait des margine.....	46
Figure II.13. Chromatogramme de <i>P. aeruginosa</i> avec l'extrait des margine.....	46
Figure II.14. Chromatogramme de <i>E. coli</i> avec l'extrait des margine	47
Figure II.15 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de l'extrait de margine sur les différents souches ATCC	47
Figure II.16. Chromatogramme de <i>C. albicans</i> avec l'extrait des margine	48

Liste des tableaux

Tableau I.1. Structure des monomères phénoliques rencontrés dans les margine.....	11
Tableau I.2. Principaux acides hydroxybenzoïque.....	16
Tableau I.3. Principaux acides hydroxycinnamique.....	16
Tableau I.4. Activités biologique des composés phénoliques.....	17
Tableau II.1. Les références des souches microbiennes.....	33
Tableau II.2. Propriétés organoleptique de l'extrait de margine.....	35
Tableau II.3. Caractéristiques physico-chimiques de l'extrait des margine.....	35
Tableau II.4. Composition chimique de la fraction volatile.....	36
Tableau II.5. Composition chimique de l'extrait de margine.....	40
Tableau II.6. Valeurs EC50 de l'extrait des margine et l'antioxydant standard.....	45
Tableau II.7. diamètres des zones d'inhibition du développement des déférentes bactéries sur Muller Hinton	46
Tableau II.8. Diamètres des zones d'inhibition du développement de <i>C. albicans</i>	48

Liste des abréviations

DCO : demande chimique en oxygène

PP : polyphénols

ERO : espèces réactives dérivées de l'oxygène

CG/MS : chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

FCR : folin-ciocalteu

MgEAG : milligramme Equivalent d'acide gallique

µg: microgramme

IC50 : concentration inhibitrice de 50%

tr : temps de rétention

INTRODUCTION GENERALE

L'oléiculture représente une des plus anciennes activités agricoles dans le bassin méditerranéen [1]. Pour ces pays, la production d'huile d'olive est une fortune économique transmise sur plusieurs générations [2]. Toutefois, elle présente l'inconvénient de générer d'énormes quantités de margines dont la fraction organique complexe et la demande chimique en oxygène (DCO) élevée les rendent un déchet industriel gravement polluant [3].

Actuellement, avec la promotion des vertus bénéfiques de l'huile d'olive pour la santé humaine, sa demande ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît constamment [4]. Le rejet des effluents des huileries d'olive constitue jusqu'à présent un redoutable souci écologique dans la région méditerranéenne [5]. Les usines dotées d'équipements modernes produisent de grandes quantités de margines (6-7 millions tonnes/an) [6] pouvant atteindre 80-110% du lot initial d'olives, tandis qu'avec des dispositifs traditionnels, la production de margines est de 50% [7].

La problématique posée par les margines réside principalement dans leur teneur élevée en polyphénols (18- 125 mg/g) [8] dépassant même dix fois plus celle de la phase huileuse [9]. D'une part, ces composés difficilement biodégradables empêchent les cycles biologiques dans le sol et souillent dans les eaux naturelles [10]. Cependant, les polyphénols récupérés des rejets ont montré des propriétés antimicrobiennes, hypolipidémiques, hypocholestérolémiantes et anticancérigènes [7]. Plus particulièrement, ces polyphénols sont identifiés comme des antioxydants naturels de la famille des antioxydants phénoliques largement utilisés en agroalimentaire [11]. Les antioxydants naturels et synthétiques sont utilisés pour retarder la détérioration oxydative des lipides surtout des huiles végétales raffinées sensibles à l'oxydation [12].

Récemment, le consommateur tend à rejeter tous les additifs alimentaires y compris les antioxydants synthétiques qui sont suspectés d'effets toxiques, sensibilisants, allergènes et cancérigènes [13]. Néanmoins, il a une préférence pour tout ce qui est naturel [14]. De ce fait, l'industrie agroalimentaire développe l'utilisation des antioxydants naturels et surtout leur incorporation dans les huiles [15]. A l'heure actuelle, les polyphénols attirent l'intérêt des chercheurs afin de trouver de nouvelles

matières premières abondamment disponibles [16]. 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'olives où nous sommes intéressés à l'extraction des composés phénoliques, et par l'étude chimique et biologiques des extraits phénoliques pour une éventuelle application dans le secteur pharmaceutique et/ou agroalimentaires.

Le travail effectué est présenté dans ce mémoire en deux chapitres :

Chapitre I : synthèse bibliographique (secteur oléicole en Algérie, les margines, les composés phénoliques et les antioxydants et les radicaux libres).

Chapitre II : étude expérimentale sur l'extraction, l'analyse et la détermination des tests antioxydants et les activités microbiologiques des polyphénols. Ce chapitre est organisé en deux parties : Matériel et méthodes et résultats et discussion.

Chapitre I

Synthèse

Bibliographique

I.1 Secteur oléicole en Algérie

Le patrimoine oléicole mondial compte actuellement environ 750 millions d'oliviers cultivés sur une superficie de 9,23 millions d'hectares. Les pays méditerranéens comptent 715 millions d'oliviers sur une superficie d'environ 8.16 millions d'hectares, soit 95 % du patrimoine oléicole mondial [17-19].

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est très adéquat à la culture de l'olivier. Elle 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 [19]. Le patrimoine oléicole algérien est estimé à 32 millions d'oliviers, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. La production annuelle en huile a atteint 35000 tonnes et celle de l'olive de table 80000 tonnes [20].

I.1.1 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 [21].

Trois systèmes d'extraction sont à présent utilisés (figure I.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) [22].

I.1.2 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 [23].

✚ Margines ou eaux de végétation : sont des effluents liquides, parfois appelés alpechines [24]. Le pressage de 1 tonne d'olives produit en moyenne 1,5 tonnes de margines avec les modes de production modernes [25].

✚ 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

à des concentrations variables suivant la maturité des olives et la conservation des margines [42]. Cette fraction phénolique renferme deux groupes de composés :

- ✦ Composés de poids moléculaires inférieur à 2.10^4 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 [43].
- ✦ Composés phénoliques de poids moléculaire supérieur à 2.10^4 responsables de la coloration noire des margines. Ce sont des polymères phénoliques obtenus après oxydation des polyphénols du premier groupe [43,44].

Cette 2^{ème} catégorie semble constituer une forme de la lignine (pseudolignine). Selon Hamdi [43], 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 [43,44].
- ✦ La biodégradation naturelle des polyphénols du premier groupe.

Ces phénomènes de biodégradation et de polymérisation des tanins et des anthocyanes ont été signalés aussi par Field et Lettinga [45].

I.2.4 Caractérisation physico-chimique des margines

Les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre à noire [41]. Leur pH est acide (4 - 5,5) avec un fort pouvoir tampon et une odeur fétide qui se développe au fur et à mesure que les margines vieillissent [41,46,47]. Elles ont généralement une forte salinité due à l'ajout important de sel pour la conservation des olives (conductivité supérieure à 10 mS.cm^{-1}) [48,49]. La composition des margines a été étudiée par plusieurs chercheurs et comporte approximativement 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matières organiques et 0,4 à 2,5% de substances minérales [41,50].

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 [39,40] :

- ✚ 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 [50-52].

I.2.4.1 pH, conductivité et matière sèche

Les margines ont un pH acide avec des valeurs comprises entre 4,2 et 5,9 [54]. Lors des traitements biologiques des margines, une correction du pH peut s'avérer nécessaire [55]. La chaux vive a été souvent utilisée pour ajuster le pH des margines. En effet, Ranalli [56] rapporte qu'il faut 1 kg de chaux par 1 m³ d'effluent afin de faire augmenter le pH d'un point.

La conductivité électrique est étroitement liée à la concentration des substances dissoutes et à leur nature. Dans le cas des margines, les valeurs de cette conductivité varient entre 18 et 50 ms.cm⁻¹ [57]. Cette mesure ne donne pas forcément une idée immédiate sur la charge minérale du milieu [58]. 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 [36].

I.2.4.2 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). D'après Fiestas et Borja [41], les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%).

I.2.4.3 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 [42].
- ✚ Fraction soluble dans la phase aqueuse et contient les sucres, les lipides, les acides organiques et les composés phénoliques [42].

a. Sucres

Les études effectuées sur les margines par Hamdi *et al.* [60], 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% [61].

La présence d'autres sucres simples tels que : glucose, saccharose, mannose, arabinose, raffinose et xylose a été également signalée par Salvimini [59].

b. Composés azotés

La fraction azotée est représentée principalement par les protéines avec une concentration variant 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 [59,62].

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 [59].

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 [63,59].

e. Lipides

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) [53]. L'acide oléique est l'acide gras le plus abondant avec un pourcentage de 65% par rapport à la totalité d'huile [41].

f. Composés phénoliques

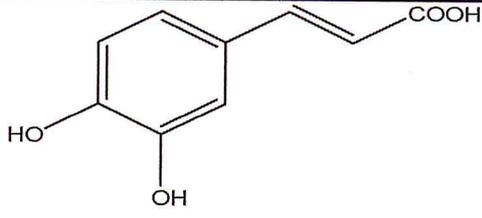
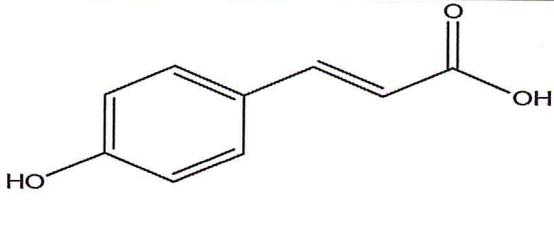
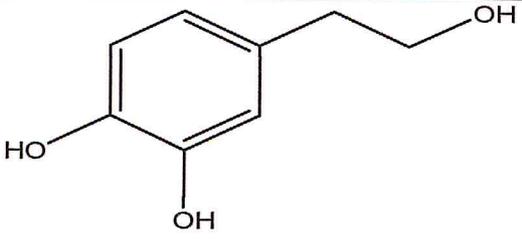
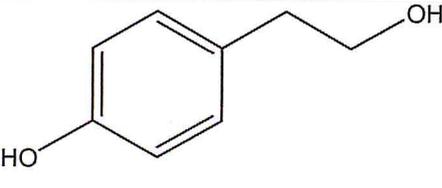
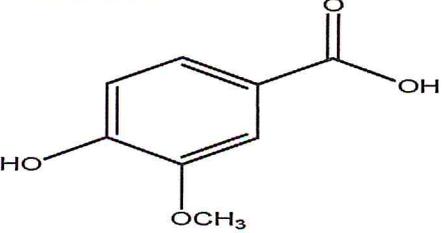
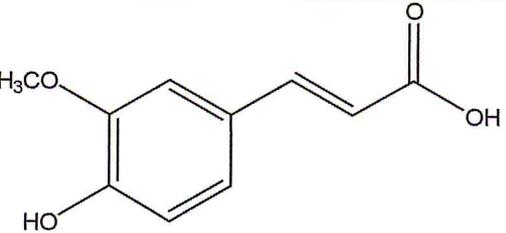
Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines [41]. Les caractéristiques organoleptiques de l'huile d'olive vierge dépendent de la présence des composés phénoliques et des substances volatiles [64].

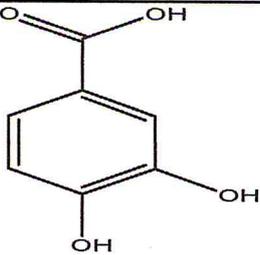
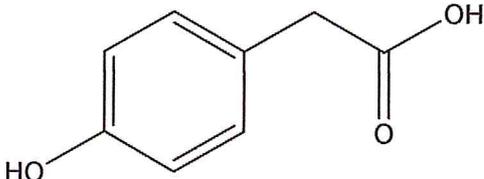
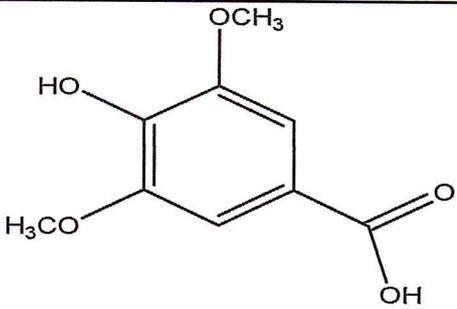
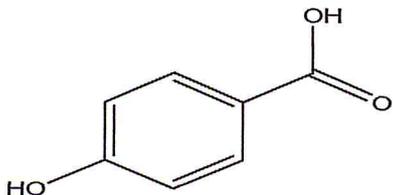
La teneur en composés phénoliques dans les margines dépend du système d'extraction, le procédé de trituration, la variété d'olives et l'âge des margines [52]. En général, elle varie entre 3 et 5 g.L⁻¹ [49,65-70] et elle peut même dépasser 9 g.L⁻¹ [71-75].

La composition des margines en composés phénoliques diffère aussi selon la procédure d'extraction et la variété d'olive traitée [50]. Plus de 50 composés phénoliques ont été identifiés [69,76-79].

Les monomères les plus rencontrés dans les margines sont présentés dans le Tableau I.1.

Tableau I.1 Structure des monomères phénoliques rencontrés dans les margines.

Composés phénoliques	Structure	Références
Acide caféique		[80,81]
Acide <i>p</i>-coumarique		[80,81]
Hydroxytyrosol		[82,83]
Tyrosol		[82,83]
Acide vanillique		[84]
Acide ferrulique		[80,82]

<p>Acide protocatéchuique</p>		<p>[85,86,87]</p>
<p>Acide 4-hydroxy-phénylacétique</p>		<p>[86,87]</p>
<p>Acide syringique</p>		<p>[86,87]</p>
<p>Acide p-hydroxybenzoïque</p>		<p>[86,87]</p>

Suite tableau I.1

I.3 Les composés phénoliques

I.3.1 Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles [88]. La structure des composés

phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) [89]. Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées [88].

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel [89]. D'un point de vue application, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) [89].

I.3.2 Biosynthèse des composés phénoliques

I.3.2.1 La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde [90]. La figure I.2 représente la voie de shikimate

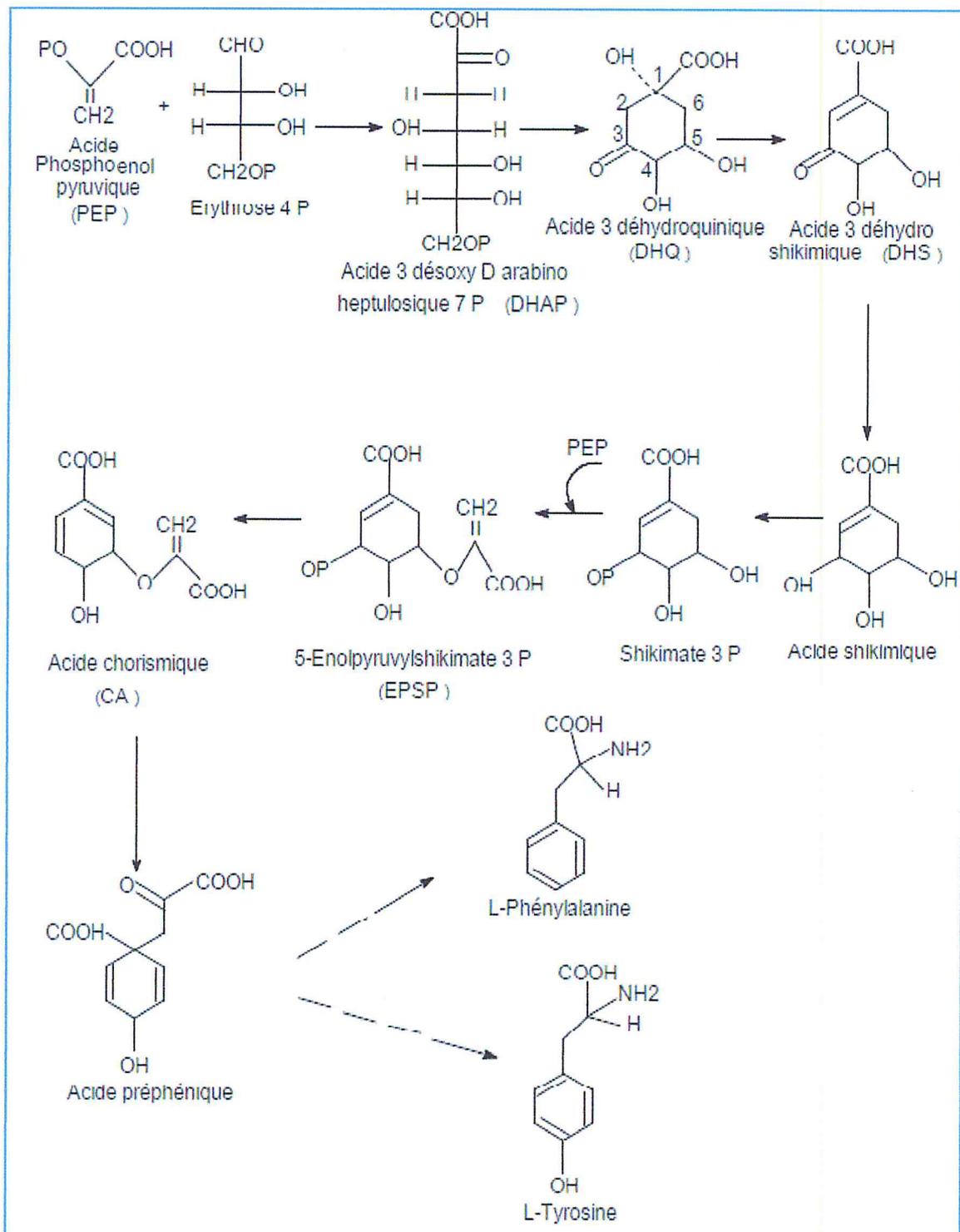


Figure I.2 La voie de shikimate de biosynthèse des composés phénoliques [91].

I.3.2.2 La voie de phénylpropanoïde

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose.

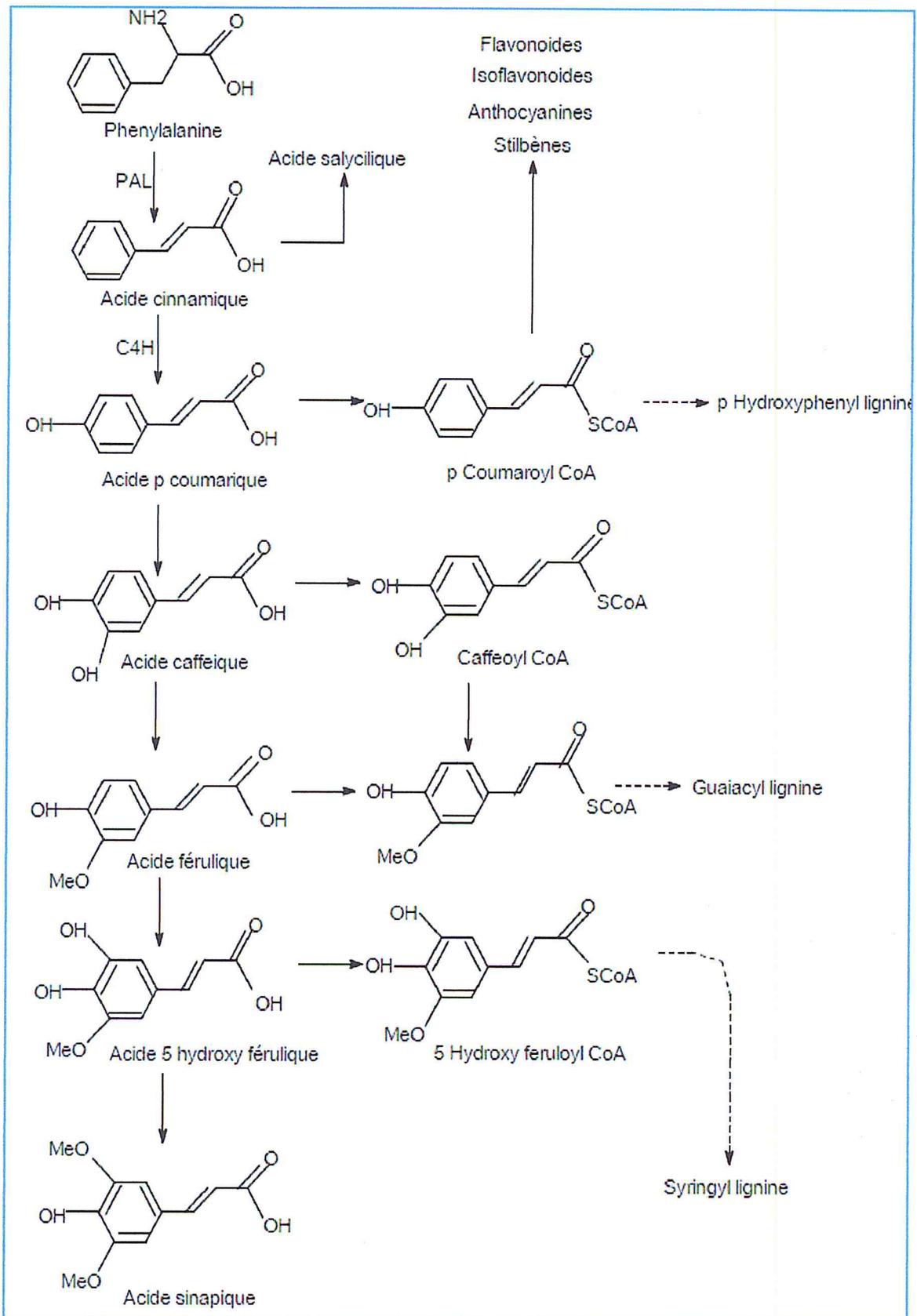


Figure I.3 La voie de phénylpropanoïde de biosynthèse des composés phénoliques [92].

I.3.3 Principales classes des composés phénoliques

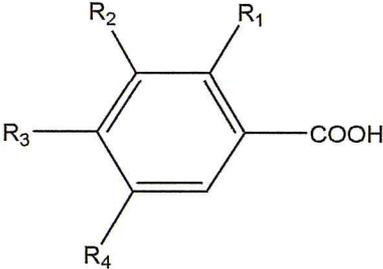
I.3.3.1 Les acides phénoliques simples

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 I.2.

Tableau I.2 Les principaux acides hydroxybenzoïques [93].

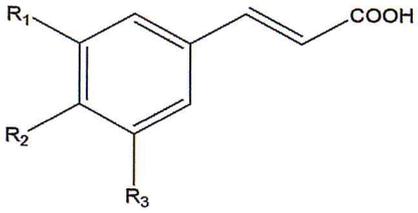
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy-Benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

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 I.3 représente les principaux acides hydroxycinnamiques.

Tableau I.3 Les principaux acides hydroxycinnamiques [93].

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.3.4 Intérêt biologique des composés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent un grand intérêt dans le domaine agroalimentaire et pharmacologique. Le tableau I.4 représente les principales activités des acides phénoliques.

Tableau I.4 Activités biologiques des composés polyphénols.

Polyphénols	Activités	Références
Acides phénols	-Antibactériens	[94]
(Cinnamique et	-Antifongique	[95]
benzoïque)	-Antioxydants	[96]

I.4 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 et 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.4.1 Radicaux libres

I.4.1.1 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 [97] :

- ✚ 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.4.1.2 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^\cdot)* : 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.

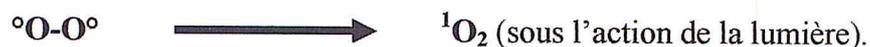


- Dans l'oxydation des lipides, la réaction de Fenton peut s'écrire de la manière suivante :



- *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.4.2 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.4.2.1 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 [98].

I.4.2.2 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.4.2.3 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.

Chapitre II

Etude Expérimentale

II.1 MATERIEL ET METHODES

II.1.1 Introduction

Cette partie est consacrée à l'étude des caractéristiques chimiques et des activités antioxydants et microbiologiques de l'extrait de margine. Elle est scindée en quatre sous-parties : L'extraction de l'extrait de margine (extraction liquide-liquide), la détermination des indices physico-chimiques, l'analyse de sa composition chimique par CG/SM, la détermination des tests antioxydants et l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait obtenu.

L'extraction, la détermination des indices physico-chimiques et le test d'activité antioxydant (méthode de DPPH) ont été réalisés au laboratoire de chimie des substances naturelles (département de Chimie, Université Saad Dahlab), alors que l'analyse de l'extrait par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au sein du laboratoire MAPIEM de l'Université du Sud Toulon-Var (France). Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés au sein de l'unité biochimie du l'hôpital de Boufarik.

II.1.2 Echantillonnage

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 sont obtenues à partir de l'est et de l'ouest du payé et même à Blida. 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 Blida, Algérie. La collecte a été réalisée pendant la période de cueillette hivernale (janvier 2012).

L'échantillon est introduit dans des bidons en polypropylène et une fois au laboratoire, il est stocké à l'obscurité dans un environnement non oxygéné à +4 °C. La figure II.1 représente l'échantillon de margine utilisée pour l'expérimentation.



Figure II.1 Echantillon de margine prélevé à partir de huilière de Sidi Abdelkadar (Blida)

II.1.3 Mesure du pH

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre de type EUTECH INSTRUMENTS.

II.1.4 Extraction des polyphénols de margines

Une seule méthode d'extraction a été effectuée au cours de nos expériences : extraction liquide-liquide. Elle consiste en la délipidation des margines et récupération des composés phénoliques [99,100].

II.1.4.1 Extraction des lipides

Après avoir aspiré le surnageant d'huile 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 aqueux et un culot.

Dans une ampoule à décanter de capacité 250 mL, une prise d'essai de 50 mL de la phase aqueux 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.1.4.2 Extraction avec l'acétate d'éthyle des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est effectuée dans une autre ampoule à décanter de 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. Le dispositif d'extraction liquide-liquide est donné par la photo de la figure II.2.

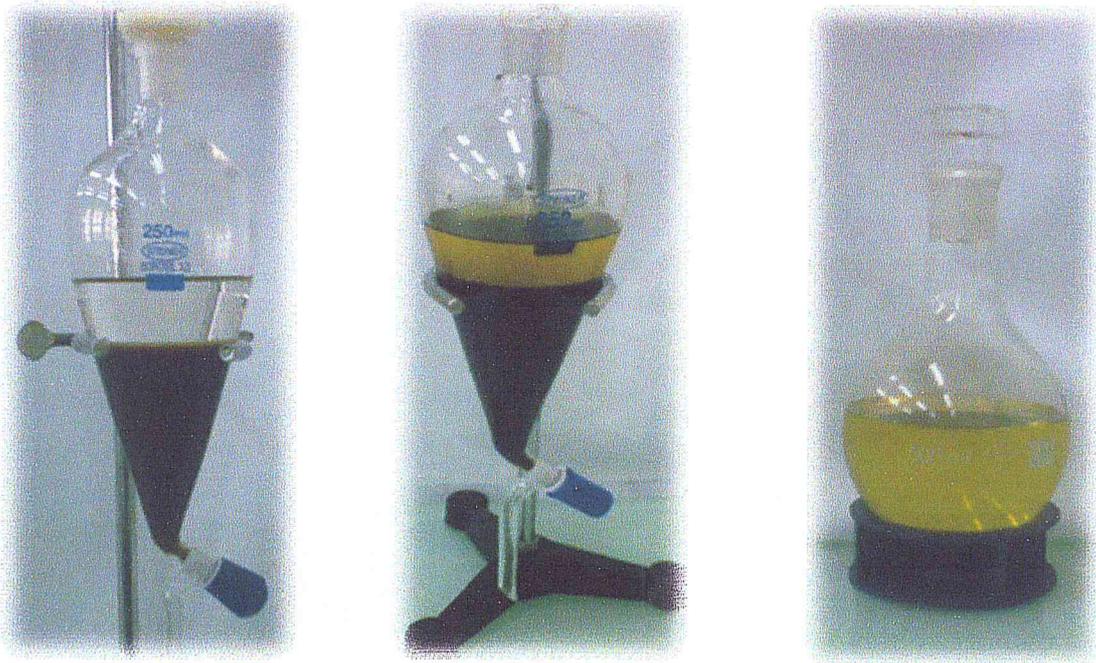


Figure II.2. Les différentes étapes appliquées pour l'extraction liquide-liquide de l'extrait de margine.

II.1.4.3 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_{ml} : masse de la matière utilisée.

II.1.5 Dosage des polyphénols totaux

II.1.5.1 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 ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation, il réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présentes dans l'extrait analyse [101].

II.1.5.2 Mode opératoire

- ✓ Introduire 2 mL de l'extrait dilué de margine dans une fiole de 25 mL ;
- ✓ Ajouter 1 mL du réactif Folin-Ciocalteu ;
- ✓ Ajouter 10 mL d'eau distillée ;
- ✓ Après 2 min ajouter 12 mL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 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 l'acide gallique 1-hydraté ($C_7H_6O_5 \cdot H_2O$), 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 acide gallique/g d'extrait de thé).

c : concentration d'acide gallique (mg/mL).

V : volume de l'extrait (mL).

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



Figure II.4 Montage de l'entraînement à la vapeur de l'extrait.

II.1.6.2 Extraction liquide-liquide de la fraction volatile

L'hydrolat obtenu est extrait avec un volume d'éther diéthylique, nous obtenons ainsi deux phases : une phase organique contenant la fraction volatile et une phase aqueuse. La phase organique obtenue est filtrée par un papier filtre contenant du sulfate de magnésium pour éliminer toute trace d'eau puis nous procédons à l'évaporation du solvant.

II.1.7 Analyses physico-chimiques de l'extrait de margine (AFNOR).

II.1.7.1 Mesure des indices physiques

a. Détermination de la densité

La densité est définie comme étant la masse volumique de l'extrait rapportée à celle de l'eau pour une température donnée.

La mesure a été faite à l'aide d'un pycnomètre en utilisant la méthode de dilution.

II.1.7.2 Mesure des indices chimiques

a. Indice d'acide

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'extrait. Il est déterminé par la méthode suivante :

- Dans un ballon ou une fiole introduire la prise d'essai (0,2 g), puis ajouter 5 mL d'éthanol (95%) et 5 gouttes de solution de rouge de méthyle (0,2%),
- Neutraliser le liquide avec la solution d'éthanol d'hydroxyde de potassium (0,1 mole/L), contenue dans une burette, jusqu'à obtention d'une couleur rose foncé (voir annexe),

- L'indice est donc donné par la formule :

$$IA = \frac{5,61 * V}{m}$$

IA : indice d'acide.

V : volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée.

m : masse, en grammes, de la prise d'essai.

Remarque : nous pouvons réserver éventuellement le ballon et son contenu pour la détermination de l'indice d'ester.

b. Indice d'ester

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters dans 1 g d'extrait. Son principe est basé sur l'hydrolyse des esters par chauffage, en présence d'une solution d'éthanol titrée d'hydroxyde de potassium, et dosage de l'excès d'alcali par une solution titrée. Il est déterminé par la méthode suivante :

- Dans le ballon, contenant la solution provenant de l'indice d'acide, ajouter 25 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0,5 mole/L, ensuite adapter le réfrigérant et le placer sur le chauffe ballon et le laisser chauffer pendant une heure,
- Laisser refroidir, puis démonter le réfrigérant et ajouter 20 mL d'eau puis 5 gouttes de la solution de phénolphaléine à 0,2%,
- Titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique (0,5 mole/L) jusqu'à la disparition de la couleur rose foncé (voir annexe),

- Parallèlement, effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions, en remplaçant la solution provenant de l'indice d'acide par 5 mL d'éthanol.

L'indice est calculé par la formule :

$$IE = \frac{28,05}{m} \times (V_0 - V_1) - IA$$

IE : indice d'ester.

V₀ : volume (mm) de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc.

V₁ : volume (mm) de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination.

m : masse (g) de la prise d'essai.

IA : Indice d'acide.

II.1.8 Analyse de la fraction volatile et de l'extrait de margine par CG/SM

II.1.8.1 Description de l'appareil

L'analyse qualitative de la composition chimique de la fraction volatile et l'extrait a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM ». L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k.l. (comprenant, respectivement, des spectres de masse 75000 molécules), avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.

II.1.8.2 Conditions opératoires

L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HEWLETT-PACKARD-HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972 (voir annexe), dont les conditions sont les suivantes :

- ✓ Une colonne capillaire de type HP1 (polydiméthylsiloxane 100%), de longueur 30 m d'un diamètre interne de 0,25 mm et une épaisseur du film de 0,25 µm.
- ✓ un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 0,3 mL/mn.
- ✓ Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale a 70 eV.
- ✓ La programmation du four est : 80 °C (3') - 5°C/mn - 280°C (10').
- ✓ Injection d'une quantité de 4 µL en mode Split : 1/90.
- ✓ Les échantillons de la fraction volatile sont dilués dans l'acétate d'éthyle à 1%.

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

Dans notre travail 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 opté pour la méthode qui utilise le DPPH (figure II.5) comme un 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 antioxydants 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.

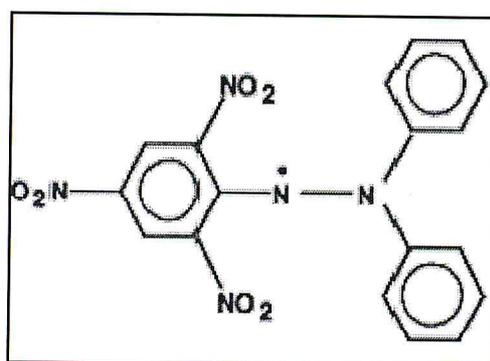


Figure II.5. Structure chimique du radical libre DPPH•

Selon le protocole d'écrit par [114] avec quelque modification ; 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 du méthanol. L'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

Dans des tubes secs et stériles, nous introduisons 1 mL du méthanol et les différentes concentrations de la solution à tester, 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 exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constituée de méthanol et de la solution de DPPH.

- **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 antioxydant, 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 antioxydant « AA% » est donnée par la formule suivante :

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

Soit :

AA : Activité antioxydant.

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.1.10 Evaluation de l'activité antimicrobienne

II.1.10.1 L'aromatogramme

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et facilement reproductible [116].

L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques (figure II.6) [117].

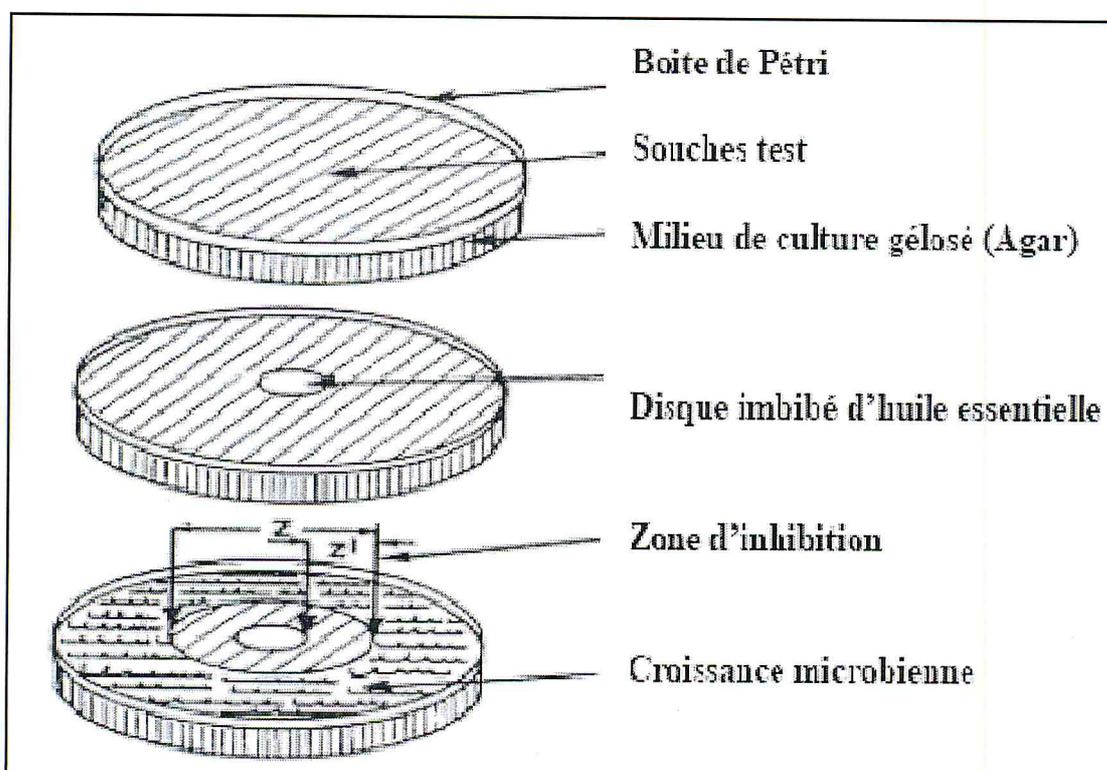


Figure II.6 Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri [117].

II.1.10.2 Souches microbiennes choisies

Les souches utilisées pour les tests antimicrobiens sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* pour l'activité antibactérienne et *Candida albicans* pour l'activité antifongique (antilevure) qui ont été utilisées dans les tests d'antibiogrammes au niveau de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de Boufarik.

Tableau II.1 Les références des souches microbiennes.

Forme en état frais	Nom	Référence	Gram
Bacille	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Négatif
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	
Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Positif
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC	

Le protocole expérimental utilisé est le suivant [118]:

- ✓ **Repiquage des espèces bactériennes** : les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.
- ✓ **Préparation de l'inoculum** : des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 mL de bouillon nutritif puis portées à l'incubation pendant 18 à 24 h à 37 °C.
- ✓ **Préparation des disques** : des disques de 9 mm de diamètre, stériles, sont chargés de l'extrait naturel à tester.
- ✓ **Préparation des milieux de culture** : la gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage pour l'activité antibactérienne et Sabouraud pour l'activité antifongique, elles sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur est de 4 mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.
- ✓ **Ensemencement** : des boîtes de Pétri stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalement à l'aide d'un étaloir, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

L'activité antibactérienne est antifongique sont déterminée par la mesure avec précision des diamètres de zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée, produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37 °C pour les bactéries, et après 48 h d'incubation à 25 °C pour les levures.

II.2 RESULTATS ET DISCUSSION

II.2.1 Acidité de margine (pH)

La mesure du pH de margines à donnée une valeur de l'ordre de 5,18. Les margines sont donc des effluents acides en raison de la présence des acides organiques (acides phénoliques, acides gras, ...etc.).

II.2.2 Rendement en extrait de margines

Dans le but de valoriser des composés phénoliques contenant dans les margines et faire des analyses physico-chimiques, des tests d'activité antioxydants et antimicrobiennes, nous avons suivi une série d'extraction ou le rapport d'extraction égal à 1 (1 : 1).

Le rendement obtenu exprimé en pourcentage est de 0,48%, équivalent de 4,82 g/L. Cette valeur est située dans l'intervalle des valeurs obtenus par plusieurs chercheurs (entre 3 et 5 g/L) [49,66-71].

II.2.3 Propriétés organoleptiques de l'extrait de margine

L'extrait de margine obtenu par extraction liquide-liquide présente les caractères organoleptiques regroupés dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Propriétés organoleptiques de l'extrait de margines

Aspect	Couleur	Odeur
Liquide visqueux	Brune	Caractéristique à l'huile d'olive

II.2.4 Caractéristiques physico-chimiques de l'extrait de margines

Les résultats des analyses physico-chimiques sont donnés dans le tableau II.3.

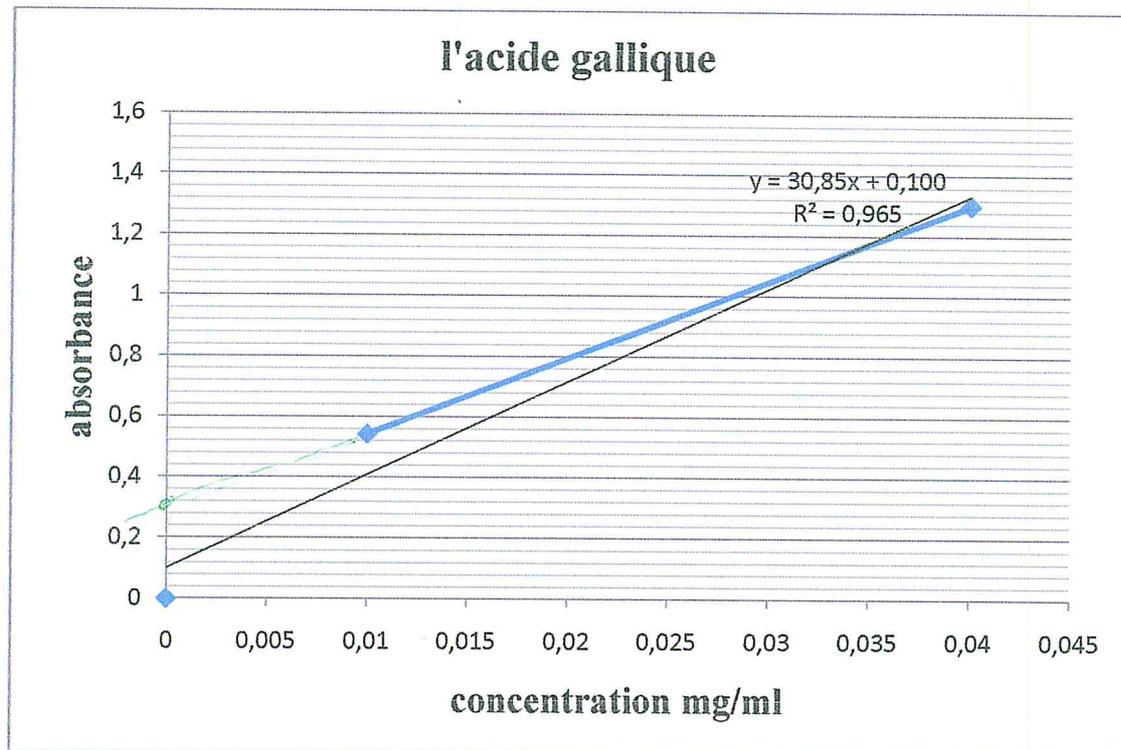
Tableau II.3 Caractéristiques physico-chimiques de l'extrait de margine.

Densité	Indice d'acide	Indice de saponification	Indice d'ester
0,79	19,91	39,27	19,36

II.2.5 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 d'acide gallique par gramme de margines (mg EAG/g). La teneur obtenue est 3,65 mg EAG/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).



Courbe d'étalonnage des composés phénoliques

II.2.6 Etude analytique de la fraction volatile et de l'extrait dilué de margine par CG/SM

La fraction volatile de l'extrait de margine extraite par entrainement à la vapeur et l'extrait dilué ont fait l'objet d'une analyse chromatographique.

L'analyse par CG/SM dans les conditions citées auparavant (II.1.7.2) a permis l'identification des composés regroupés dans les tableaux II.4 et II.5.

Tableau II.4 Composition chimique de la fraction volatile de l'extrait de margine.

Ordre d'élution	Tr (min)	Noms des composés	Formules Chimiques	% de L'aire
1	7,85	Benzène éthanol	C ₈ H ₁₀ O	1,44
2	9,38	4-éthyle phénol	C ₈ H ₁₀ O	2,521
3	9,56	Acide benzoïque	C ₇ H ₆ O ₂	1,92
4	12,27	NI*(1)	/	1,09
5	14,20	Eugénol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1,504
6	14,29	NI*(2)	/	1,755
7	15,17	4-éthyle-1,3-bénzenediol	C ₈ H ₁₀ O ₂	8,702
8	15,96	4-hydroxyphényl-éthanol (tyrosol)	C ₈ H ₁₀ O ₂	0,96
9	16,55	NI*(3)	/	1,294
10	16,92	NI*(4)	/	1,497
11	17,99	NI*(5)	/	1,780
12	18,59	3-methoxy-2-methylphénol	C ₈ H ₁₀ O ₂	2,008
13	19,89	NI*(6)	/	2,293
14	20,76	NI*(7)	/	1,613
15	20,87	NI*(8)	/	1,681
16	21,11	NI*(9)	/	1,302
17	21,43	NI*(10)	/	2,582
18	21,59	2-furanméthanol, tétrahydro- α,α -5 triméthyl-5-(4-méthyl-3-cyclohexen-1-yl	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	6,061
19	21,67	NI*(11)	/	1,605
20	22,17	NI*(12)	/	4,862

21	22,82	NI*(13)	/	1,029
22	23,05	NI*(14)	/	0,708
23	23,14	NI*(15)	/	1,066
24	24,70	NI*(16)	/	4,797
25	25,06	Miristate d'isopropyl	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	10,927
26	27,75	Acide hexadécanoïque	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	6,241
27	28,28	Acide hexadécanoïque, éthyle ester	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1,422
28	30,17	Acide -9-octadécanoïque, Méthyle ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	1,415
29	30,91	Acide -9-hexadécanoïque, Méthyle ester	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	8,254
30	31,20	7-méthyle-3,4-octadiène -2-chloroéthyle	C ₂₀ H ₃₅ ClO ₂	2,725
31	31,34	Oléate d'éthyle	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	12,923

NI* : non identifier

Les données de spectre de masse des produits inconnus de la fraction volatile sont présentées sous forme de **m/z (abondance en %)** pour les principaux fragments.

NI*(1) : 41 (68%), 44 (78%), 55 (46%), 60 (100%), 129 (14%).

NI*(2) : 41 (71%), 44 (70%), 67 (100%), 99 (95%), 164 (3%).

NI*(3) : 43 (79%), 70 (42%), 126 (100%), 138 (21%), 195 (4%).

NI*(4) : 43 (88%), 55 (48%), 107 (50%), 126 (100%), 195 (4%).

NI*(5) : 43 (72%), 69 (36%), 125 (35%), 154 (100%), 208 (4%).

NI*(6) : 41 (56%), 44 (80%), 109 (100%), 123 (26%), 196 (4%)

NI*(7) : 41 (57%), 43 (100%), 71 (97%), 95 (30%), 179 (4%)

NI*(8) : 41 (59%), 43 (100%), 60 (46%), 102 (25%), 201 (11%)

NI*(9) : 41 (44%), 43 (100%), 55 (30%), 119 (80%), 192 (9%)

NI*(10) : 43 (76%), 55 (44%), 93 (38%), 121 (100%), 212 (2%)
 NI*(11) : 41 (48%), 43 (100%), 71 (43%), 143 (55%), 179 (5%)
 NI*(12) : 41 (76%), 79 (47%), 125 (100%), 166 (24%), 212 (2%)
 NI*(13) : 41 (80%), 44 (100%), 79 (42%), 123 (56%), 179 (99%)
 NI*(14) : 41 (68%), 44 (77%), 77 (47%), 123 (100%), 204 (12%)
 NI*(15) : 41 (70%), 44 (79%), 77 (69%), 123 (100%), 179 (14%)
 NI*(16) : 43 (100%), 55 (25%), 59 (38%), 71 (71%), 281 (3%)

Les proportions des différentes classes chimiques présentes dans la fraction volatile de l'extrait de margine sont représentées par la figure II.7.

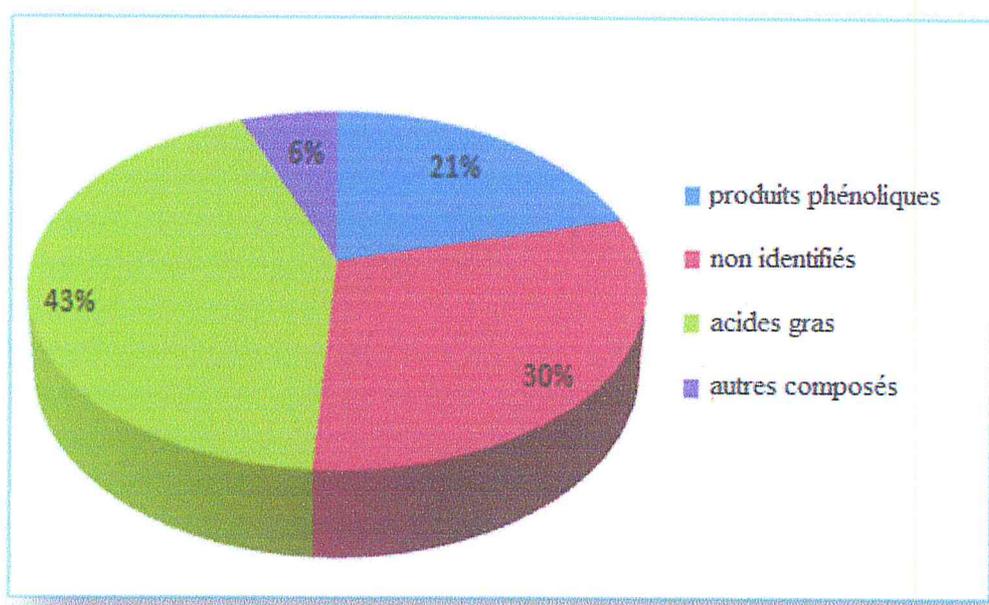


Figure II.7. Représentation de la composition chimique de la fraction volatile de l'extrait de margine.

L'examen de la figure II.7 montre que la composition chimique de la fraction volatile de l'extrait de margine est dominée par les acides gras (43%) tels que : le miristate d'isopropyle, l'acide hexadecanoïque, 9-octadecanoate de méthyle et l'oléate d'éthyle.

Les composés phénoliques représente (21%), les principaux sont : 4-éthyle phénol, eugénol, 4-éthyle-1,3- benzenediol, 4,hydroxphényléthanol (Tyrosol).

Nous n'avons pas pu identifier beaucoup des composés inconnus (30%) en se basant uniquement sur le spectre de masse.

Nous avons relevé la présence de la tétrahydro- α,α -5 triméthyl-5-(4-méthyl-3-cyclohexen-1-yl)- 2-furanméthanol, avec une teneur 6% de la composition globale .

Tableau II.5 Composition chimique de l'extrait dilué de margine

Ordre d'éluion	tr (min)	Noms des composés	Formules chimiques	% de l'aire
1	2,76	4-hydroxy-4-méthyle-pentan-2-one	$C_6H_{12}O_2$	1,052
2	9,41	4-éthyle phénol	$C_8H_{10}O$	0,436
3	14,65	3-méthyle, 2-cyclohexan-1-one	$C_7H_{10}O$	5,324
4	14,85	NI*(1)	/	0,406
5	14,97	NI*(2)	/	4,648
6	15,72	NI*(3)	/	0,776
7	15,93	4-hydroxyphényléthanol (tyrosol)	$C_8H_{10}O_2$	29,407
8	18,35	4-hydroxy-3-méthoxyphényléthanol	$C_9H_{12}O_3$	3,548
9	19,10	N-acétyltyramine	$C_{10}H_{13}NO_2$	0,979
10	19,35	Acide4-hydroxy-3-méthoxy benzoïque	$C_8H_8O_4$	4,146
11	19,78	NI*(4)	/	1,667
12	20,85	NI*(5)	/	1,255
13	20,99	NI*(6)	/	7,598
14	21,45	NI*(7)	/	0,828
15	21,90	Acide3, 4-hydroxy Benzéneacétique	$C_8H_8O_4$	8,579
16	22,19	NI*(8)	/	2,234

17	22,39	NI*(9)	/	6,362
18	23,08	NI*(10)	/	0,425
19	25,96	NI*(11)	/	4,948
20	26,31	NI*(12)	/	2,787
21	26,82	NI*(13)	/	6,682
22	27,07	NI*(14)	/	1,277
23	27,21	NI*(15)	/	2,066
24	28,04	NI*(16)	/	1,602
25	30,88	NI*(17)	/	0,886

NI* : non identifier

Les données de spectre de masse des produits inconnus de l'extrait dilué de margine sont présentés sous forme de **m/z (abondance en %)** pour les principaux fragments.

NI*(1) : 44 (47%), 55 (32%), 68 (39%), 82 (100%), 164 (2%)

NI*(2) : 41 (38%), 43 (100%), 55 (79%), 97 (46%), 156 (5%)

NI*(3) : 41 (51%), 44 (73%), 109 (100%), 168 (31%), 196 (3%)

NI*(4) : 41 (100%), 44 (64%), 67 (80%), 79 (73%), 168 (3%)

NI*(5) : 41 (100%), 44 (44%), 67 (62%), 95 (54%), 179 (7%)

NI*(6) : 41 (100%), 55 (65%), 67 (61%), 81 (56%), 182 (3%)

NI*(7) : 41 (100%), 55 (69%), 81 (55%), 121 (68%), 179 (26%)

NI*(8) : 41 (12%), 51 (17%), 77 (22%), 123 (100%), 197 (1%)

NI*(9) : 43 (38%), 77 (23%), 123 (100%), 154 (38%), 210 (1%)

NI*(10) : 43 (19%), 77 (26%), 123 (100%), 154 (22%), 210 (1%)

NI*(11) : 41 (82%), 55 (80%), 79 (68%), 123 (100%), 212 (2%)

NI*(12) : 41 (74%), 55 (57%), 79 (60%), 123 (100%), 210 (4%)

NI*(13) : 41 (70%), 55 (100%), 123 (21%), 167 (96%), 226 (37%)

NI*(14) : 41 (55%), 55 (73%), 123 (100%), 167 (52%), 226 (19%)

NI*(15) : 41 (68%), 55 (74%), 107 (59%), 123 (100%), 240 (10%)

NI*(16) : 41 (78%), 55 (100%), 123 (95%), 167 (84%), 240 (24%)

NI*(17) : 41 (99%), 55 (100%), 69 (60%), 123 (84%), 264 (3%)

Les proportions des différentes classes chimiques présentes dans l'extrait de margine sont représentées par la figure II.8.

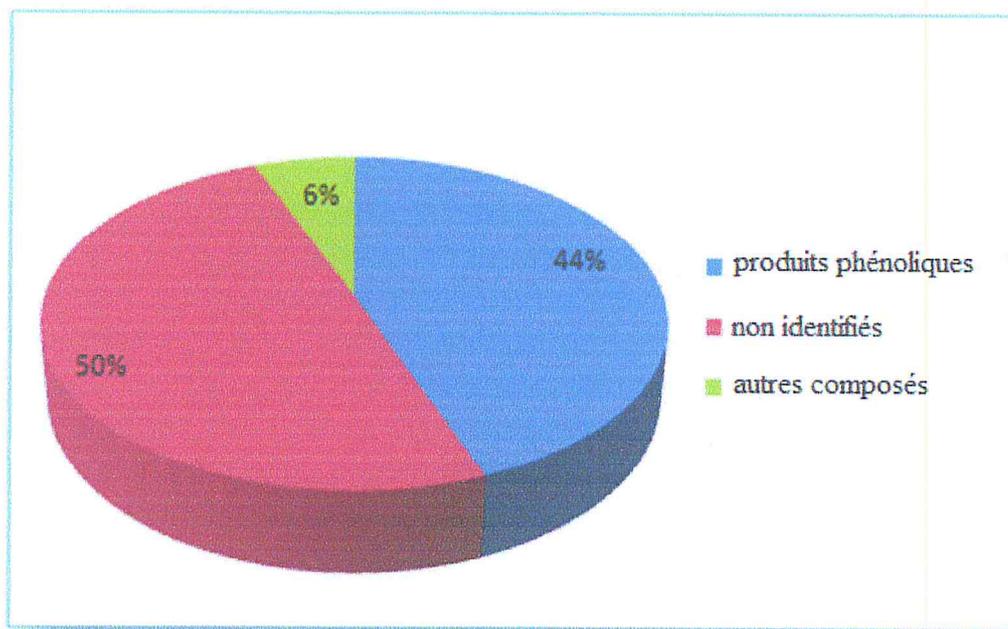


Figure II.8 représentation de la Composition chimique de l'extrait dilué de margine.

L'examen de la figure II.8 montre que la composition chimique de l'extrait dilué de margine est dominée par la présence des composés phénoliques avec un taux de (44%) dont les principaux sont : le tyrosol (29,407%). On note également la présence de l'alcool homovanillique (3,548%).

Nous avons relevé la présence d'une classe des produits représente 6% de la composition globale et qui sont formée par des structures appartenant à diverses classe chimique notamment les cétones.

Nous n'avons pas pu identifier un grand nombre de produit inconnus 51% en se basant uniquement sur le spectre de masse.

II.2.7 Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante 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 antioxydants, la forme réduite conférée à la solution une coloration jaune pâle (figure II.9). Le virage vers cette

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.

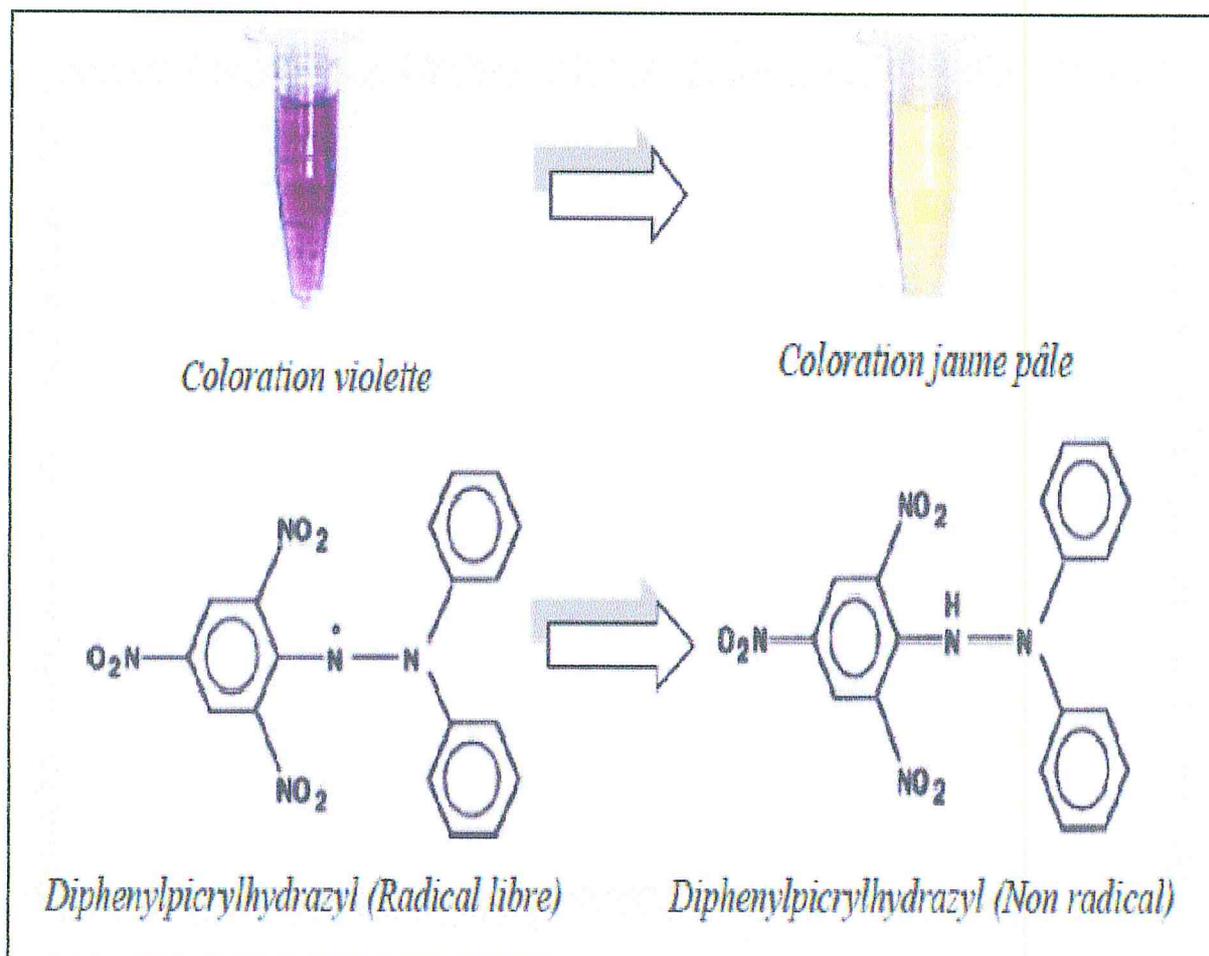


Figure II.9 Forme libre et réduite du DPPH [119].

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 II.10 et II.11).

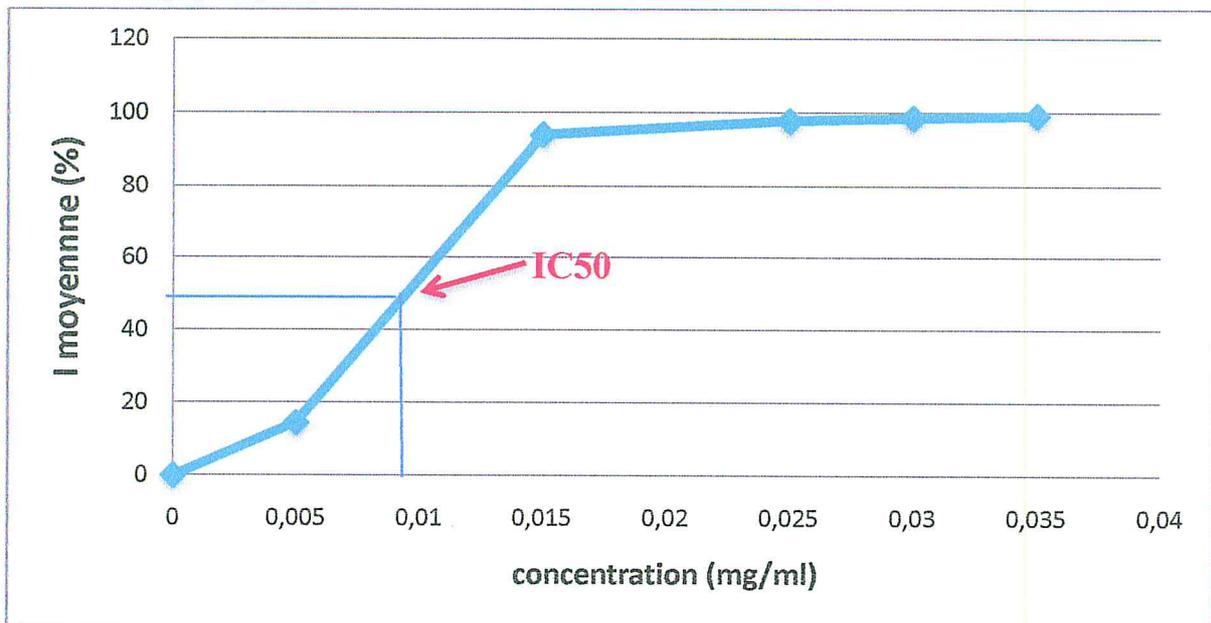


Figure II.10 Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait de margine en fonction des différentes concentrations

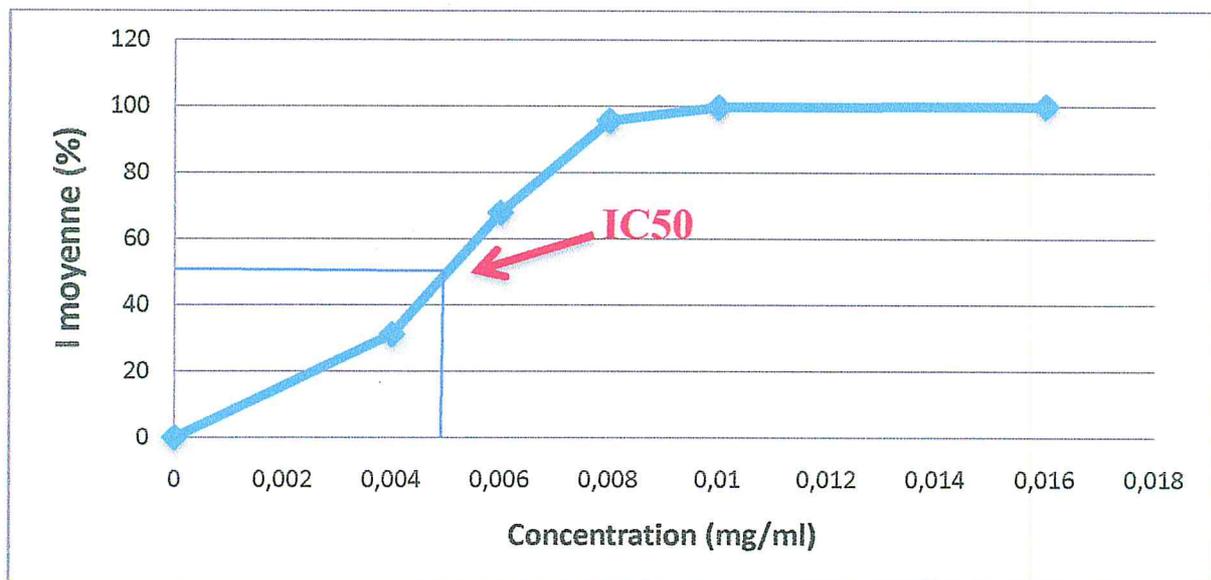


Figure II.11 Variation du taux de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations

- **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 » [119].

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'ordonnée représente l'activité antioxydant en (%). Les résultats déduits sont regroupés dans le tableau II.6.

Tableau II.6 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 II.6, 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 qui est due principalement à son composé phénolique le tyrosol (résultat obtenu par CG-MS).

II.2.8 L'activité antimicrobienne de l'extrait de margine

II.2.8.1 Résultats de l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien de l'extrait de margine par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé (Muller Hinton) (Aromatogramme).

L'activité antibactérienne de notre extrait est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis de trois germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) après 24 h d'incubation à une température de 37° C.

Les résultats qualitatifs de l'extrait représentés dans le tableau II.7.

Tableau II.7 Diamètres des zones d'inhibition du développement des différentes bactéries sur Muller Hinton.

Souches testées	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	25

Les résultats qualitatifs d'action bactéricide de l'extrait obtenus après l'incubation des germes testés pendant 24 h sont présentés dans les figures (II.12-II.14).

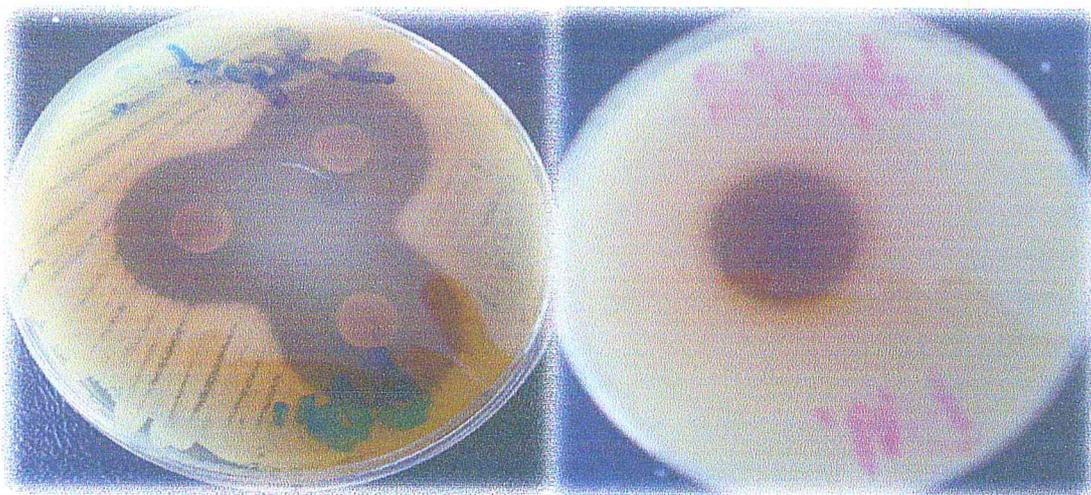


Figure II.12 Aromatogramme de *S. aureus* avec l'extrait de margine.

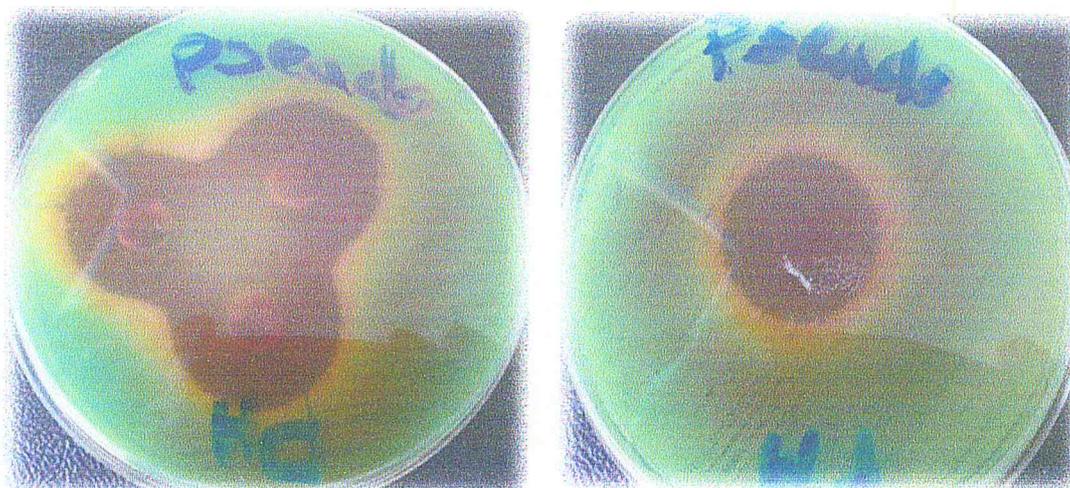


Figure II.13 Aromatogramme de *P. aeruginosa* avec l'extrait de margine.

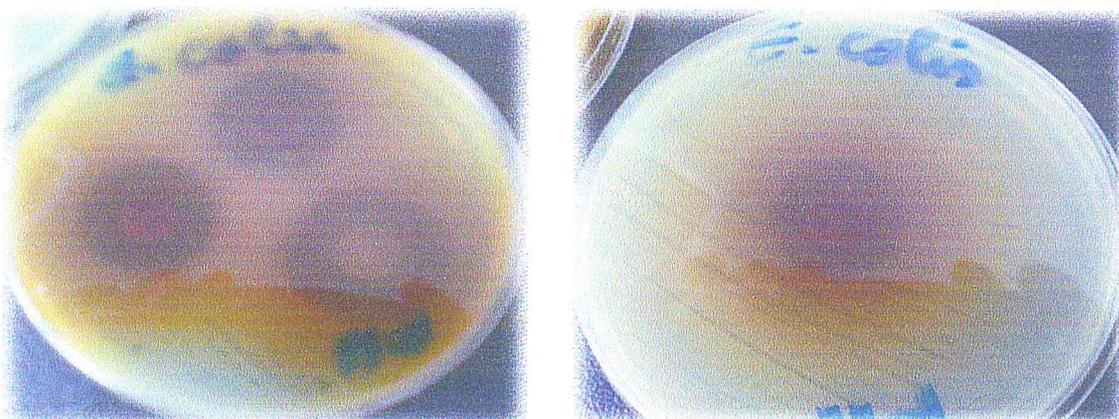


Figure II.14 Aromatogramme de *E. coli* avec l'extrait de margine.

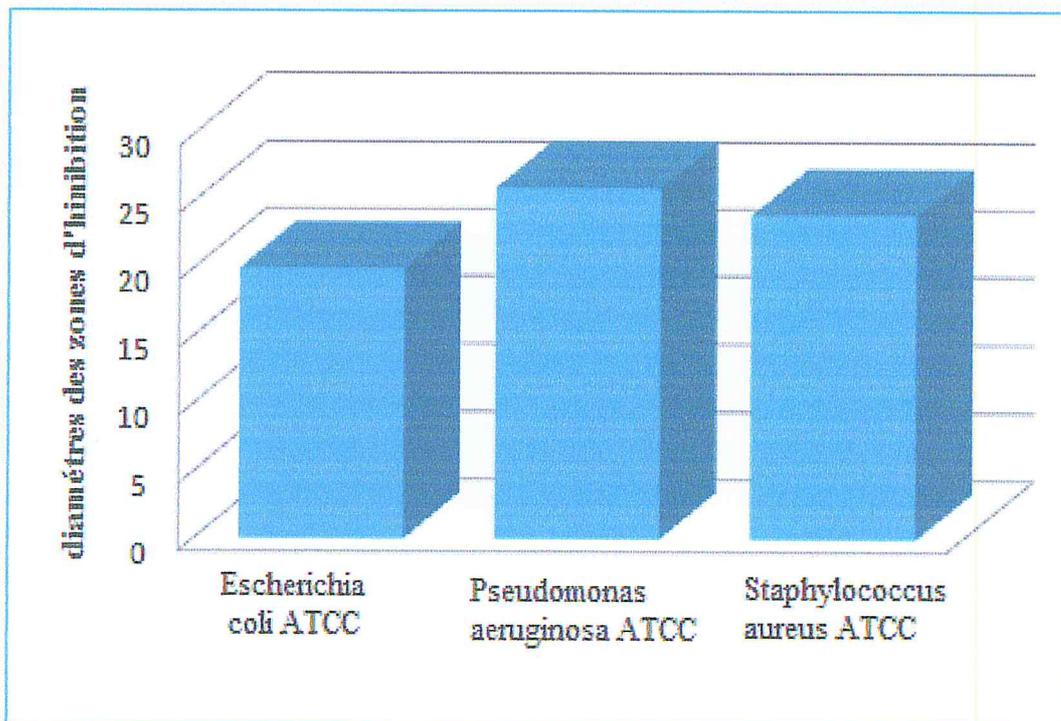


Figure II.15 Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de l'extrait de margine sur les différents souches ATCC.

D'après l'histogramme présenté sur la figure II.15, nous pouvons constater que l'extrait de margine ayant une bonne activité antibactérienne contre les trois souches testées. Concernant l'activité antifongique une seule levure a été testée qui est *Candida albicans*.

Tableau II.8 Diamètres de zone d'inhibition du développement de *C. albicans* ensemencées sur sabouraud.

Souche	Diamètre de zone d'inhibition
<i>Candida albicans</i>	16mm

La figure II.16 montre une photo de résultat de l'extrait obtenu après l'incubation du germe testé pendant 48 h.

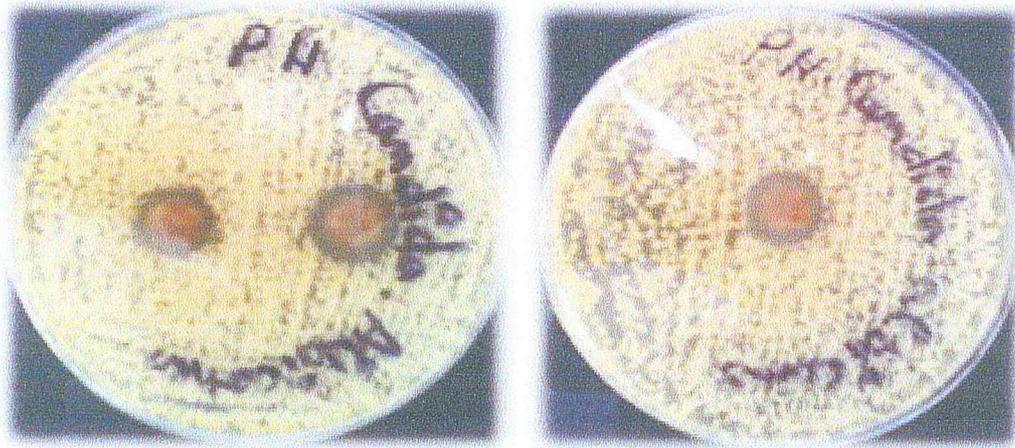


Figure II.16 Aromatogramme de *C. albicans* avec l'extrait de margine.

L'activité antifongique montre un résultat moyennement important avec une zone d'inhibition de 16 mm. Les résultats obtenus des tests antimicrobiens montre que l'extrait de margine a une activité importante, et cette activité revient à la présence des composés phénoliques dans notre extrait.

Les composés phénoliques des margines ont montré des activités antimicrobiennes très intéressantes vu l'importance des zones d'inhibition apparues autour des microorganismes testés. Ceci nous incite à orienter la recherche plus particulièrement à l'intérêt qui porte ces substances en thérapie humaine.

CONCLUSION

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

Notre travail est consacré à l'extraction liquide-liquide, l'étude de la composition chimique de la fraction volatile et l'extrait dilué par CG-MS ainsi que la détermination des activités antioxydants, antibactériennes et antifongiques de l'extrait de margine.

L'extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle nous a permis de récupérer un bon rendement de 0,48% équivalent à 4,82 g/L.

L'analyse par CG-MS de la fraction volatile de l'extrait a permis d'isoler quelque composé phénoliques tels que : le tyrosol (0,96%) et l'eugénol (1,504%).

L'analyse par CG-MS de l'extrait dilué a permis d'identifier les composés phénoliques d'où les principaux sont : le tyrosol (29%) et l'alcool homovanillique (4%).

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.

Les testes d'activités effectués sur l'extrait des margines montrent que ce dernier possède un pouvoir antimicrobien moyennement fort sur les trois souches bactériennes et la levure testée. Ce résultat dû principalement à la présence des composés phénoliques qui sont bien connus pour leur propriété antimicrobienne.

La poursuite du présent travail pourra axer sur :

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

ANNEXES



Extrait de margine

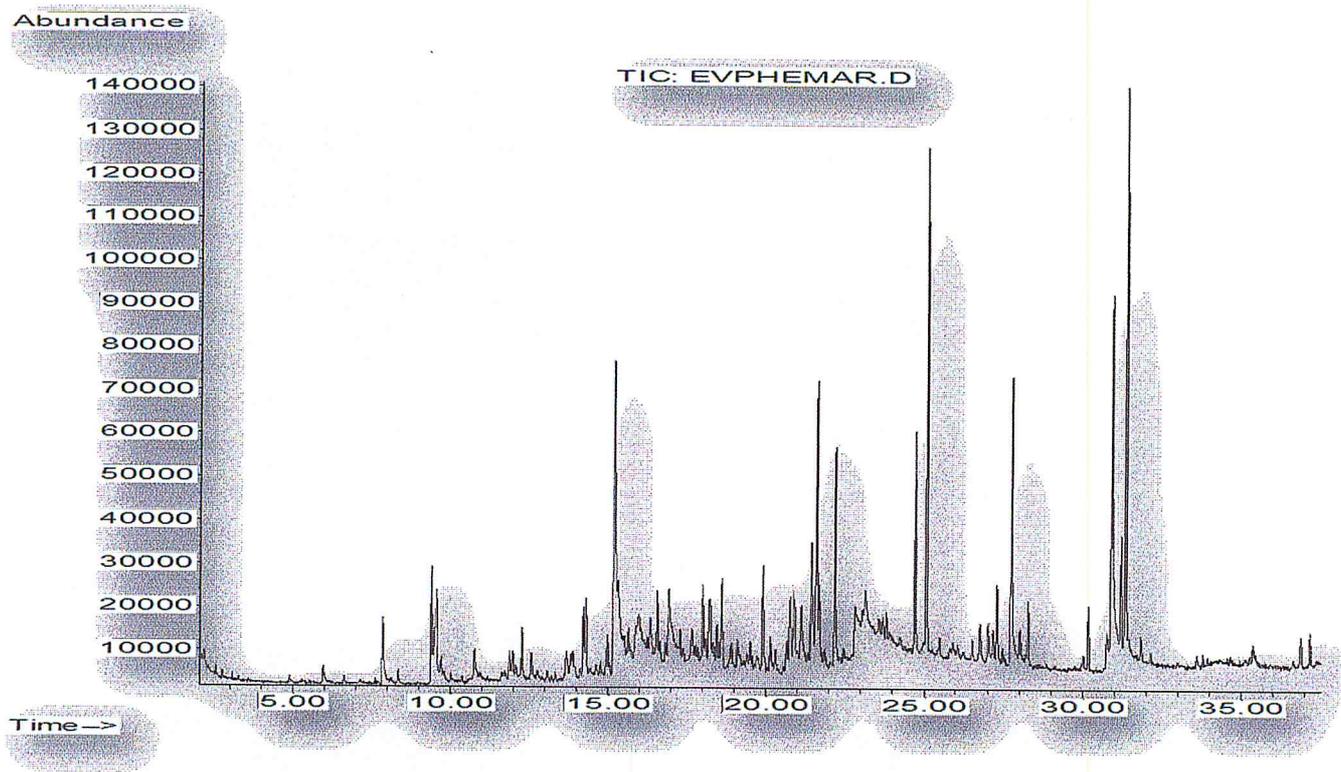
Composition des milieux de culture

❖ Muller Hinton

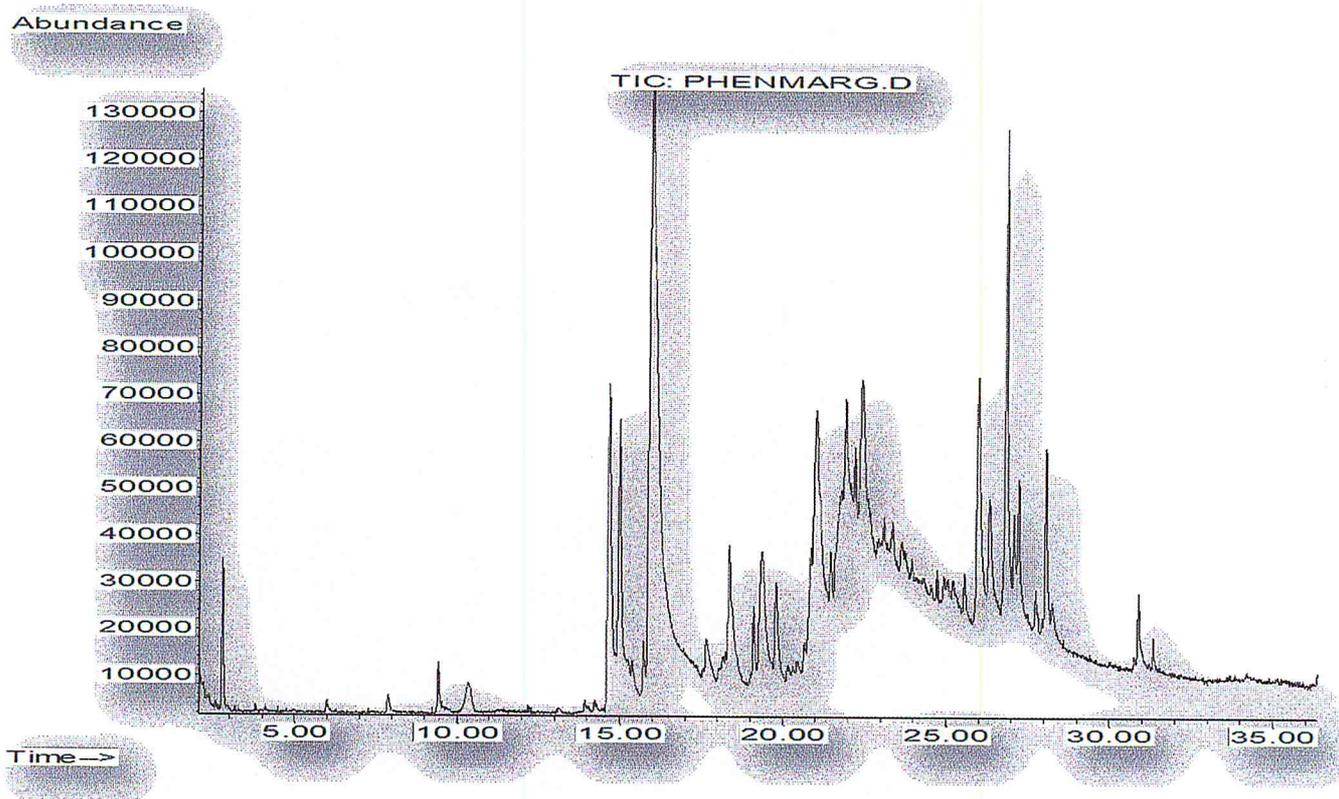
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Extrait de viande	5 g
Amidon	1,5 g
Agar	16g
Eau distillée	1000 ml
pH=7,3	

❖ Sabouraud

Peptone de caséine	5g
Peptone de viande.....	5g
Glucose	40g
Agar	15g
pH=5,6	



Chromatographie de la fraction volatile



Chromatographie de l'extrait dilué

Références bibliographiques

- [1] M. Bressan, L. Liberatore, N. D'Alessandro, L. Tonucci, C. Belli, G. Ranalli, Improved combined chemical and biological treatments of olive oil mill waste waters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52,1228-1233, 2004.
- [2] N. Uccella, Olive biophenols: novel ethnic and technological approach, *Food Science & Technology*, 11, 328-339, 2001.
- [3] A. Fiorentino, A. Gentili, M. Isidori, P. Monaco, A. Nardelli, A. Parrella, F. Temussi, Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 51, 1005-1009, 2003.
- [4] 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.
- [5] L. Lesage-Meessen, D. Navarro, S. Maunier, J.C. Sigoillot, J. Lorquin, M. Delattre, J.L. Simon, M. Labat, Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems, *Food Chemistry*, 75, 501-507, 2001.
- [6] A. Ranalli, L. Lucera, S. Contento, Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7636-7641, 2003.
- [7] N. Mulinacci, A. Romani, C. Galardi, P. Pinelli, C. Giaccherini, F. Vincieri, Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 49, 3509-3514, 2001.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.

- [14] A. Bianco, N. Uccella, Biophenolic components of olives, *Food Research International*, 33, 475-485, 2000.
- [15] 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.
- [16] M. Brenes, A. Garcia, C. Dobarganes, J. Velasco, C. Romero, Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5962-5967, 2002.
- [17] H. El hajjouji, Evolution des caractéristiques physico-chimiques, spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries d'olive au cours de traitements biologique et chimique, Thèse de doctorat, Université de Marrakech-Maroc, 2007.
- [18] A. Fiorentino, A. Gentili, M. Isidori, P. Monaco, A. Nardelli, A. Parrella, F. Temussi, Environmental effects caused by olive mill Waste waters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol Components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1005-1009, 2003.
- [19] E. Tsagariki, N. Harris, Lazarides, B. P. Konstantinos, Olive mill waste water treatment, *Springerlink*, 133-157, 2007.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] A. Nefzaoui, Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous produits, *Option méditerranéennes*, 16, 101-108, 1991.
- [24] A. Ramos-Cormenzana, M. Monteoliva-Sanchez, M.J. Lopez, Bioremediation of Alpechin, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 249-268, 1995.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.

- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] E. Tsagariki, N. Harris, Lazarides, P.B. Konstantinos, Olive mill waste water treatment, Springerlink, 133-157, 2007.
- [32] M. Hafidia, S. Amira, J.C Revel, Structural characterization of olive mill waste-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR, *Process Biochemistry*, 40, 2615–2622, 2005.
- [33] S. Khoufi, F. Feki, Sayadi, Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes, *Journal of Hazardous Materials*, 142, 58-67, 2007.
- [34] 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.
- [35] M. Hamdi, J.L Garcia, R. Ellouz, Integrated biological process for olive mill Waste waters treatment, *Bioprocess, Eng*, 8, 79, 1992.
- [36] L. Di-Giovacchino, A. Mascolo, L. Seghitti, Sulle caratteristiche delle acque di vegetazione delle olive, *La Rivista delle Sotanze Grasse*, 65, 1988.
- [37] A. Nefzaoui, Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits, Séminaire sur l'économie de l'olivier. Tunis, 1987.
- [38] L. Di-Giovacchino, L'influence des systèmes d'extraction, sur la qualité de l'huile d'olive, *Olivea*, 63, 52-63, 1996.
- [39] 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.
- [40] G. Bambalov, C. Israilides, S. Tanchev, Alcohol Fermentation in olive Oil Extraction Effluents, *Biological Wastes*, 27, 71-75, 1989.

- [41] A. Ranalli, The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation, *Olivae*, 37, 30-39, 1991a.
- [42] 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.
- [43] M. Hamdi, Thermoacidic precipitations of darkly coloured polyphénols of olive mill wastewaters, *Environmental Technology*, 14, 495-500, 1993b.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] M. Hamdi, Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olives: l'utilité de la microbiologie industrielle, *Olivae*, 46, 20-24, 1993c.
- [47] M. Mouncif, S. Tamoh, M. Faid, A. Achkari-Begdouri, A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco, *Grasas y Aceites*, 44, 335-338, 1993a.
- [48] B. Zenjari, M. Hafidi, J.P. El Hadrami Bailly, A. Nejmeddine, Traitement aérobie des effluents d'huilerie par les micro-organismes du sol, *Agrochimica*, XLIII, 5-6, 1999.
- [49] A. Tsioulpas, D. Dimou, D. Iconomou, G. Aggelis, Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity, *Bioresource Technology*, 84, 251-257, 2002.
- [50] A. Ramos-Cormenzana, Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water, In: *Inter. Symp, On olive by-products valorization*, Sevilla-Spain, 41-60, 1986.
- [51] B. De Felice, G. Pontecorvo, M. Carfagna, degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20 255 and *pseudomonas pitida*, *Acta Biotechnology*, 17, 231-239, 1997.
- [52] 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.

- [53] J.A. Fiestas Ros de Ursinos, R. Borja, Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain, *Grasas y Aceites*, 2, 101-106, 1992.
- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] M. Hamdi, Future prospects and constraints of olive mill waste waters use and treatment : A. Review, *Bioprocess Engineering*, 8, 209-214, 1993a.
- [61] M.J. Fernandez Diaz, Olives, In Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, 5, 379-397, 1983.
- [62] R. Capasso, A. De Martino, M. Arienzo, Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (10), 2846-55, 2002a.
- [63] J.A. Fiestas Ros de Ursinos, 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, 1989.
- [64] 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.

- [65] V. Balice, C. Carrieri, G. Carrieri, Trattamento chimico-fisico seguito dal biologico delle acque di vegetazione delle olive, *Ricerca*, 2, 50-53, 1979.
- [66] 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.
- [67] O. Oukili, M. Chaouch, M. Rafiq, M. Hadji, M. Hamdi, M. Benlemlih, Bleaching of olive mill wastewater by clay in the presence of hydrogen peroxide, *Ann. Chim. Sci. Ma*, 26, 45-53, 2001.
- [68] S.E. Garrido Hoyos, L. MartinezNieta, F. CamachoRubio, A. RamoCormenzana, Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*, *Pro. Biochem*, 37, 1169-1176, 2002.
- [69] 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.
- [70] M. Fenice, G. Giovannozzi Sermanni, F. Federici, A. D'Annibale, Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media, *Journal of Biotechnology*, 100 (1), 77-85, 2003.
- [71] A.M. Klibanov, T.M. Tu, K.P. Scott, Peroxidase catalysed removal of phenols from coal-conversion wastewater's, *Science*, 22, 259-261, 1983.
- [72] R. Borja, M.A. Martin, M.M. Duran Barrantes, Kinetic study of biomethanization of olive mill wastewater previously subjected to aerobic treatment with *Geotrichum candidum*, *Grasas y Aceites*, 43, 82-86, 1992.
- [73] 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.
- [74] M. Kissi, M. Mountadar, O. Assobhei, E. Gargiulo, G. Palmieri, P. Giardina, G. Sanni, Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water, *Appl Microbiol Biotechnol*, 57 (1-2), 221-6, 2001.
- [75] H. Aissam, F. Errachidi, M. Merzouki, M. Benlemlih, Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase, *Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé*, 7, 23-30, 2002.
- [76] 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.

- [77] R. Maestro-Duran, R. Borja, A. Martin, J.A. Fiestas Ros de Ursinos, J. Alba Mendoza, Biodegradacion de los compuestos fenolicos presentes en el alpechin, *Grasas Y Aceites*, 42, 271-276, 1991.
- [78] M. Brenes, A. Garcia , B. Garcia, J.J. Rios, A. Garrido, phenolic compouds in spanish olive oils, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 3535-3540, 1999.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] 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.
- [84] 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.
- [85] R.A. Vazquez, D.R. Maestro, C.E. Graciani, Compentes fenolicos de la aceituna. II. Poliphenoles del alpechin, *Grasas y Aceites*, 25, 341-345, 1974.
- [86] A. Cichelli, M. Solinas, I composti fenolici delle olive e dell'oloi di oliva, *Riv. Merceol*, 23, 55-69, 1984.
- [87] R. Borja, C.J. Banks, J. Alba, A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of

olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture, *Environ. Sci. Health, A*, 30 (3), 607-626, 1995a.

[88] I. Urquiaga, F. Leighton, Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress, *Biological Research*, 33 (2), 55-64, 2000.

[89] J.J Macheix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand, Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Ed, Presses polytechnologiques et universitaires romandes, 4-5, 2005.

[90] Y. Kening, D.L. Vincenzo, B. Normand, Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*, *The plant cell*, 7, 1787-1799, 1995.

[91] H.G. Floss, Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway, *Natural Product Reports*, 14, 433-434, 1997.

[92] L. Hoffmann, S. Besseau, P. Geoffroy, C. Ritzenthaler, D. Meyer, C. Lapierre, B. Pollet, M. Legrand, Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis, *Plant cell*, 16 (6) : 1446-1465, 2004.

[93] P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, Les polyphénols en agroalimentaire, Ed Lavoisier, 2-10, 2006.

[94] N. Didry, M. Pinkas, M. Torck, sur la composition chimique et l'activité antibactériennes des feuilles de diverses espèces de *grindelia*, *Pl. Med. Phytoter*, XVI, 7-15, 1982.

[95] 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.

[96] F. Hayase, M. Kato, antioxidant compounds of sweet potatoes, *Journal of Nutrition and Science Vitaminol*, 30, 37-46, 1994.

[97] J.F. Turrens, A. Alexandre, A.L. Lehninger, Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237, 408-414, 1985.

[98] B. Halliwell, How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Commun*, 9, 1-32, 1999.

[99] 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).

[100] 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).

[101] 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.

[102] AFNOR, *Huiles Essentielles*, Ed 2, 29- 80, 1986.

[103] 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.

[104] Fr. Marc, A. Davin, L. Deglene-Benbrahim, C. Ferrand *et all*, Methodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments, *Erudit, M/S : médecine sciences*, 20(4), 458-463, 2004.

[105] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856, 2005.

[106] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller N, P.G. Bolwell, P.M. Bramley, J.B. Pridham, The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, 22, 375-383, 1995.

[107] S. Burda, W. Oleszek, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779, 2001.

[108] M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198, 2002.

[109] G. Bartosz, Generation of reactive oxygen species in biological systems, *Comments on Toxicology*, 9, 5-21, 2003.

[110] J.M. Ricardo da Silva, N. Darmon, Y. Fernandez, S. Mitjavila, Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 549-1552, 1991.

[111] I.F. Benzie, J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76, 1996.

- [112] R. Re R, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice- Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237, 1999.
- [113] P. Sharma Om, T.K. Bhat, DPPH antioxidant assay revisited, *Food chemistry*, 113 (4), 1202, 2009.
- [114] A.Y. Loo , K. Jain, I. Darah, Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*, *Food chemitry*, 107, 1151-1160, 2008.
- [115] G.G. Leitão , S.G. Leitão, W. Vilegak, Quik preparative separation of naturel Naphtopyranones with Antioxidant Activity by High-speed Counter-Current Chromatography.Z., *Naturforsch*, 57c, 1051-1055, 2002.
- [116] M.C. PIBIRI, Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de Doctorat de la Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit LAUSANNE, 28-42, 2005.
- [117] A. ZHIRI, Aromathérapie, *Nutranews* ; Ed: FONDATION LIBRE CHOIX, 2-16, 2006.
- [118] Anonyme, Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale, 5^{ème} édition, 112, 15-16, 2008.
- [119] S.Y. Wang, J.H. Wu, L.F. Shyur, Y.H. Kuo, S.T. Chang, Antioxidant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata, *Holzforschung*, 56 (5), 2002.