

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université BLIDA 1**  
**Faculté des Sciences**



**Département de Chimie**

Mémoire présentée par

**DRIOUCH Fella**

**REMADENINE Sabrina**

**En vue d'obtenir le diplôme de Master**

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : **Chimie des produits naturels**

## **Titre**

---

# **Analyse Chimique et Propriétés Antimicrobiennes des Extraits Phénoliques Séparés des Margines**

---

Soutenu publiquement le 28 septembre 2020 devant le jury composé de :

H. Boutoumi	Prof	Président	Université de Blida 1
Z. Zeffouni	MAB	Examinatrice	Université de Blida 1
M. El Hattab	Prof	Promoteur	Université de Blida 1

**Promotion : 2019-2020**

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1:</b>	Origine botanique de l' <i>Olea europea</i> .....	3
<b>Tableau 2:</b>	Quantité du sous-produit obtenu par les trois types d'extraction .....	8
<b>Tableau 3:</b>	Caractéristiques physico-chimiques des margines.....	9
<b>Tableau 4:</b>	Propriétés microbiologiques des margines .....	10
<b>Tableau 5:</b>	Teneur en éléments minéraux des margines .....	10
<b>Tableau 6:</b>	Principales activités biologiques des composés phénoliques des margines .....	19
<b>Tableau 7:</b>	Conditions d'analyses en CLHP et CLHP/SM des composés phénoliques.....	26
<b>Tableau 8:</b>	Teneur en phénol totaux des margines.....	36
<b>Tableau 9:</b>	Structures des principaux composés phénoliques des margines.....	37
<b>Tableau 10:</b>	Elucidation structurale des sept composés phénoliques .....	38
<b>Tableau 11:</b>	Effets des composés phénoliques sur le radical DPPH.....	46

## Liste des Figures

<b>Figure 1:</b>	Composition de l'olive .....	4
<b>Figure 2:</b>	Systèmes d'extraction de l'huile d'olive .....	7
<b>Figure 3:</b>	Structure chimique de l'ion phénoxyde .....	14
<b>Figure 4:</b>	Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	16
<b>Figure 5:</b>	Structures des principaux composés phénoliques retrouvés dans les margines ..	18
<b>Figure 6:</b>	Procédure d'extraction des composés phénoliques des margines.....	21
<b>Figure 7:</b>	Fractionnement des composés phénoliques par chromatographie sur colonne et par CCM.....	24
<b>Figure 8:</b>	Chromatogramme de l'analyse CLHP représentatif des extraits phénoliques des margines.....	28
<b>Figure 9:</b>	Chromatogramme de l'analyse CLHP de l'extrait des margines obtenu par l'acétate d'éthyle.....	29
<b>Figure 10:</b>	Chromatogramme de l'analyse CLHP représentatif d'extrait phénolique brut (a) et acidifié (PH 2 avec HCl) (b) des margines .....	30
<b>Figure 11:</b>	Chromatogrammes de l'analyse CLHP de l'extrait des margines obtenu par l'acétate d'éthyle. ....	31
<b>Figure 12:</b>	Chromatogramme de l'analyse CLHP du profil phénolique des margines .....	32
<b>Figure 13:</b>	Chromatogramme de l'analyse CLHP représentatif des extraits phénoliques des margines.....	33
<b>Figure 14:</b>	Chromatogramme de l'analyse CLHP représentatif des extraits phénoliques des margines provenant du système triphasé.....	34
<b>Figure 15:</b>	Autres composés phénoliques des margines.....	43
<b>Figure 16:</b>	Hydrolyse de l'oleuropéine en hydroxytyrosol en acide élénolique .....	44

## Liste des abréviations

<b>ABTS</b>	2,2- azino-di- (acide 3-éthyl-éthylbenzothiazoline-sulfonique)
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATB</b>	Antibiotiques
<b>BHA</b>	Hydroxyanisole butylé
<b>BHT</b>	Hydroxytoluène butylé
<b>CI50</b>	Concentration de l'antioxydant qui provoque l'inhibition de 50%
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrices
<b>CP</b>	Composés phénoliques
<b>CUPRAC</b>	Capacité antioxydante par réduction du cuivre
<b>DBO</b>	Demande biologique en oxygène
<b>DCO</b>	Demande chimique en oxygène
<b>DEPT</b>	Technique de transfert de polarisation.
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>ESI</b>	Ionisation par électronebulisation
<b>FRAP</b>	Pouvoir antioxydant par réduction du fer
<b>NTU</b>	Unité de Turbidité Néphélométrique
<b>PP</b>	Polyphénols

## Remerciements

Louange à Dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, la patience et le sacrifice pour accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profond respect et toute notre gratitude à notre promoteur Monsieur *El Hattab Mohamed*, nous le remercier infiniment pour son aide, ses précieux conseils, le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.

Nous avons beaucoup honorée à remercier les membres du jury pour l'intérêt accordé à notre travail en l'examinant minutieusement et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous n'oublions pas de remercier M<sup>lle</sup> *Aitsisaid chahinez* pour leur aide et leur précieux conseil.

Enfin, nous remercions les plus sincères à toutes les personnes qui avaient contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette année universitaire.

**Merci.**



## Dédicace

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail de fin d'étude :

À la mémoire de mon grand-père qui aurait été si fier de moi.

À mes chers parents pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de nos études. Que Dieu leur protège et accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

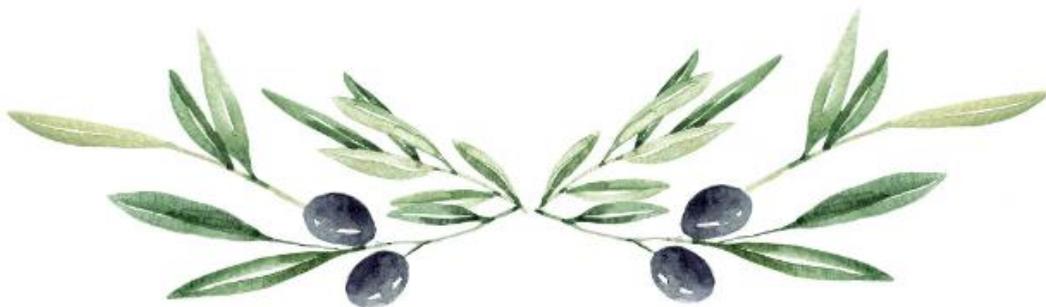
À mes frères et surtout ma sœur *Asmaa* pour avoir contribué à la réussite de ce travail d'une manière indirecte, et pour leur conseil et encouragement.

À toute ma famille pour leur soutien tout au long de notre parcours universitaire en particulier mes oncles, ma tante et ma chère cousine *Hadjer*.

À mes amies *Madina*, *Hinda* et ma binôme *Sabrina*, pour leurs soutiens et encouragement.

À tous ceux qui me sont chers.

*Fella.*





## Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide d'ALLAH tout puissant.

À Mes très chers parents qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours, en leur souhaitant une longue et heureuse vie et que je remercie infiniment pour leur aide et conseils.

À mon cher frère *Abdelhafide* et sa femme *Ikram*.

À mon admirable sœur *Khadija* et son mari *Ahmed*.

À mon adorable nièce *Malak*.

À mon cher neveu *Mouhamed*.

À tous mes proches et ma grande famille : ma grande mère *Zahia*, mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.

Je ne peux oublier de remercier chaleureusement mes très chères amies avec qui j'ai partagé des moments forts : *Madina*, *Hinda*, ma binôme *Fella*.

À tous ceux qui me sont chers, ainsi que tous les gens qui m'ont aidé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail

*Sabrina.*



## ملخص

المرج هو عبارة عن سائل مائي متبقي، ذو لون بني محمر يميل إلى الأسود مع رائحة زيتون قوية ومظهر معكر، حموضته تتراوح ما بين 4.7 و5.7 يتكون من 83-96 % الماء، 16.7-81.6 غ / لتر من المواد عضوية و 0.5-2% من الأملاح المعدنية. لا يخضع المرج بشكل عام إلى أية معالجة وغالبًا ما يتم تركه في البيئة. وبالتالي، ينتج عنه تأثير سلبي على البيئة، بسبب احتوائه على المواد العضوية السامة وعلى وجه الخصوص المركبات الفينولية (0.002-11.5 غ/ل) و 16.5-190 غ / لتر DCO و 46-41.3 غ / لتر DBO، وملوحته العالية و حموضته.

أظهرت التحليلات النوعية والكمية CLHP لمستخلصات المرج أن hydroxytyrosol و tyrosol هما المركبان الرئيسيان اللذان تم اكتشافهما، وكانت تركيزاتها في بعض المستخلصات التي تم تحليلها على التوالي 1225 و345 مغ/لتر.

لخصت العديد من الدراسات إلى أن hydroxytyrosol هو أحد أقوى مضادات الأكسدة. ونجحت دراسات أخرى في تبرير وجود مجموعتين من الهيدروكسيل في وضعية أورثو يمنح نشاطًا قويًا لمضادات الأكسدة.

هيدروكسي تيروسول عند 400 (hydroxytyrosol) ميكروغرام / مل قادر على التسبب في تثبيط كامل لنمو السلالات التالية: نوعان من البكتيريا موجبة الجرام (*Streptococcus pyogenes*) و (*Staphylococcus aureus*) واثنان من البكتيريا سالبة الجرام (*Escherichia coli*) و (*Klebsiella*) كما ان حمض الغاليك (acide gallique) فعالاً عند 200 و400 ميكروغرام / مل ضد (*Streptococcus pyogenes*) و (*Staphylococcus aureus*) على التوالي، ولكن ليس ضد سالبة الجرام.

الكلمات المفتاحية: المرج، المركبات الفينولية، الاستخلاص، التحليل الكيميائي، CLHP، خاصة مضادات الميكروبات، خاصة مضادات الأكسدة.

## Abstract

Olive mill wastewater appear as a residual aqueous liquid, reddish brown to black in color with a strong olive odor and a cloudy appearance, a slightly acidic pH ranging between 4,7 and 5,7, consisting of: 83-96% water, 16.7 - 81.6 g / l of substances organic and 0.5-2% mineral substances. Olive mill wastewater generally do not undergo any treatment and are often dumped in nature. Thus, it results a negative impact on the environment, due to their high load of toxic organic matter (particularly phenolic compounds 0.002-11.5 g/l), their COD (16.5-190g / L) and BOD (41.3-46 g / L), their high salt load and their acidic pH.

The qualitative and quantitative HPLC analyzes of the extracts of olive mill wastewater showed that hydroxytyrosol and tyrosol were the main compounds detected, their concentrations in some analyzed extracts were respectively 1225 and 345 mg / l.

Several studies have concluded that hydroxytyrosol is one of the most powerful antioxidants. Other studies have succeeded in justifying that the presence of two hydroxyl groups in the ortho position confers a strong antioxidant activity.

Hydroxytyrosol at 400 µg/ mL is able to cause complete inhibition of the growth of the following strains: Two-gram positive bacteria (*Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*) and two-gram negative bacteria (*Escherichia coli* and *Klebsiella*). Gallic acid was effective at 200 and 400 µg /mL against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*, respectively, but not against gram negative.

**Keywords : Olive mill wastewater, Phenolic compounds, Extraction, Chemical Analysis, HPLC, Antimicrobial propertie, Antioxidant propertie.**

## Résumé

Les margines apparaissent sous la forme d'un liquide aqueux résiduel, de couleur brun rougeâtre à noir avec une forte odeur d'olive et un aspect trouble, un pH légèrement acide compris entre 4,7 et 5,7, constitué de : 83-96% d'eau, 16,7 - 81,6 g / l de matières organiques et 0,5-2% de sels minéraux. Généralement, les margines ne subissent aucun traitement et souvent rejetées dans l'environnement. Ainsi, il en résulte un impact négatif sur l'environnement, en raison de leur charge en matière organique toxique (en particulier les composés phénoliques 0,002 - 11,5 g/L), leur DCO (16,5 - 190 g/L) et DBO (41,3 - 46 g/L), leur salinité élevée et leur pH acide.

Les analyses par CLHP qualitatives et quantitatives des extraits des margines ont montré que l'hydroxytyrosol et le tyrosol étaient les principaux composés détectés, leurs concentrations en certains extraits analysés étaient respectivement de 1225 et 345 mg / l.

Plusieurs études ont conclu que l'hydroxytyrosol est l'un des antioxydants les plus puissants. D'autres études ont réussi à justifier que la présence de deux groupements hydroxyles dans la position ortho confèrent une forte activité antioxydante.

Il a été signalé que l'hydroxytyrosol à 400 µg / mL est capable de provoquer une inhibition complète de la croissance des souches suivantes : deux bactéries à gram positives (*Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*) et deux bactéries à gram négatives (*Escherichia coli* et *Klebsiella*). L'acide gallique était efficace à 200 et 400 µg / mL contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*, respectivement, mais pas contre gram négatif.

**Mots-clés : Margines, Composés phénoliques, Extraction, Analyse Chimique, CLHP, Propriétés antimicrobiennes, Propriétés antioxydantes.**

## Table de matière

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des abréviations

ملخص.....	i
Abstract.....	ii
Résumé.....	iii
Introduction Générale.....	1
Première Partie	
I. Généralités sur l'olivier.....	3
I.1. Historique de la culture de l'olivier.....	3
I.2. Caractérisation et origine botanique de l'olivier.....	3
I.3. Grain d'olive.....	4
I.4. Huile d'olive.....	4
II. Technologie d'obtention de l'huile d'olive.....	4
II.1. Synoptique de fabrication de l'huile d'olive.....	5
II.1.1. Opérations préliminaires.....	5
II.1.2. Broyage.....	5
II.1.3. Malaxage.....	5
II.1.4. Séparation des phases.....	5
II.2. Différents types d'extraction de l'huile d'olive.....	5
II.2.1. Système d'extraction discontinu par presse.....	6
II.2.2. Système d'extraction continu avec centrifugation.....	6
II.2.2.1. Système d'extraction en continu avec centrifugation à trois phases.....	6
II.2.2.2. Système d'extraction continu avec centrifugation à deux phases.....	6
III. Sous- produits de l'extraction de l'huile d'olive.....	8
III.1. Grignons.....	8
III.2. Margine ou eau de végétation.....	8
III.2.1. Caractéristiques physico-chimiques des margines.....	8
III.2.2. Propriétés microbiologiques des margines.....	9
III.2.3. Composition chimique des margines.....	10
IV. Impact des margines sur l'environnement.....	11
IV.1. Impact sur le sol.....	11
IV.2. Impact sur les eaux.....	12

IV.3. Impact sur les plantes .....	12
V. Valorisation des margines .....	12
VI. Composés phénoliques .....	13
VI.1. Définition .....	13
VI.2. Propriétés chimiques majeures des composés phénoliques .....	14
VI.3. Rôle et intérêt des polyphénols .....	14
VI.4. Applications industrielles des composés phénoliques .....	15
VII. Activité antioxydante .....	15
VII.1. Définition .....	15
VII.2. Radicaux libres .....	16
VII.3. Piégeage des radicaux libres .....	16
VIII. Activité antibactérienne des composés phénoliques .....	17
IX. Composés phénoliques des margines et activités biologiques .....	17
IX.1. Composés phénoliques des margines .....	17
IX.2. Activités biologiques des composés phénoliques des margines .....	19
Deuxième Partie	
I. Introduction .....	20
II. Extraction .....	20
III. Fractionnement sur colonne .....	22
IV. Séparation par CLHP .....	25
V. Détermination de la teneur en phénol total .....	35
VI. Détermination structurale des composés phénoliques des margines .....	36
VII. Détermination de l'activité antioxydante par diverses méthodes .....	45
VIII. Détermination de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) .....	47
Conclusion.....	50
Références Bibliographiques.....	52

# Introduction Générale

La culture des oliviers fait partie de la tradition méditerranéenne car l'olivier est une plante emblématique de civilisation chez les méditerranéens et en même temps un délice nécessaire sur leurs tables [1]. En effet, il n'est pas étrange que leur culture se trouve dans la plupart de la superficie mondiale, entre autres, dans le bassin méditerranéen. C'est dans cette région que se concentre 95 % de la production et 85 % de la consommation mondiale [2].

Selon les chiffres provisoires de la direction de la régulation de la production agricole, l'Algérie compte environ  $6,2 \times 10^6$  oliviers cultivés sur une superficie de 471657 ha [3]. La plupart des pays du bassin méditerranéen produisent environ 97.5% de la production mondiale de l'huile d'olive, cette production a un impact vital sur le développement socio-économique de ces pays méditerranéens[4]. Parmi les principaux pays méditerranéens, l'Algérie qui se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce, la Tunisie et le Maroc qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs de l'huile d'olive [5] et à l'échelle mondiale, elle est le 9<sup>ème</sup> pays producteur de l'huile d'olive avec une production de 80.000 tonnes en 2017/2018 de la production méditerranéenne[6].

Le développement du secteur oléicole a autorisé aux équipements modernes de prendre la place des systèmes traditionnels afin d'obtenir une huile d'olive de haute qualité [1]. Bien que le principal produit soit l'huile, les huileries rejettent deux sous-produits résiduels, l'un solide appelé grignon et un résidu liquide appelé margine [7]. La problématique de l'élimination des margines est confrontée par tous les pays méditerranéens producteurs de l'huile d'olive, dont l'Algérie qui a une production de 200.000 tonnes de margines/ an [6].

Les margines sont des eaux de végétation générées lors de l'extraction de l'huile d'olive vierge. Ces effluents sont riches en matières organiques (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines...) et en sels minéraux (potassium, sodium, magnésium...). Fréquemment, elles sont épandues de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou stockées dans des bassins d'évaporation à proximité des huileries, causant aux systèmes eau-sol-plante une pollution inévitable [8]. Elles présentent une certaine toxicité due à un pH acide et une richesse en matière organique, plus précisément les polyphénols [9,10], ces derniers sont difficilement biodégradables [11]. Plusieurs études ont prouvé les effets négatifs de ces effluents sur la population microbienne du sol [12,13], sur les plantes durant la germination et la croissance des graines [14,15], sur l'écosystème aquatique [16] et même au milieu de l'air [17]. Tous les traitements physico-chimique et biologique des margines, afin de réduire leur impact sur l'environnement, restent toujours insuffisants et coûteux [8]. Dans le souci de réduire les coûts de ces traitements et la diminution de leurs rejets, des recherches sont orientées sur leur

valorisation en appliquant des traitements préliminaires permettant d'extraire des sous-produits ayant des rôles bénéfiques divers, car il a été confirmé que les polyphénols des margines sont des substances possédant un large spectre d'activité biologique (antioxydant, antimicrobien, etc.)**[10,18]**, ce qui permet de valoriser les résidus de l'huile d'olive en source d'antibactériens et d'antioxydants naturels **[10,19]** et les utiliser dans de nombreuses applications des industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire **[18]**.

Dans notre mémoire, l'objectif visé est une étude approfondie dans les recherches réalisées sur les polyphénols des margines, ainsi que leurs potentiel antimicrobien et l'activité antioxydante.

# Première Partie

## I. Généralités sur l'olivier

### I.1. Historique de la culture de l'olivier

Parmi les plus vieux arbres cultivés dans le monde apparaît l'olivier [20]. Il a été mentionné dans des livres plusieurs fois. Dans le Coran, l'olive a été citée six fois dans différents endroits parmi lesquels sourate « Al-Tine », aussi il a été cité dans la Bible et l'Évangile [21].

L'histoire de l'olivier se confond avec la naissance de civilisations des pays du bassin méditerranéen [22], donc, il est très difficile de reconnaître la renaissance de l'olivier. Des fossiles de feuilles datant de six millions d'années ont été découverts à Mongardino en Italie, et des restes d'arbres du XII<sup>ème</sup> millénaire avant Jésus-Christ (av-J-C) en bordure du Sahara. En méditerranée orientale, des feuilles fossilisées datées de 37000 ans av-J-C ont été trouvées à Santorin, île de la mer Egée [23].

### I.2. Caractérisation et origine botanique de l'olivier

L'olivier appartient à deux sous-espèces, le type sauvage *Olea europaea sylvestris* et le type cultivé *Olea europaea sativa* [24].

L'olivier est un arbre méditerranéen, à un tronc tortueux et une écorce grisâtre, crevassée, sa hauteur peut atteindre 6 à 8 mètres. Ses feuilles persistantes lancéolées et coriaces, leur face inférieure est blanc argenté et leur face supérieure vert grisâtre. Ses fleurs sont petites à quatre pétales de couleur blanche et sont réunies en grappes dressées. Ses fruits connus par le nom olive, sont des drupes ovoïdes à noyau dur fusiforme, leur couleur verte puis noire à maturité.[25]. Le tableau 1 présente la classification botanique de l'olivier.

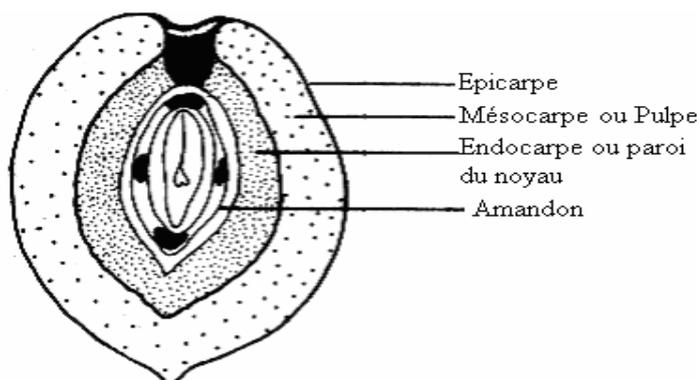
**Tableau 1:** Origine botanique de l'*Olea europea* [25]

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dialypétales</i>
Ordre	<i>Lamaiales</i>
Famille	<i>Oleaceae</i>
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europea</i>

### I.3. Grain d'olive

L'olive est le fruit de l'olivier, c'est une drupe charnue de forme ovoïde, de tailles variables et leur poids varie entre 2 à 12 g. Selon le degré de maturation de l'olive, la couleur varie du vert léger au noir, passant par le rose violacé [26].

Sa composition dépend du sol, du climat et la variété de l'olive, leur contenu est composé du noyau (17,3% - 23%), d'amandon (2% - 5,5%), d'épicarpe (2% - 2,5%) et de la pulpe (71,5% -80,5%) par rapport au poids sec de l'olive [27].



**Figure 1:** Composition de l'olive [27]

### I.4. Huile d'olive

L'huile d'olive est un pur jus provenant uniquement du fruit de l'olivier à partir d'une série d'opération physiques, elle est la meilleure huile végétale et la plus recommandée car non seulement, elle est appétissante mais aussi elle est très stable, difficilement oxydable, riche en acide oléique et linoléique, faible en acide gras saturé et aucun additif n'est ajouté pour allonger sa durée de vie, car elle contient naturellement des antioxydants qui lui permettent de résister au rancissement. Toutes ces caractéristiques justifient l'importance de l'utilisation de cet excellent produit pour la consommation culinaire et médicinale [28].

## II. Technologie d'obtention de l'huile d'olive

Les méthodes d'extraction de l'huile d'olives les plus utilisés par les huileries sont le système discontinu par presse et le système continu avec centrifugation à trois phases ou à deux phases. Ces industries produisent, mis à part « l'huile d'olive » des sous-produits tels que les margines (eaux de végétation) et les grignons d'olives.

## **II.1. Synoptique de fabrication de l'huile d'olive**

Le principal objectif de la culture de l'olivier est la production de l'huile d'olive par l'utilisation uniquement des méthodes mécaniques ou physiques pour produire la plus grande quantité d'huile possible sans altération de sa qualité d'origine.

Le processus d'extraction de l'huile d'olive est toujours le même, en passant par quatre grandes opérations : les opérations préliminaires, le broyage ; le malaxage et la séparation des phases liquides : huile et eau [28].

### **II.1.1. Opérations préliminaires**

Dans le but du nettoyage des olives, donc dès leur arrivée chez un moulinier, elles sont pesées et passées dans un système de laveuse-éfeuilleuse qui va les laver et d'en retirer les impuretés (terre, cailloux, feuilles...) qui viennent avec l'olive [29].

### **II.1.2. Broyage**

Dans le but de détruire les cellules des olives afin de libérer leur contenu nécessaire pour réaliser le broyage des olives, qui sont réduites en une pâte plus ou moins homogène qui devra, ensuite, être malaxée [29].

### **II.1.3. Malaxage**

Le malaxage permet d'homogénéisation de la pâte et la coalescence des gouttes d'huile : les micro-gouttelettes d'huile qui viennent d'être sorties de leurs lipovacuelles cellulaires vont se réunir afin de former des grosses gouttes pour faciliter leurs extractions de la pâte [29].

### **II.1.4. Séparation des phases**

Cette opération consiste à [28] :

- La séparation des phases liquides-solides : après le broyage et le malaxage, on obtient d'une pâte qui contient la matière solide et fluide. La matière solide appelée grignon est formée de débris de noyaux, d'épiderme de parois cellulaires et l'autre partie qui est fluide contient l'huile et l'eau de végétation connue par le nom : margine.
- La séparation des phases liquides-liquides : Les deux phases aqueuse et huileuse se séparent par une simple décantation ou par centrifugation. Cette séparation est basée sur la différence de densité entre l'huile d'olive et l'eau de végétation.

## **II.2. Différents types d'extraction de l'huile d'olive**

L'extraction de l'huile d'olive est réalisée par trois méthodes principales.

### II.2.1. Système d'extraction discontinu par presse

Ce système de presse correspond à un procédé discontinu qui est une méthode traditionnelle pour produire l'huile d'olive. En effet, dans un premier temps, le broyage des olives avec des moulins équipés de meules de granite : la rotation de la pierre et son poids vont détruire et libérer le contenu cellulaire des drupes des olives. Au bout d'une demi-heure environ, une pâte est obtenue, elle est composée de grignons et d'un moût contenant l'huile et la margine. Ensuite, cette pâte est transférée dans des scourtins (disques en fibres coco ou de nylon) placés dans la presse hydraulique qui va servir à la séparation des phases liquide et solide. Les grignons demeurent dans les scourtins, la phase liquide est collectée dans une cuve à décantation pour séparer la phase aqueuse (margine) et la phase organique (huile).[29].

### II.2.2. Système d'extraction continu avec centrifugation

Le progrès technologique a permis le développement des installations automatisées et moins ennuyeuses que les presses : il s'agit d'un système d'extraction en continu avec deux centrifugations (horizontale et verticale). Ces installations continues ont permis de réduire la durée de stockage des olives et leurs coûts de transformation [29].

#### II.2.2.1. Système d'extraction en continu avec centrifugation à trois phases

C'est un système de type mouture/centrifugation à trois phases (huile, margine et grignon). Le broyage se fait à l'aide des broyeurs mécaniques à marteaux, couteaux ou disques. Ces broyeurs sont placés sur un axe entraîné par un moteur électrique à une vitesse de 1000 à 3000 tours par minute, alors le fonctionnement en continu permis d'obtenir la pâte instantanément. Le malaxage se fait par rotation lente dans un temps variant entre 15 et 30 minutes. Une fois la pâte d'olive est homogénéisée et la coalescence est effectuée, la pâte est donc injectée par une pompe dans une centrifugeuse horizontale puis verticale qui permet la séparation de cette pâte en trois phases. L'avantage de ce système continu est que le moulinier n'a jamais à manipuler directement la pâte d'olive car celle-ci est envoyée automatiquement d'un appareil à un autre.[29]. Les inconvénients de ce système sont les suivants [28] :

- La quantité élevée de l'eau chaude ajoutée lors de l'extraction (40 à 60% du poids de la pâte) fait que l'huile extraite se trouve appauvrie en composés aromatiques et phénoliques, ces composés passent dans les margines.
- Des grignons à teneurs élevés en humidité (45 à 55%).

#### II.2.2.2. Système d'extraction continu avec centrifugation à deux phases

Le nouveau procédé technologique pour l'extraction de l'huile d'olive, est réalisé par l'utilisation d'une nouvelle centrifugeuse horizontale à deux phases qui ne nécessite pas l'ajout

d'eau [29], alors il ne procède pas à l'augmentation du volume de margine, ce système est plus respectueux de l'environnement [30].

L'avantage principal de ce type de centrifugation est la séparation directe de l'huile d'olive et les grignons humides avec un rendement de l'huile d'olive légèrement plus élevé que les autres systèmes [29]. Aussi l'huile obtenue par la centrifugeuse à deux phases est une huile très stable à cause de sa richesse en polyphénols totaux et en orthodiphénols [28].

La figure suivante récapitule les trois systèmes d'extraction selon *Hammadi* 2006[30]

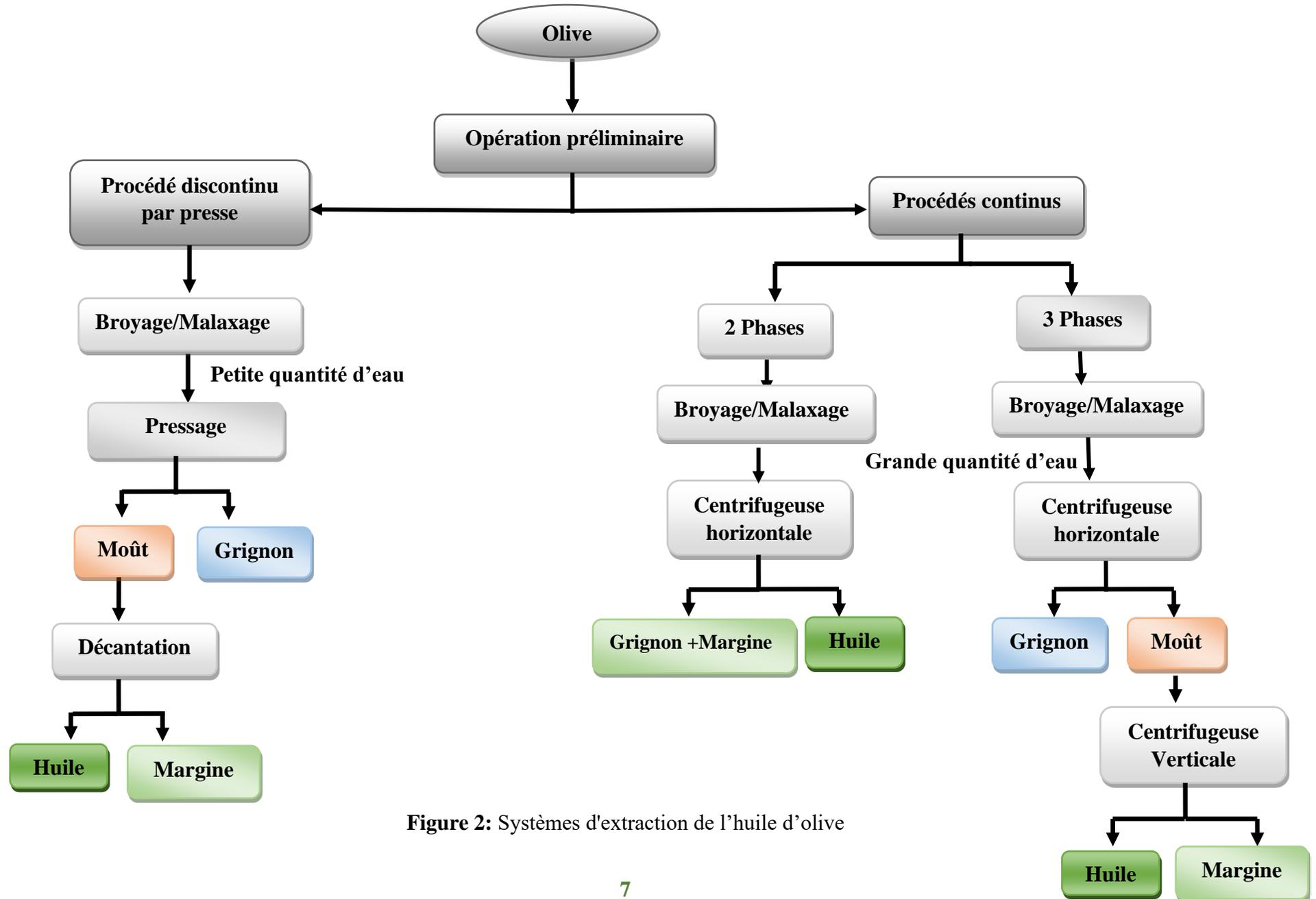


Figure 2: Systèmes d'extraction de l'huile d'olive

## III. Sous- produits de l'extraction de l'huile d'olive

La production de l'huile d'olive est l'objectif principal de l'industrie oléicole, mais d'un autre côté laisse deux résidus, l'un liquide : margine 30 % et l'autre solide : grignon 50 % par rapport aux poids total des olives traitées. [31]. Le tableau 2 regroupe la quantité des sous-produits obtenus par les trois types d'extraction [30].

**Tableau 2:** Quantité du sous-produit obtenu par les trois types d'extraction

Type d'extraction	Grignons (Kg/100Kg d'olives)	Margine (Litres /100Kg d'olives)
Traditionnelle	45.5	75
Deux phases	75.5	3.6
Trois phases	57.5	902

### III.1. Grignons

Ce sous-produit est formé de pulpes et de noyaux d'olive, issu de la première pression ou centrifugation, on peut valoriser et transformer les grignons en un produit destiné à l'alimentation animale, ou en huile après extraction chimique dite « huile du grignon d'olive » [32].

### III.2. Margine ou eau de végétation

Ce sous-produit liquide aqueux obtenu lors de l'extraction de l'huile d'olive, issue de l'eau de végétation des olives et de l'eau ajoutée lors de la trituration au moment du malaxage [33]. Il se caractérise par une coloration brune-rougeâtre à noire d'aspect trouble et une odeur qui rappelle celle de l'huile d'olive [1].

Les margines sont très abondantes dans l'extraction à trois phases à cause des quantités élevées d'eaux ajoutées [28] ; elles contiennent un pourcentage négligeable de l'huile et de matière solide provenant de la pâte d'olive, ce pourcentage varie en fonction du système d'extraction [34,35]. Dans l'aire méditerranéenne, les margines constituent un important facteur de pollution à cause de leur charge élevée en matières organiques toxiques, ainsi que leur acidité élevée [36].

#### III.2.1. Caractéristiques physico-chimiques des margines

La qualité physico-chimique et la quantité des margines dépendent de [37,38] :

- ✚ La variété d'olives.
- ✚ Les conditions climatiques.
- ✚ Le taux de maturation des olives.
- ✚ La saison de récolte.

✚ Le système d'extraction mis en jeu.

Les margines sont caractérisées par une coloration sombre due à la présence des polyphénols [39], une forte odeur, un pH légèrement acide, et une charge inorganique et organique très élevée [40,41] et une très grande conductivité électrique [1].

Les caractéristiques physico-chimiques des margines sont consignées dans le tableau 3 :

**Tableau 3:** Caractéristiques physico-chimiques des margines

Paramètres	Gamme des valeurs	Références	
pH	4,7 - 5,7	[42]	
Conductivité (ms/cm)	5 - 41		
DCO (g/l)	16.5-190		
DBO (g/l)	41.3-46		
Résidus sec (g/l)	11,5 - 102,5		
Matières organiques (g/l)	16,7 - 81,6		
Acides organiques (g/l)	0,78 - 1		
Azote total (g/l)	0,06 - 0,95		
Sucres (g/l)	1,3 - 8,79		
Lipides (g/l)	1,64 - 9,8		
Polyphénols (g/l)	0.002-11.5		
Salinité	4.7		[43]
Turbidité NTU	667		[44]
Sels minéraux	0.5-2%		
Eau	83-96%		

### III.2.2. Propriétés microbiologiques des margines

Dans les margines, seuls quelques microorganismes arrivent à se développer dont les champignons et les levures mieux que les bactéries [45], car ils supportent la salinité élevée et le pH acide caractéristique de ces effluents.

Ces microorganismes sont consignés dans le tableau 4[46]. Généralement dans les margines, il y a l'absence de microorganismes pathogènes, alors ils ne posent aucun problème hygiénique [42,47].

**Tableau 4:** Propriétés microbiologiques des margines

Levures	Flore fongique	Flore bactérienne
<i>Trichosporium cutaneium</i>	<i>Aspergillus flavius</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
<i>Cryptococcus albidius</i>	<i>Aspergillus candidus</i>	
<i>Rhodotorula sp</i>	<i>Penicillium negricans</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Candida sp</i>	<i>Alternaria sp</i>	
<i>Saccharomyces sp</i>		

### III.2.3. Composition chimique des margines

- **Eau :** Les margines sont composées de 83-96% d'eau de végétation contenue dans l'olive [44] et de l'eau ajoutée lors de la trituration au moment du malaxage [33].
- **Fraction minérale :** Les margines contiennent des quantités significatives de sels minéraux [42].

**Tableau 5:** Teneur en éléments minéraux des margines

Elément	Gamme de valeurs
Plomb (Pb) (µg/l)	6.7-10
Cadmium (Cd) (µg/l)	0.03-10
Fer (Fe) (mg/l)	0.45 -20
Zinc (Zn) (mg/l)	1.7-4.98
Cuivre (Cu) (mg/l)	0.49-2.96
Manganèse (Mn) (mg/l)	0.46-20
Magnésium (Mg) (g/l)	0.03-0.17
Calcium (Ca) (g/l)	0.03-0.29
Potassium (K) (g/l)	0.73-6.1
Chlore (Cl) (g/l)	0.76-1
Sodium (Na) (g/l)	0.03-0.13

- **Fraction organique** : Les margines sont composées de deux fractions organiques [48] :
  - Une fraction insoluble constituée d'une matière en suspension, ce sont les pulpes d'olives.
  - Une fraction soluble dans la phase aqueuse qui contient les sucres, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques, les lipides et les composés phénoliques.
- **Les sucres** : Raffinose, mannose, saccharose, glucose, arabinose et xylose [42,49].
- **Les huiles** : La teneur de l'huile dans les margines est 0.02 à 1% [50] et l'acide oléique se trouve en grande quantité 65% [51].
- **Les acides organiques** : L'acide fumarique, glycérique, lactique et malonique [42,49].
- **Les composés phénoliques** : Les margines contiennent des composés phénoliques de structures variables : monomères ou polymères [52]. Leur teneur varie entre 0.002-11.5 g/l [42]. Leur pouvoir polluant est représenté par deux valeurs importantes à savoir le DCO (demande chimique en oxygène) et le DBO (demande biologique en oxygène) qui peut atteindre respectivement les valeurs suivantes : 16.5-190 g/l et 41.3-46 g/l [42].
- **L'azote** : Les margines contiennent, une partie azoté constituée principalement par des acides aminés : Acide aspartique, acide glutamique, acide glycine et proline [42,49].
- **Les vitamines** : Les margines contiennent les vitamines, en particulier vitamine D dont la concentration est de 124 mg/Kg [28].

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

Les huileries d'olive génèrent des grandes quantités de margines et sans aucun traitement préalable sont épandues dans les égouts ou bien directement sur la terre, ce qui résulte un impact sur l'environnement notamment une pollution très élevée dans les milieux aquatiques et les sols aussi une toxicité sur les plantes et un dégagement de mauvaises odeurs [53].

##### IV.1. Impact sur le sol

L'épandage direct des margines sur la terre a des effets négatifs non seulement sur la composition physico-chimique de la terre mais aussi sur la croissance des plantes et l'activité microbienne [54,55], car le pH acide et la salinité élevée des margines ainsi que leurs charges en composés phénoliques qui sont phytotoxiques et exercent des effets herbicides (effets toxiques aux cultures végétales) aussi, ils provoquent la destruction de la microflore du sol [56]. De plus, les margines conduisent à l'augmentation de l'hydrophobicité du sol et la diminution de la rétention d'eau et le taux d'infiltration à cause des résidus huileux qui les contiennent [57].

### IV.2. Impact sur les eaux

Les margines possèdent un impact sur les eaux de surfaces (les ruisseaux et les rivières) car leurs sombres couleurs à cause de leurs fortes concentrations en composés phénoliques, peuvent colorer et polluer les eaux [58]. De plus, leurs très fortes charges en DCO et en DBO empêchent l'autoépuration des eaux [59].

Le rejet des margines dans les milieux aquatiques qui sont très riches en sucres réducteurs, provoque la prolifération des microorganismes et une diminution de la disponibilité de l'oxygène pour d'autres organismes vivants ainsi, un déséquilibre de l'écosystème aquatique [60].

Les margines contiennent des lipides qui forment à la surface de l'eau un film imperméable, ce qui empêche le passage de l'oxygène et de la lumière et par conséquent limiter la croissance des plantes aquatiques [60].

### IV.3. Impact sur les plantes

L'application incontrôlée des margines pourrait inhiber la germination des graines et le développement des plantes [61].

De l'autre côté, l'application des margines à des doses convenables pourrait être bénéfique pour la vie des plantes du fait de la richesse de ces effluents en matières organiques et en éléments nutritifs [62].

## V. Valorisation des margines

Les margines sont riches en éléments nutritifs minéraux et organiques. Dans ce cas, la recherche viserait à mettre au point leur valorisation aussi bien à l'échelle laboratoire qu'à l'échelle industrielle [63]. Cette valorisation a pour objectif d'éliminer les composés phénoliques, d'une part, d'utiliser les margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie, de l'agriculture et d'autre part, réduire leurs effets négatifs sur l'environnement [64,65].

- L'utilisation des margines comme fertilisant pour les sols et les cultures [66].
- Les margines peuvent servir comme milieu favorable pour la production d'enzymes par des micro-organismes [67,68].
- La récupération des composés phénoliques pour les valoriser en tant qu'antioxydants naturels. Parmi les composés les plus connus, on peut citer le tyrosol, l'acide caféique et l'acide 4-hydroxybenzoïque qui sont très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique [69].
- Les margines contiennent des sucres libres, des protéines, des acides organiques, et des composés phénoliques qui pourraient être utilisés comme source de carbone pour

la production de polymères, si le microorganisme choisi est capable de métaboliser ces composés [70].

- L'usage des microorganismes pour la production des protéines d'organismes unicellulaires, permettant d'obtenir d'une part, une diminution de la charge polluante des margines, et d'autre part, une biomasse protéique, qui peut servir pour l'alimentation animale [71].
- La production de 65 à 70% de biogaz (représenté par le CO<sub>2</sub> et le méthane) qui sera utilisé comme moyen thermique puis converti en énergie électrique, après la transformation de 85% de substances organiques des margines par le processus de digestion anaérobique [33].

## VI. Composés phénoliques

### VI.1. Définition

Les composés phénoliques (CP) ou polyphénols (PP), sont des molécules organiques issues de métabolites secondaires des végétaux, on les retrouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, à l'heure actuelle il y a plus de 8000 structures phénoliques connues [72].

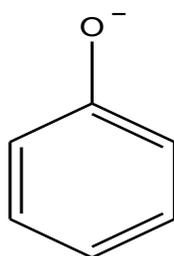
L'élément structurel fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau aromatique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction. Selon *Bruneton*, une définition purement chimique semble être insuffisante, d'où la nécessité de faire intervenir un critère biosynthétique, pour mieux cerner les limites du groupe. Il propose comme définition « dérivé non azoté dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacétate [73]. Les deux grandes voies d'aromagenèse qui permettent au végétal de construire le noyau aromatique sont la voie de l'acide shikimique et la voie acétate [73] :

- **Voie Shikimate** : C'est la voie la plus courante, conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : Acides benzoïques, acétophénones, lignanes, lignines et coumarines, etc.
- **Voie de l'acétate** : Elle conduit à des poly- $\beta$ -cétosters de longueur variable, les polyacétates qui engendrent par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : Isocoumarines, xanthones, quinones, etc.

La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte (stilbènes, pyrones, etc). La participation d'un troisième synthon élémentaire le mévalonate est également possible bien que moins fréquente : dérivés mixtes du shikimate et du mévalonate comme certaines quinones ou comme les furanocoumarines et pyranocoumarines, composés mixtes acétate mévalonate comme les cannabinoïdes. Dans quelques cas, les trois précurseurs concourent à l'élaboration de la même structure : c'est, entre autres, celui des roténoïdes.

### VI.2. Propriétés chimiques majeures des composés phénoliques

Les groupements hydroxyles des composés phénoliques ont une propriété d'acidité importante due à labilité de leurs protons, ce qui facilite la formation d'anion phénoxyde (figure 3) stabilisé par résonance. Cet anion phénoxyde peut perdre son électron pour former un radical phénoxyde [74]. Ce dernier possède une structure aromatique qui lui confère une certaine stabilité, ainsi une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical [75]. Comme il peut ensuite, réagir avec un autre radical libre [76].



**Figure 3:** Structure chimique de l'ion phénoxyde

### VI.3. Rôle et intérêt des polyphénols

Les polyphénols jouent un rôle bénéfique que ce soit pour les plantes (sources de ces polyphénols) que pour l'homme (consommateur de ces polyphénols) [77] :

- Les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV).
- Certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance et les interactions moléculaires avec quelques microorganismes symbiotiques ou parasites...).
- Les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui facilite pour l'homme le choix des organes végétaux (les fruits, les légumes, les tubercules) pour sa consommation.

- Leur rôle au niveau du corps humain a suscité de plus en plus d'intérêt en raison de leurs propriétés anti oxydantes et la protection contre certaines maladies.

### **VI.4. Applications industrielles des composés phénoliques**

Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains composés phénoliques comme les flavanols et les tanins, permis de réaliser des nombreuses applications dans divers domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique, comme par exemple : développement des conservateurs alimentaires et découvertes des nouveaux médicaments de nombreuses maladies infectieuses [78].

La propriété antioxydante de composés phénoliques est utilisée dans la composition des produits pharmaceutiques et cosmétiques, aussi dans l'alimentation pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés, d'arômes alimentaires [79].

## **VII. Activité antioxydante**

### **VII.1. Définition**

Les antioxydants sont des substances intervenant dans les processus d'oxydation en faible concentration, dans le but d'empêcher ou de freiner l'action de l'oxygène moléculaire [80].

Il existe deux classes d'antioxydants : les endogènes et les exogènes. Les antioxydants endogènes sont principalement les enzymes superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase. La deuxième classe les antioxydants exogènes qui sont apportés de l'extérieur par l'alimentation [81], dont on trouve :

#### ➤ **Antioxydants synthétiques**

Les antioxydants de synthèse sont des molécules très efficaces contre l'oxydation, mais ils peuvent causer d'autres effets indésirables et même toxiques, comme par exemple quelques médicaments, compléments alimentaires ou bien les additifs alimentaires [82].

#### ➤ **Antioxydants naturels**

Ils appartiennent à différentes classes chimiques d'origines végétale ou animale. Parmi les antioxydants les plus importants en termes d'activité, on a la vitamine C, la vitamine E et les polyphénols [81].

## VII.2. Radicaux libres

Un radical libre est une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui la rend très réactif, ainsi une réaction en chaîne débute lorsque ce radical essayant d'acquiescer leur stabilité par la capture d'un électron d'une autre molécule stable est la plus proche qui devient elle-même un radical libre [83].

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire. Dans les organismes vivants, elles sont le plus souvent générées à cause de l'importance du métabolisme aérobie [84]. À présent, le terme « espèces réactives de l'oxygène » désigne un ensemble plus large de molécules :

- Des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié : (l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , les radicaux hydroxyles  $HO^{\bullet}$ , peroxyde  $ROO^{\bullet}$ , alkoxyde  $RO^{\bullet}$  [85].
- Des dérivés de l'oxygène non radicalaire tels que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , l'oxygène singulet  $^1O_2$  et le nitroperoxyde  $ONOOH$ , qui sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux libres [85].

## VII.3. Piégeage des radicaux libres

Les composés phénoliques sont connus par leurs propriétés antioxydantes dues à leur capacité à piéger et à neutraliser les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène en raison de leurs nombreux groupements hydroxyles présents sur les cycles benzoïques, et aussi à la proximité des groupes alkyles [86], ce processus est radicalaire [87]. Les polyphénols interviennent dans l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par *Sherwani* : l'antioxydant cède un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées [87].

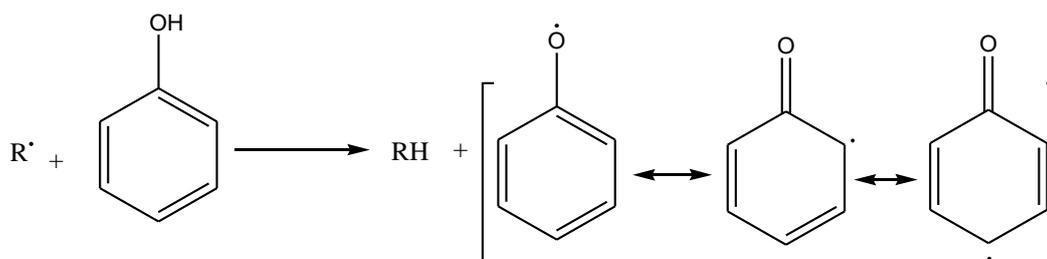


Figure 4 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques

Puisque ces radicaux intermédiaires ( $PO\bullet$ ) sont stables par résonance, donc pas facile à initier une nouvelle chaîne de réactions [88]. D'un autre côté, ils peuvent agir avec d'autres radicaux libres selon la réaction :



La structure chimique des composés phénoliques est idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils contiennent [88] :

- Des groupements hydroxyles qui sont capables de céder facilement un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- La résonance aromatique qui permet la stabilisation de la structure.

### VIII. Activité antibactérienne des composés phénoliques

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques, mais hélas, leur utilisation massive et répétée, a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à ces antibiotiques, d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles substances actives d'origine végétale, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire [89].

Il est prouvé que les composés phénoliques ont des propriétés antibactériennes importantes, en raison du nombre et les sites des groupes hydroxyles phénoliques qui conduisent à une diversité structurale, ce critère est directement proportionnel à la toxicité envers les microorganismes [89]. Il a été aussi prouvé que plus le degré d'oxydation des polyphénols est élevé, plus ils sont inhibiteurs des microorganismes [90].

Ces inhibiteurs n'agissent pas sur la paroi bactérienne mais plutôt, ils agissent par un mécanisme interne sur l'ADN, l'ARN et la synthèse protéique [91].

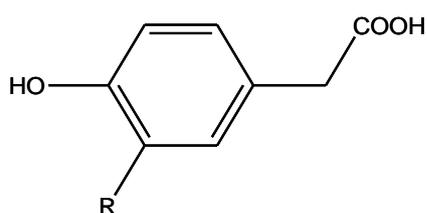
### IX. Composés phénoliques des margines et activités biologiques

#### IX.1. Composés phénoliques des margines

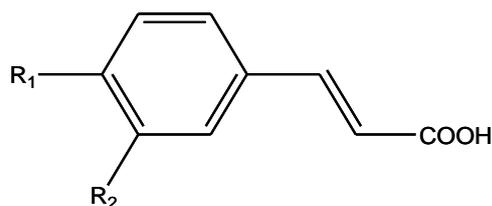
Les margines présentent une quantité estimable de polyphénols totaux (5,5 à 12 g. L<sup>-1</sup> de margines) [56], le composé le plus abondant, est le monomère phénolique l'hydroxytyrosol [48, 92,93]. Dans la littérature, la quantité et la composition phénolique des margines varie selon différents paramètres (procédé de trituration, variétés d'olives, l'âge des margines) [48,92].

Plusieurs travaux ont été réalisés sur des extraits phénoliques des margine et plus de 20 CP ont été identifiés par CLHP, parmi lesquels : acides phénoliques (vanillique, gallique, caféique, p-coumarique, férulique), alcools phénoliques (tyrosol, hydroxytyrosol), dérivés de secoiridoïdes (la forme dialdéhydique de décarboxyméthyl oleuropéine aglycone, ligstroside, verbascoside) et les flavonoïdes (luteoline, luteoline -7-glucoside) [10, 48,92].

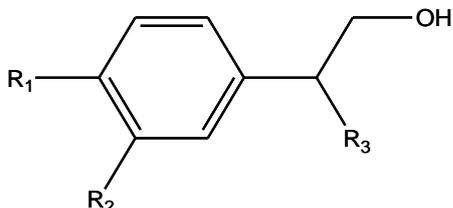
La figure suivante représente les structures des principaux composés phénoliques retrouvés dans les margines [10].



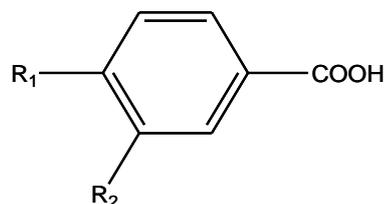
**R=H:** Acide 4-hydroxyphenyl acétique  
**R=OH:** Acide 3,4-dihydroxyphenyl acétique



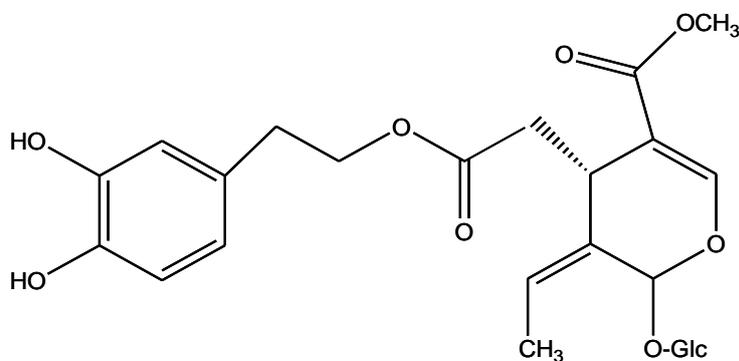
**R1=H,R2=H:** Acide cinnamique  
**R1=OH,R2=H:** Acide p-coumarique  
**R1=OH,R2=OH:** Acide caféique  
**R1=OH,R2=OCH3:** Acide férulique



**R1=OH,R2=H,R3=H:** Tyrosol  
**R1=OH,R2=OH,R3=H:** Hydroxytyrosol  
**R1=OH,R2=OH,R3=OH:** 3,4-dihydroxyphenylglycol



**R1=OH,R2=H:** 4-Acide hydroxybenzoïque  
**R1=OH,R2=OH:** Acide protocatechique  
**R1=OH,R2=OCH3:** Acide vanillique



Oleuropéine

**Figure 5:** Structures des principaux composés phénoliques retrouvés dans les margines

## IX.2. Activités biologiques des composés phénoliques des margines

L'intérêt principal de la plupart des chercheurs est l'étude des propriétés biologiques des margines et plusieurs techniques de traitement des margines ont été proposées par ces chercheurs afin d'extraire leurs composés phénoliques et les valoriser aux tant qu'antibactériens et antioxydants naturels [10, 94,95]. Le tableau 6 résume les principales activités biologiques des quatre composés phénoliques majeurs des margines.

**Tableau 6:** Principales activités biologiques des composés phénoliques des margines

Composés phénolique	Activités	Auteurs
<b>Hydroxytyrosol</b>	Antimicrobien Antifongique	[65]
	Anti-athérogénique	[97]
	Chemopréventif (cancer) Antioxydant	[98]
	Anti-inflammatoire	[99]
<b>Oleuropéine</b>	Antioxydant Anti-inflammatoire	[96]
	Cardioprotectif Anti-athérogénique	[100]
	Régulation des enzymes	[101]
<b>Oleuropéine aglycone</b>	Antioxydant Antimicrobien	[102]
<b>Tyrosol</b>	Antioxydant Anti-inflammatoire Cardioprotectif Anti-athérogénique	[102]

# Deuxième Partie

### I. Introduction

Les margines sont des déchets oléicoles rejetés par les huileries de l'huile d'olive, par leur composition chimique elles possèdent un pouvoir polluant très élevés qui constitue l'un des plus importants problèmes environnementaux des pays méditerranées.

Dans le cadre des recherches sur les procédés de traitement et valorisation de ces effluents, les chercheurs s'intéressent sur la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment, en particulier les composés phénoliques.

En effet, plusieurs études ont été réalisées sur les margines et le processus général de caractérisation de nouvelles molécules bioactives dans cette matrice complexe fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt biologique.

Dans cette partie, nous avons effectué un état des lieux sur les principales études réalisées sur les margines.

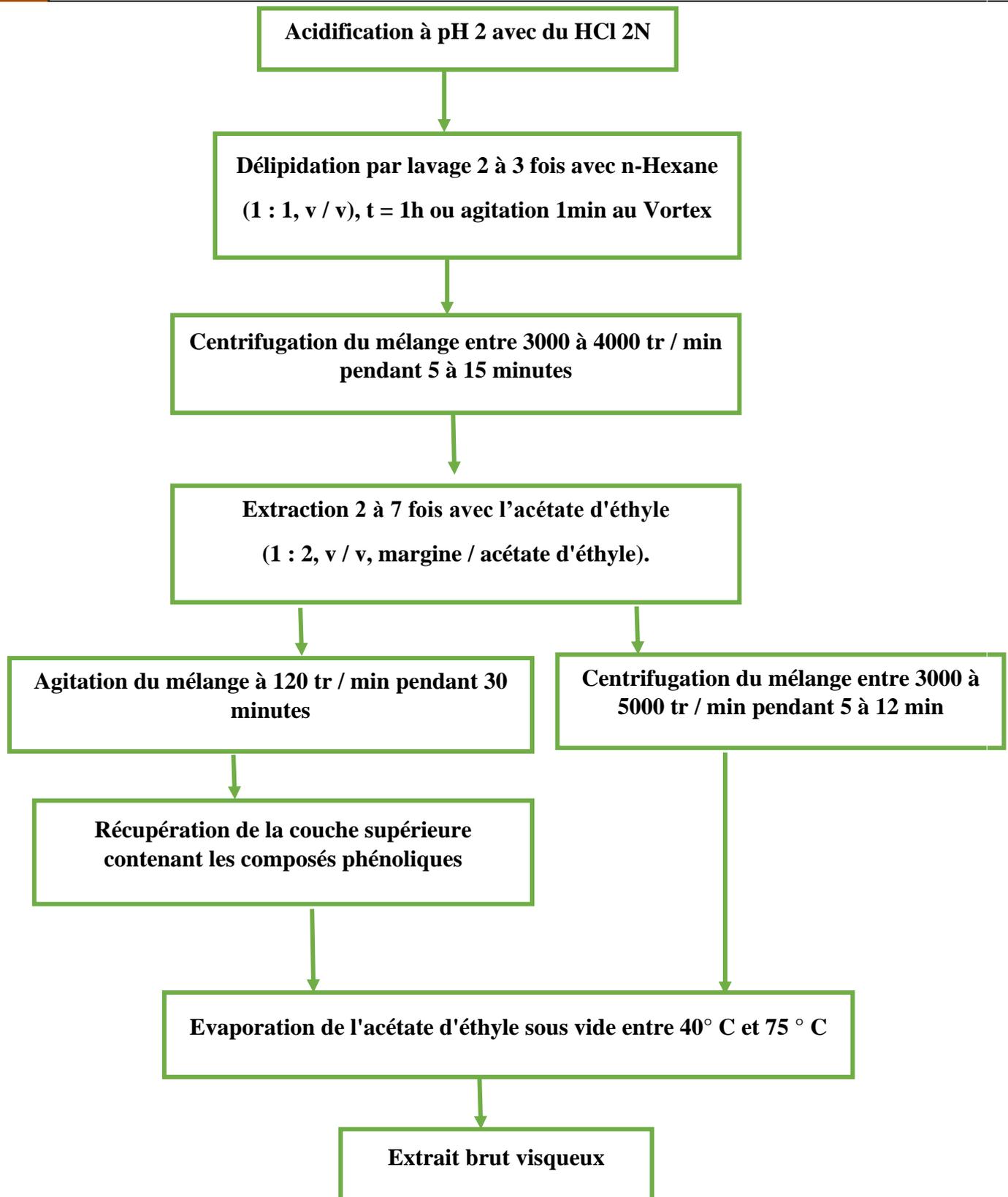
### II. Extraction

Cette étape vise à extraire des composés utiles, en particulier les composés phénoliques pour étudier leurs activités biologiques. Plusieurs études ont été faite pour la récupération de ces composés par la méthode la plus couramment utilisée à savoir, l'extraction liquide-liquide en appliquant généralement des solvants, notamment l'eau, l'éthanol, méthanol, acétate d'éthyle et acétone [103].

L'acétate d'éthyle a été utilisé par plusieurs auteurs [9, 41, 43, 48, 92,104-108]. En effet, *Fki, I et al*, ont démontré que l'acétate d'éthyle est le solvant d'extraction le plus efficace avec un taux d'extraction le plus élevé, un litre de margine donne 4 g d'extrait [48].

*Abu-Lafi, S et al*, ont récupéré des composés phénoliques des margines en comparant le méthanol / acétate d'éthyle avec l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction, les résultats ont montré que l'acétate d'éthyle était toujours le solvant le plus approprié pour l'extraction des composés phénoliques des margines [104]. Généralement, la procédure d'extraction (figure 6) a été effectuée selon les étapes suivantes [41, 43, 92,104-108] :

## DEUXIÈME PARTIE



**Figure 6:** Procédure d'extraction des composés phénoliques des margines

- L'action du HCl permet de rompre la liaison C-O-C liant les sucres aux polyphénols [41, 92, 105,108].
- L'utilisation du n-Hexane pour éliminer toutes les graisses et l'huiles de l'échantillon (la fraction lipidique) [41, 43, 92, 104-108].
- Le mécanisme d'extraction des composés phénoliques des margines est basé sur le principe de solubilité dans les solvants organiques [43].
- Le résidu sec a été dissous dans le méthanol [92,105] ou bien dans le mélange (méthanol : eau) (1 : 1) [108] et cette solution a été utilisée pour la caractérisation, la quantification et le fractionnement des composés phénoliques.

### III. Fractionnement sur colonne

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

*Deeb, A.A et al*, [41] ont suggéré un procédé pour le fractionnement de l'extrait phénolique des margines en utilisant une colonne rempli d'une phase stationnaire de type silice : MN Silica Gel 60 et MN Silica Gel G/UV<sub>254</sub>. Les extraits fractionnés ont ensuite été analysés en utilisant la méthode CG/SM.

- L'extrait brut (4,68 g) a été dissous dans un mélange de solvants chloroforme / méthanol et 5 g de gel de silice ont été ajoutés au mélange.
- Le solvant a été évaporé sous la hotte, puis le mélange a été chargé dans une colonne de gel de silice (155 g de type silice : MN Silica Gel 60, de diamètre 3,5 cm), qui a été emballée avec du chloroforme.
- La colonne a été éluée avec le chloroforme, puis la polarité a été progressivement augmentée en utilisant du méthanol.

Le contenu de chaque fraction collectée a été évaporé et analysé par CCM. Des fractions de compositions similaires ont été collectées ensemble pour donner un total de trois groupes de fractions regroupées [A (I) –A (III)].

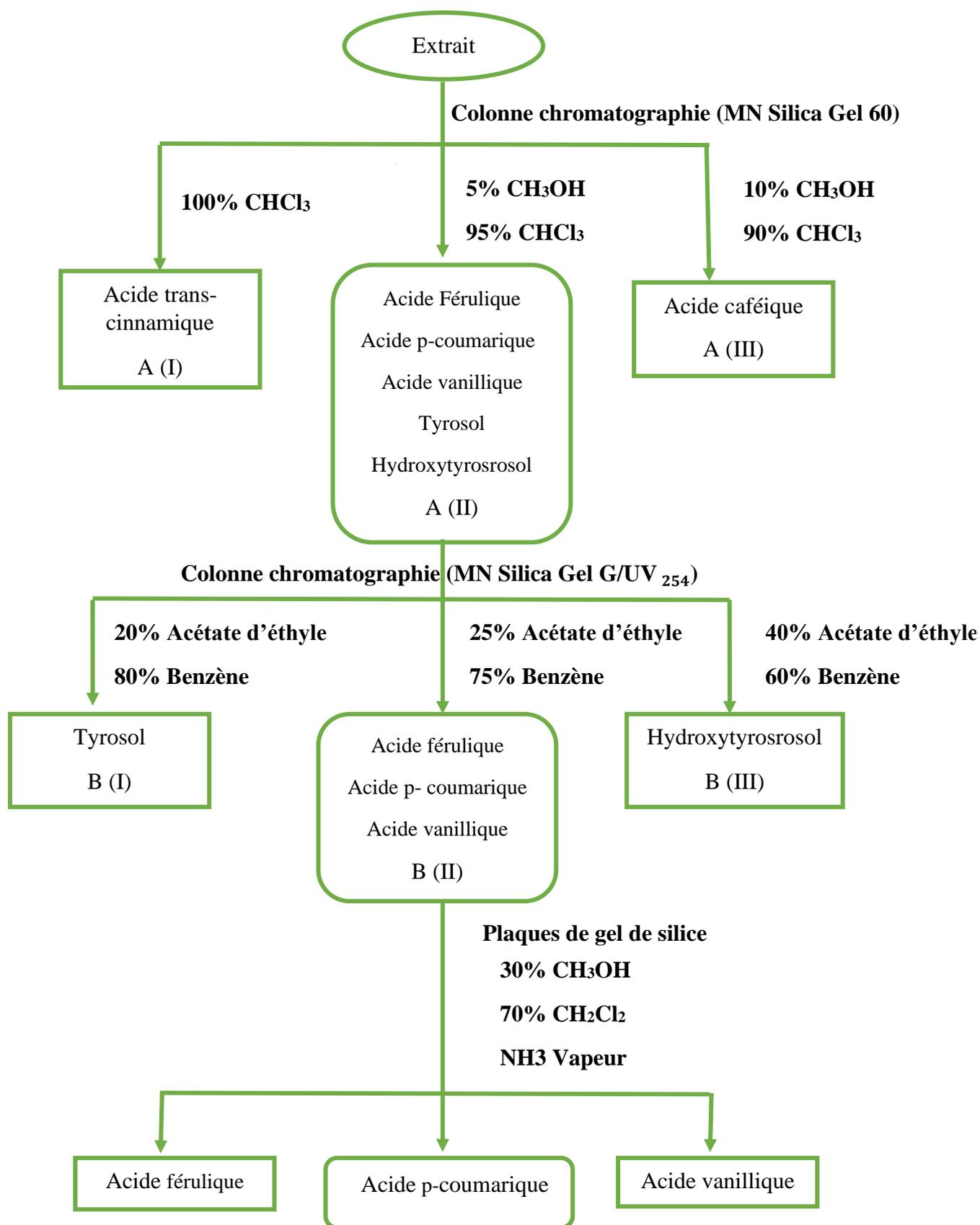
L'échantillon brut du groupe A (II) a été dissous dans un mélange de solvants chloroforme / méthanol et 4 g de gel de silice ont été ajoutés au mélange. Le solvant a été évaporé, puis le mélange a été chargé sur une colonne de gel de silice (150 g de type silice : MN Silica Gel G/UV<sub>254</sub>, de diamètre 3,5 cm).

La colonne a été éluée avec du benzène, puis la polarité a été progressivement augmentée en utilisant de l'acétate d'éthyle.

Les fractions collectées ont été évaporées et séparées par CCM. Des fractions de compositions similaires ont été regroupées pour donner un total de trois groupes collectifs [B (I) –B (III)].

Le groupe B (II) a été séparé sur des plaques de gel de silice en utilisant un système d'éluant de 30% du méthanol et 70% du dichlorométhane en présence de vapeur d'ammoniac. Chacun des composés isolés a été purifié par CCM préparative.

La figure 7 résume le fractionnement des composés phénoliques par chromatographie sur colonne et par CCM.



**Figure 7:** Fractionnement des composés phénoliques par chromatographie sur colonne et par CCM

### IV. Séparation par CLHP

La séparation et l'identification des composés phénoliques dans les extraits des margines a été réalisée par **CLHP** et/ou par le couplage **CLHP/SM**. En général, les études ont été réalisées par **CLHP** à polarité de phase inversée et en mode gradient binaire, en utilisant les éluants suivants : acide phosphorique, acétonitrile, acide acétique, acide trifluoroacétique [**9, 48,92, 104, 106,107**]. Le tableau7 résume quelques conditions opératoires.

## DEUXIÈME PARTIE

**Tableau 7:** Conditions d'analyses en CLHP et CLHP/SM des composés phénolique

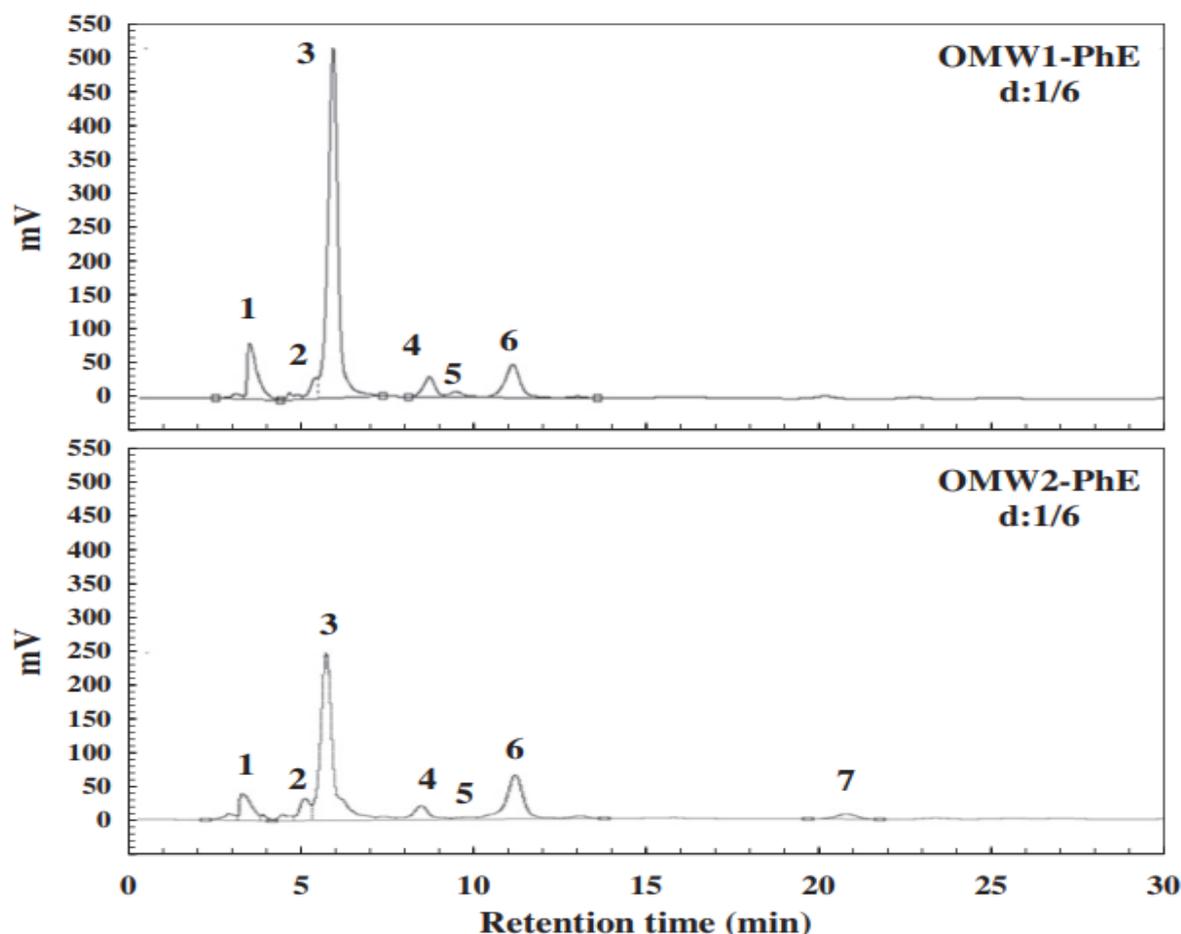
Analyse	Phase stationnaire	Phase mobile	Volume d'injection $\mu\text{l}$	Débit ml/min	Références
CLHP	Colonne à polarité de phase inversée (4 × 250) mm × 5 $\mu\text{m}$	Un mélange d'acétonitrile / l'eau acidifié avec de l'acide acétique.	20	0,8	[9]
CLHP	Colonne à polarité de phase inversée (4, 6 × 250) mm	Un mélange de A (0,1% d'acide phosphorique dans l'eau) et B : (70% d'acétonitrile dans l'eau). La durée de fonctionnement est 40min. Le gradient a changé comme suit : Le solvant B a commencé à 20% et a augmenté immédiatement à 50% en 30 minutes. Après cela, l'élution a été conduite en mode isocratique avec 50% de solvant B dans 5 min. Enfin, le solvant B a diminué à 20% jusqu'à la fin de fonctionnement.		0,5	[48]
CLHP	Colonne à polarité de phase inversée (4, 6 × 250) mm	Un mélange de solvant A (eau : acide trifluoroacétique, 97 : 3, v / v) et solvant B (acétonitrile : méthanol, 80 :20, v / v). Un gradient de 5% à 98% B (45 min) a été appliqué.		1	[92]
CLHP-PDA	Colonne à polarité de phase inversée (4,6 × 150) mm × 5 $\mu\text{m}$ avec une colonne de garde (4,6 × 20) mm × 5 $\mu\text{m}$	Un mélange en mode gradient d'une solution d'acide acétique à 0,5% (A) et d'acétonitrile (B). 100% du solvant A a été utilisé puis diminué à 70% A en 40 minutes, puis à 40% A en 20 minutes, puis à 10% A en 2 minutes et il est resté 10% A pendant 6 minutes puis revenir aux pourcentages de départ en 2 minutes.	10	1	[104]

## DEUXIÈME PARTIE

CLHP / ESI-SM	Colonne à polarité de phase inversée (4,6 × 150) mm × 5 µm	Un mélange constitué du solvant A : TFA (acide trifluoroacétique) 0,05% dans l'eau et de solvant B : TFA 0,05% dans ACN (acétonitrile). Un gradient en six étapes a été appliqué, pour une durée totale de fonctionnement de 76 min, comme suit : à partir de 80% de solvant A et 20% de solvant B en passant à 30% de solvant B en 30 min, puis l'élution isocratique avec 30% de solvant B pendant 10 min, augmenté à 40% en 30 min, diminué à 20% de solvant B en 2 min, et enfin une élution isocratique pendant 4 min.	20	0,5	[106]
CLHP / ESI-SM	Colonne à polarité de phase inversée (4,6 × 150) mm × 5 µm	Un mélange constitué de solvant A (eau + 0,05% acide trifluoroacétique) et de solvant B (acétonitrile + 0,05% méthanol). Un gradient en six étapes a été appliqué, pour une durée totale de fonctionnement de 76 min, comme suit : à partir de 80% de solvant A et 20% de solvant B en passant à 30% de solvant B en 30 min, puis l'élution isocratique avec 30% de solvant B pendant 10 min, augmenté à 40% en 30 min, diminué à 20% de solvant B en 2 min, et enfin une élution isocratique pendant 4 min.	20	0,5	[107]
CLHP	Colonne à polarité de phase inversée (4,6 × 100) mm × 3,5 µm	Un mélange de 0,01% d'acide acétique dans l'eau (A) et l'acétonitrile (B) pour une durée totale de fonctionnement de 50 min. Le gradient est changé comme suit : Le solvant B a commencé à 5% pendant 2 min, puis augmenté à 10% en 6 min, à 20% en 17 min, à 70% en 20 min, à 100% en 1 min et enfin il est resté à 100% B jusqu'à la fin de fonctionnement.		0,7	[109]

## DEUXIÈME PARTIE

Le profil chromatographique par CLHP de l'extrait phénolique obtenu par différents auteurs est reporté sur les figures 8 à 14.

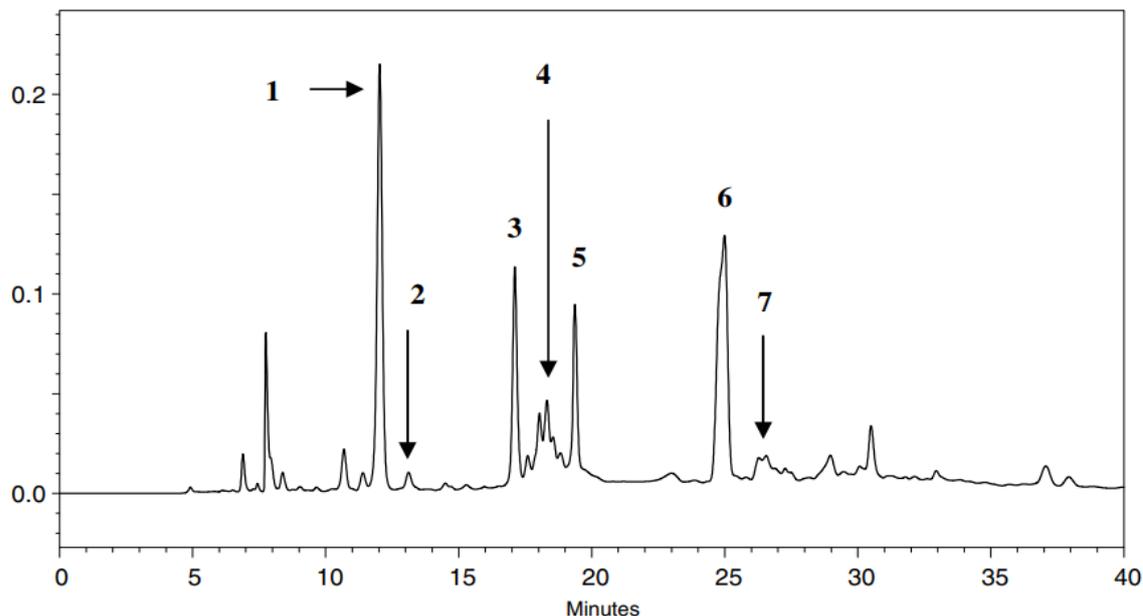


**Figure 8 :** Chromatogramme de l'analyse CLHP représentatif des extraits phénoliques des margines [9]

(1) Acide gallique, (2) Hydroxytyrosol glucoside, (3) Hydroxytyrosol, (4) Tyrosol, (5) Acide caféique, (6) Acide p-coumarique, (7) Oleuropeine aglycone.

Les pics 3, 4, 5 et 6 ont été identifiés à l'aide de standards. Les pics restants ont été provisoirement identifiés par comparaison avec les données de la littérature scientifique.

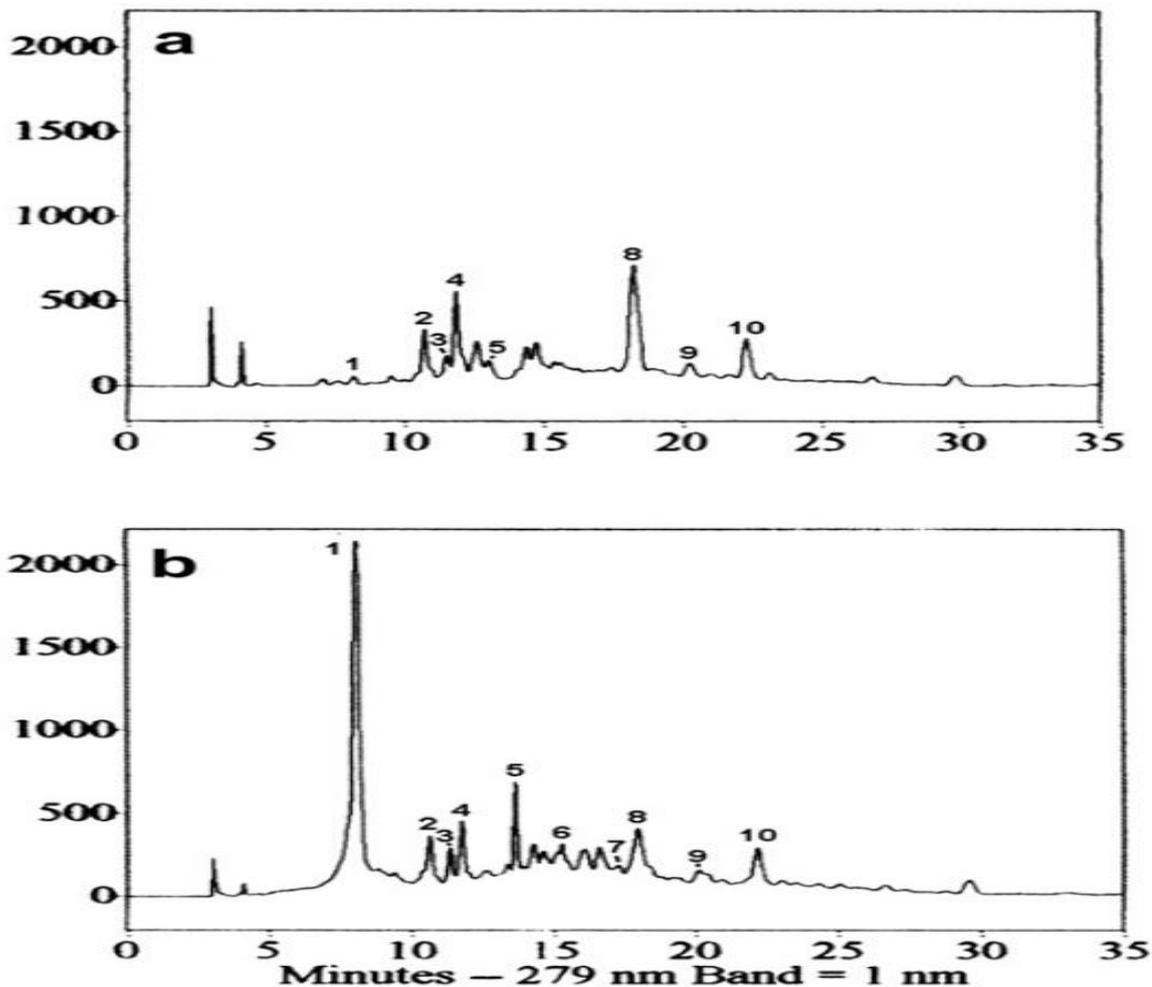
- L'extrait 1 obtenu par procédés semi-modernes et l'extrait 2 obtenu par procédés modernes ont montré des profils phénoliques différents en termes de concentration et également en termes de composition, car l'oleuropeine aglycone n'a été détectée que dans l'extrait 2.
- Les résultats ont montré que l'hydroxytyrosol était le composé phénolique le plus abondant dans les margines et représente environ 70% et 55% de la concentration phénolique totale d'extrait 1 et d'extrait 2, respectivement.



**Figure 9 :** Chromatogramme de l'analyse CLHP de l'extrait des margines obtenu par l'acétate d'éthyle [48]

(1) Hydroxytyrosol, (2) Acide 3,4-dihydroxyphényl acétique, (3) Tyrosol, (4) Acide p-hydroxyphényl acétique, (5) Acide caféique, (6) Acide p-coumarique, (7) Acide férulique

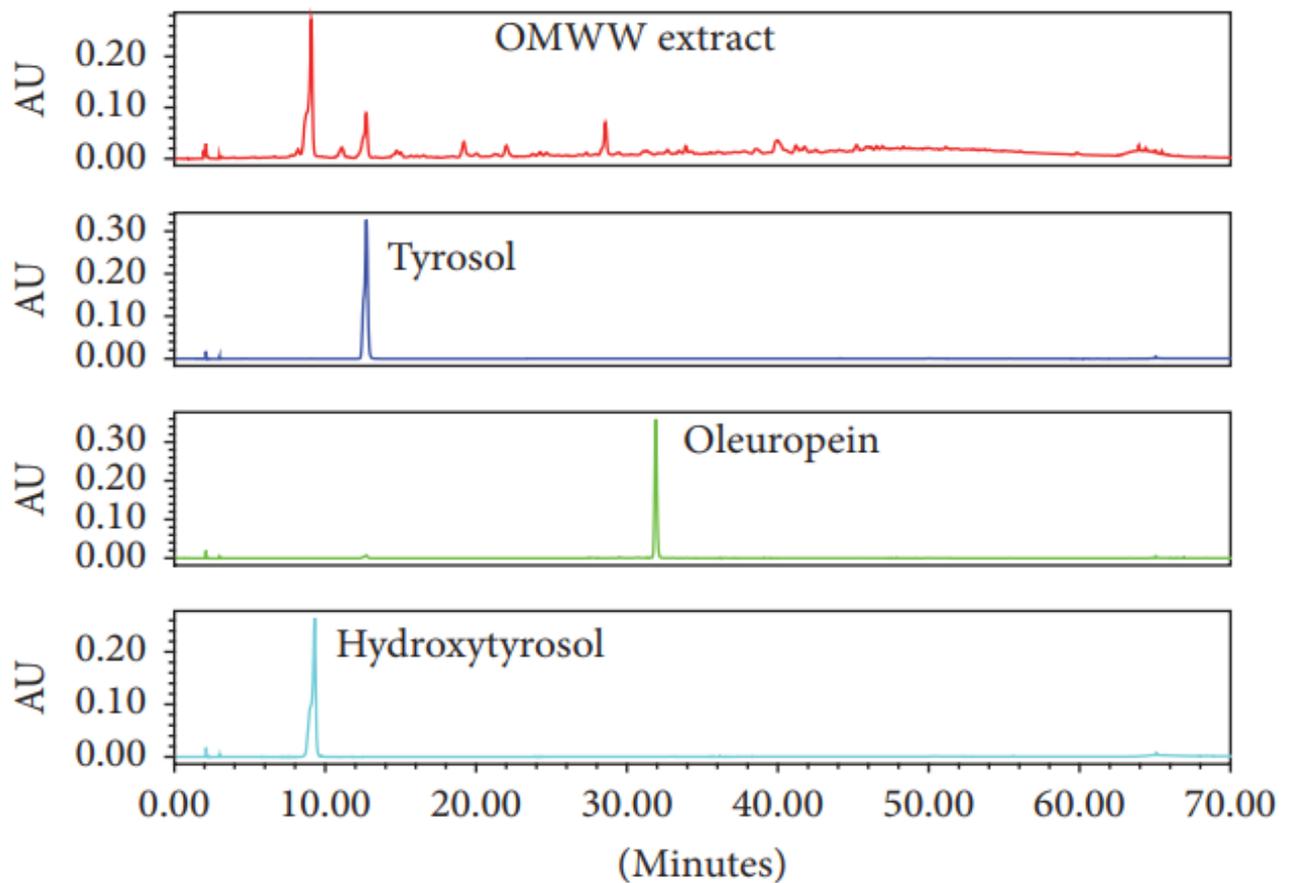
- Les margines ont été obtenues à partir d'un système d'extraction discontinu. Le profil chromatographique révèle que :
- L'hydroxytyrosol et le tyrosol ont été les principaux composés détectés, leurs concentrations dans l'extrait étaient respectivement de 1225 et 345 mg /l.
- L'acide p-hydroxyphényl acétique, l'acide caféique et l'acide p-coumarique étaient présents à des concentrations plus faibles.
- L'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et l'acide férulique ont également été détectés à la même concentration, 70 mg / l.
- L'acide protocatéchique, l'acide vanillique et les acides synergiques et autres composés ont été détectés mais non quantifiés.



**Figure 10 :** Chromatogramme de l'analyse CLHP représentatif d'extrait phénolique brut (a) et acidifié (PH 2 avec HCl) (b) des margines [92]

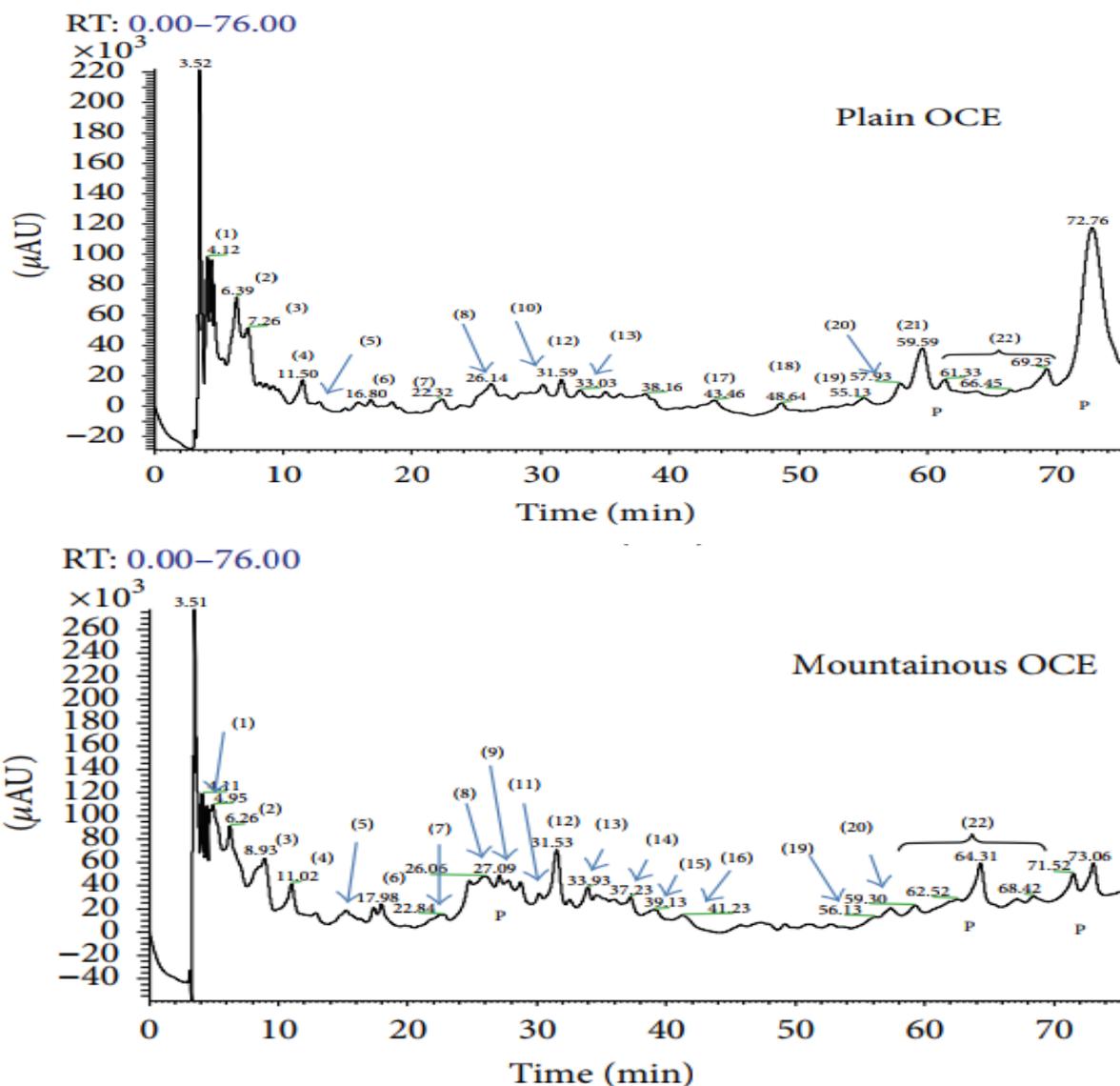
(1) Hydroxytyrosol, (2) Tyrosol, (3) Acide caféique, (4) Acide vanillique, (5) Verbascoside  
 (6) Luteolin-7-glucoside, (7) Acide élénolique, (8) Dialdéhydrique de décarboxyméthyl  
 oleuropéine aglycone, (9) Ligstroside, (10) Lutéoline.

- L'acidification provoque l'hydrolyse de composés phénoliques complexes par conséquence la libération de monomères phénoliques.
- Le chromatogramme d'extrait de margines acidifié obtenue par procédé continu en trois phases montre une augmentation de l'hydroxytyrosol (1), tyrosol (2), acide caféique (3) et verbascoside (5) et une diminution de la forme dialdéhydrique de décarboxyméthyl oleuropéine aglycone (8).



**Figure 11 :** Chromatogrammes de l'analyse CLHP de l'extrait des margines obtenu par l'acétate d'éthyle. [104]

- Les résultats ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle des margines ne contient que de l'hydroxytyrosol et du tyrosol à une concentration de  $371 \pm 2,3$  mg / L et  $272.8 \pm 2.1$  mg / L, respectivement.
- L'oleuropéine n'a pas été détectée dans l'extrait d'acétate d'éthyle car il était vraisemblablement hydrolysé en hydroxytyrosol et en acide élénolique.

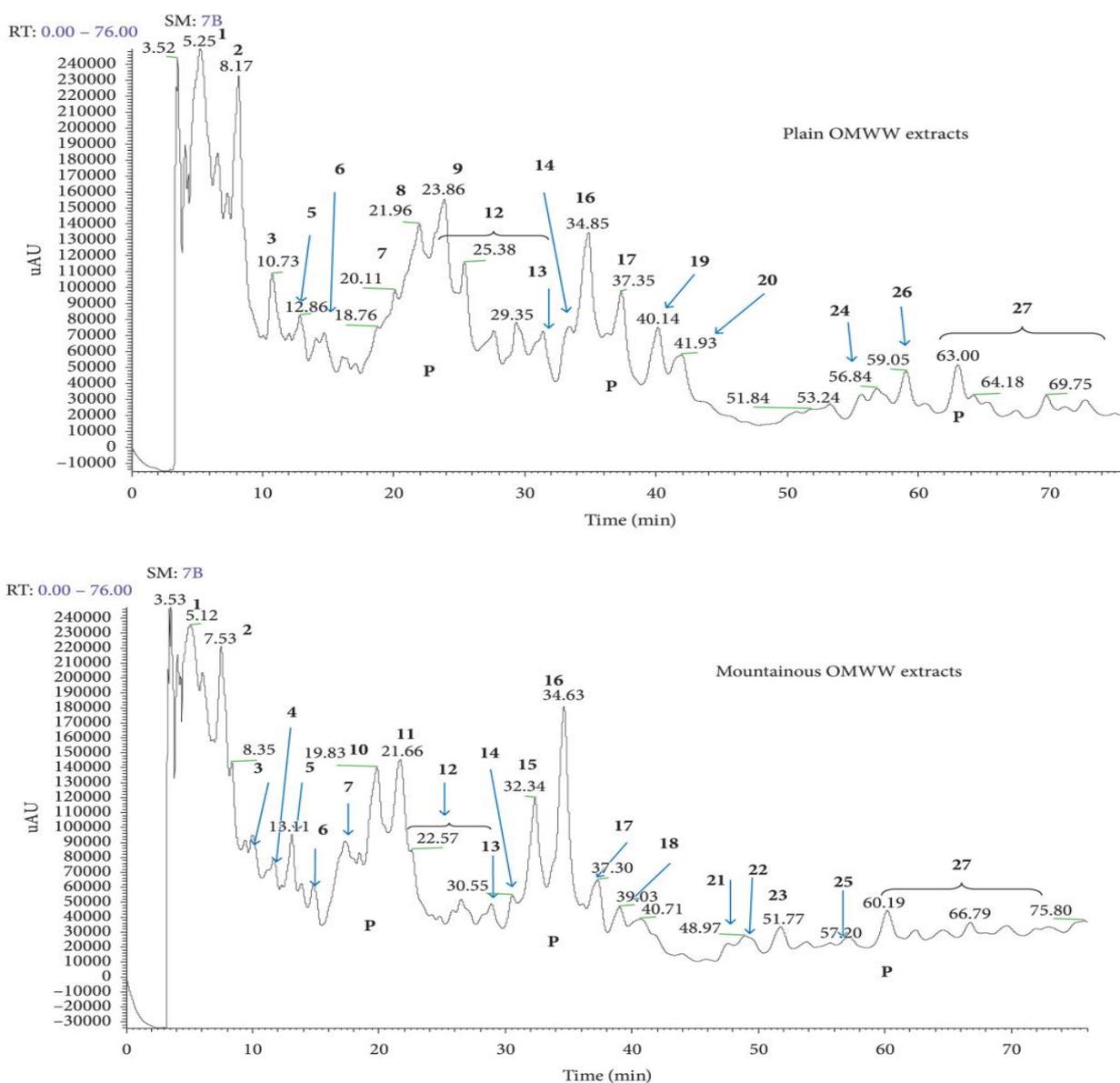


**Figure 12 :** Chromatogramme de l'analyse CLHP du profil phénolique des margines [106]

(1) Hydroxytyrosol glucoside, (2) Hydroxytyrosol, (3) Tyrosol, (4) Acide vanillique, (5) Acide sinapique, (6) Acide syringique, (7) Acide caféique, (8) Acide p-coumarique, (9) Acide dihydroxymandélique, (10) Vanilline, (11) Acide 3,4,5 triméthoxybénéique, (12) Dérivés de sécoiridoïdes, (13) Verbascoside, (14) Rutine, (15) Lutéoline-7-rutinoside, (16) lutéoline-7-glucoside, (17) Lutéoline, (18) Apigénine, (19) Nuzhénide, (20) Quercétine, (21) Apigénine-7-rutinoside, (22) Apigénine-7-glucoside, (23) Oleuropéine, (24) Aglycon d'oleuropéine, (25) Ligstroside, (26) Aglycon de ligstroside, (27) Dérivés de secoiridoïdes et substances polymériques.

## DEUXIÈME PARTIE

- Les principaux biophénols individuels identifiés dans les margines appartiennent à cinq classes, les phénols simples, les acides phénoliques, les dérivés sécoiridoïdes, les flavonoïdes et lignanes.
- Les résultats montrent que l'hydroxytyrosol est le principal composé identifié dans les extraits phénoliques des margines.
- Le tyrosol a également été détecté dans les extraits à un niveau important. Les niveaux réduits d'oleuropéine, de ligstroside et de verbascoside peuvent être attribués à l'hydrolyse de l'hydroxytyrosol, du tyrosol et du hydroxytyrosol glucoside.

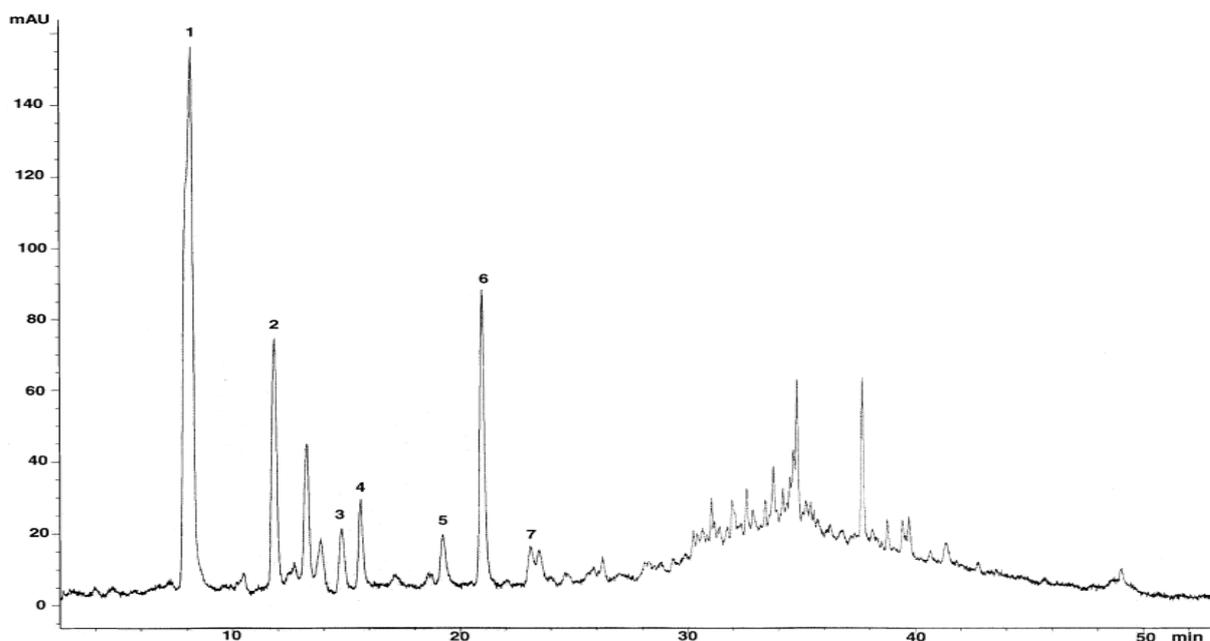


**Figure 13 :** Chromatogramme de l'analyse CLHP représentatif des extraits phénoliques des margines [107]

## DEUXIÈME PARTIE

(1) Hydroxytyrosol glucoside, (2) Hydroxytyrosol, (3) Tyrosol, (4) Acide vanillique, (5) Acide sinapique, (6) Acide syringique, (7) Acide caféique, (8) Acide p-coumarique, (9) Acide dihydroxymandélique, (10) Vanilline, (11) Acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque, (12) Dérivés de secoiridoïdes, (13) Verbascoside, (14) Rutine, (15) Luteolin-7-rutinoside, (16) Luteolin-7-glucoside, (17) Luteoline, (18) Apigénine, (19) Nüzhenide, (20) Quercétine, (21) Apigénin-7-rutinoside, (22) Apigénin-7-glucoside, (23) Oleuropeine, (24) Oleuropeine aglycone, (25) Ligstroside, (26) Ligstroside aglycon, (27) Dérivés de secoiridoïdes, (P) Substances polymériques.

- Les extraits des zones montagneuses contenaient des quantités de biophénols plus élevées (68,81%) que les extraits des zones plaines (58,98%).
- Les analyses CLHP/SM ont révélé la présence d'une grande quantité d'hydroxytyrosol, de flavonoïdes et de dérivés secoiridoïdes.



**Figure 14 :** Chromatogramme de l'analyse CLHP représentatif des extraits phénoliques des margines provenant du système triphasé [109]

- (1) Hydroxytyrosol, (2) Tyrosol, (3) Acide vanillique, (4) Acide caféique, (5) Vanilline, (6) Acide p-coumarique, (7) Acide férulique.
- Le chromatogramme était similaire pour des margines provenant du système biphasique.

- Les analyses CLHP qualitatives et quantitatives des extraits ont montré que l'hydroxytyrosol et le tyrosol étaient les plus abondants.
- L'extrait phénolique provenant du système triphasé avait la concentration la plus élevée en hydroxytyrosol.

### V. Détermination de la teneur en phénol total

La teneur totale en composés phénoliques de chaque extrait a été déterminée par spectrophotométrie par l'utilisation de la méthode du dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu.

Ce dosage est basé sur la quantification des groupements hydroxyles présents dans l'extrait étudié. Le principe du protocole utilisé par différents auteurs [9, 43, 104, 106, 107] est le même avec quelques modifications.

Brièvement, un volume d'extrait de margines a été mélangé avec le réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois, puis un volume de bicarbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) est ajouté au mélange. Le mélange est laissé 1h dans l'obscurité et à température ambiante. Enfin, l'absorbance est lue à 765 nm.

La quantification de composés phénoliques est faite sur la base d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = a x$ ) réalisée en utilisant de l'acide gallique comme référence où x et y représentent la concentration d'acide gallique (mg / L) et l'absorbance à 765 nm.

Les résultats sont exprimés en équivalents d'acide gallique ou bien tyrosol. L'utilisation de ce dernier comme étalon, à cause de sa structure qui est proche de celle du composé majoritaire dans les margines (hydroxytyrosol).

Un inconvénient du test de Folin-Ciocalteu est que les agents réducteurs peuvent interférer dans l'analyse conduisant à une surestimation du contenu phénolique [9].

**Tableau 8:** Teneur en phénol totaux des margines

Teneur en phénols totaux	Référence
9.82 ±0.53 g ; 6.11 ±0.2 g d'équivalent de tyrosol / litre de margine pour l'échantillon issu du processus d'extraction semi-moderne et moderne respectivement.	[9]
4,3 g d'équivalent d'acide gallique / litre de margine.	[43]
2500 ±10 mg d'équivalent d'acide gallique / litre de margine.	[104]
8.90 ±0.728 g d'équivalent d'acide gallique / litre de margine.	[106]
10.1 ±0.011 g ; 8.8 ±0.514 g ; 5.29 ±0.171 g ; 5.27 ±0.230 g d'équivalent d'acide gallique / litre de margine de quatre zones géographiques.	[107]

### VI. Détermination structurale des composés phénoliques des margines

Pour la détermination structurale des composés chimiques, il est nécessaire d'effectuer deux types d'analyses, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (MS).

La spectroscopie RMN est largement considérée comme la technique analytique la plus prometteuse pour identifier et déterminer les structures des composés organiques. Elle est basée sur la propriété magnétique de certains atomes dont le proton ( $^1\text{H}$ ) et le carbone ( $^{13}\text{C}$ ).

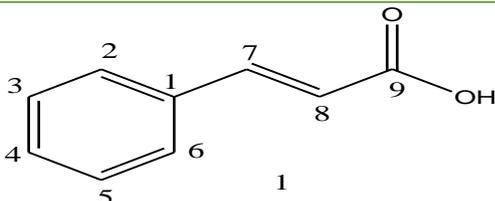
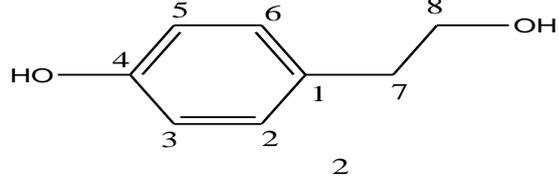
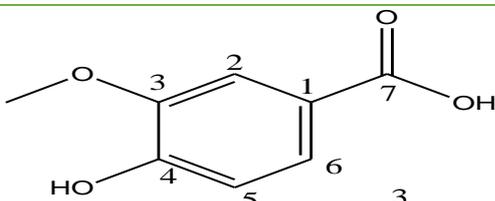
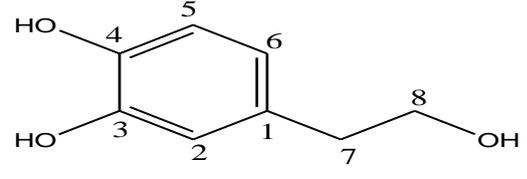
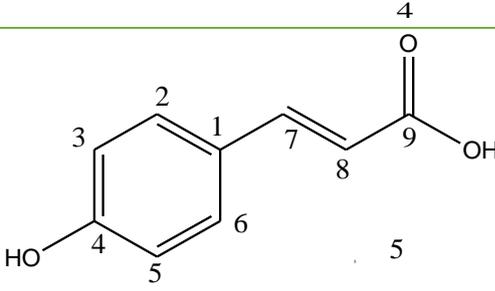
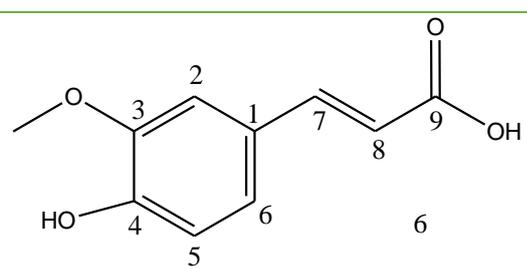
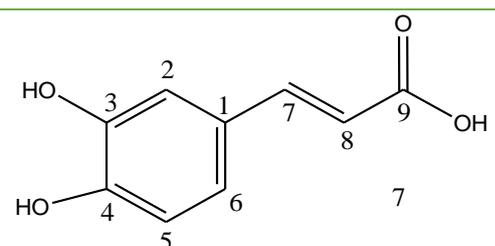
La spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  semble être la méthode RMN préférée en raison de sa sensibilité plus élevée et des temps de relaxation plus courts des noyaux de protons par rapport aux noyaux  $^{13}\text{C}$  qui sont moins sensibles [110].

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant à la fois la séparation ou les molécules sous forme d'ions suivant leur masse, la détection d'ion de masse donnée, de plus, elle permet de caractériser la structure chimique des molécules et de réaliser des analyses quantitatives.

Exemple : *Deeb, A.A et al*, [41] ont réussi dans la détermination structurale de quelques principaux composés phénoliques des margines, en utilisant la RMN  $^1\text{H}$ , la RMN  $^{13}\text{C}$  et la spectrométrie de masse, aussi la détermination de ces concentrations par CG/SM après dérivatisation avec du N, O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide. Les résultats sont regroupés dans le tableau 9.

## DEUXIÈME PARTIE

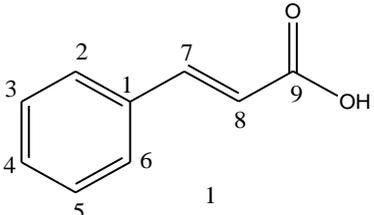
**Tableau 9:** Structures des principaux composés phénoliques des margines

Composés phénoliques	Structures	Concentrations mg / L
Acide trans-cinnamique		105,3
Tyrosol		210,6
Acide vanillique		128,7
Hydroxytyrosol		315,9
Acide p-coumarique		117,0
Acide férulique		93,6
Acide caféique		140,4

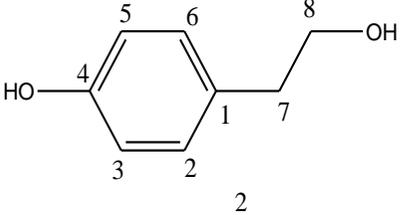
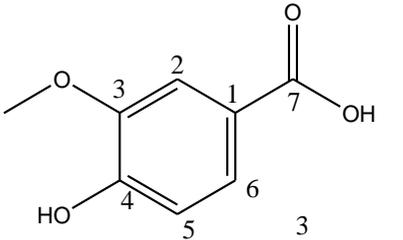
## DEUXIÈME PARTIE

L'élucidation structurale des sept composés phénoliques isolés et identifiés sont présentés dans le tableau ci-après [41].

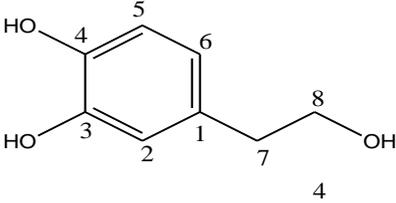
**Tableau 10:** Elucidation structurale des sept composés phénoliques

Molécules	Interprétation		
	Spectrométrie de masse	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C
Acide trans -cinnamique (1) 	L'ion moléculaire à 147 m/z correspond à la formule moléculaire C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> .	Des signaux pour un cycle benzénique monosubstitué sous forme de multiplet à δ 7,36 ppm qui correspond à C2-H et C6-H, un autre signal multiplet à δ 7,15 ppm qui correspond à C3-H, C4-H et C5-H.  Le proton C7-H résonnait à δ 7,48 ppm comme doublet, tandis que le C8-H résonnait à δ 6,2 ppm comme doublet.	Des signaux pour huit atomes de carbone : Le signal à δ 167,3 ppm qui correspond au carbone carbonylé. Les quatre signaux pour les atomes aromatiques monosubstitués à δ 132,7, 128,3, 126,9 et 126,1 ppm qui correspondent respectivement à C1, (C2 et C6), C4 et (C3 et C5). Les atomes de carbone oléfiniques sont apparus à δ 143,3 et 116,3 ppm qui correspondent respectivement à C7 et C8. Le spectre DEPT n'a montré que cinq signaux dans le sens positif à δ 128,3, 126,9, 126,1, 143,3, et 116,3 ppm qui correspondent respectivement à C1, (C2 et C6), C4, (C3 et C5), C7 et C8.
Tyrosol (2)	L'ion moléculaire à 137 m/z correspond à la	La présence de deux doublets à δ 6,68 et 6,96 ppm qui correspondent respectivement aux protons en (C-3-H	La présence de six signaux à δ 155,3, 129,7, 129,6, 114,8, 63,3 et 38,0 ppm.

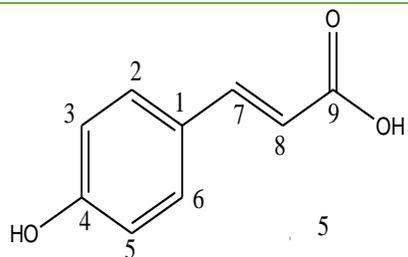
## DEUXIÈME PARTIE

	<p>formule moléculaire <math>C_8H_{10}O_2</math>.</p>	<p>et C5-H) et (C-2-H et C-6-H). Le triplet à <math>\delta</math> 3,68 ppm qui correspond aux deux protons géminés liés au groupe hydroxyle aliphatique.</p> <p>Un autre triplet à <math>\delta</math> 2,65 ppm qui correspond aux deux protons (méthylène lié au cycle aromatique).</p>	<p>Les deux premiers signaux sont affectés aux carbones du cycle aromatique ; le premier qui correspond à C-4 et le second à C-1.</p> <p>La molécule est symétrique, les signaux qui correspondent à (C-2 et C-6) et (C-3 et C-5), apparaissent sous forme de deux signaux à <math>\delta</math> 129,6, 114,8 ppm respectivement.</p> <p>Les signaux de deux carbones de la chaîne latérale : le carbone lié au groupe hydroxyle à <math>\delta</math> 63,3 ppm et le carbone lié au cycle aromatique à <math>\delta</math> 38,0 ppm.</p> <p>Le spectre DEPT n'a montré que quatre signaux, deux d'entre eux sont apparus dans le sens positif à <math>\delta</math> 129,6 et 114,8 ppm qui correspondent respectivement à (C-2 et C6) et (C-3 et C-5), tandis que les autres signaux sont apparus dans le sens négatif à <math>\delta</math> 38,0 et 63,3 ppm qui correspondent respectivement à C-7 et C-8.</p>
<p>Acide vanillique (3)</p> 	<p>L'ion moléculaire à 167 m/z correspond à la formule moléculaire <math>C_8H_8O_4</math>.</p>	<p>La présence de deux doublets à <math>\delta</math> 6,71 et 7,43 ppm qui correspondent respectivement aux deux protons en C-5-H et C-6-H.</p> <p>Le proton aromatique en C-2-H resonance à <math>\delta</math> 7,42 ppm.</p>	<p>La présence de huit carbones dans le spectre, dont trois étaient de carbone de méthine à <math>\delta</math> 114,8, 112,4 et 124,0 ppm qui correspondent respectivement à C-2, C-5 et C-6.</p> <p>Les quatre carbones quaternaires à <math>\delta</math> 121,7, 147,3, 151,3 et 168,8 ppm qui correspondent respectivement à C-1, C-3, C-4 et C-7.</p> <p>L'atome de carbone méthoxyle a montré un signal à <math>\delta</math> 55,0 ppm.</p>

## DEUXIÈME PARTIE

		Les trois protons méthoxyle en position 3 apparaissent sous forme d'un singulet à $\delta$ 3,71 ppm.	Le spectre DEPT n'a montré que quatre signaux dans le sens positif à $\delta$ 114,8, 112,4, 124,0, et 55,0 ppm qui correspondent respectivement à C-2, C-5, C-6 et le carbone méthoxyle.
<p>Hydroxytyrosol (4)</p> 	<p>L'ion moléculaire à 153 m/z correspond à la formule moléculaire <math>C_8H_{10}O_3</math>.</p>	<p>La présence de deux doublets à <math>\delta</math> 6,68 et 6,53 ppm qui correspondent respectivement à C-5-H et C-6-H.</p> <p>Un autre proton aromatique en position C2-H apparaît sous forme de singulet net à <math>\delta</math> 6,71 ppm.</p> <p>Un triplet apparaît à <math>\delta</math> 3,68 ppm qui correspond aux deux protons géminés liés au groupement hydroxyle aliphatique, tandis que les deux protons apparaissant triplet à <math>\delta</math> 2,67 ppm ont été attribués au méthylène lié au cycle aromatique.</p>	<p>La présence de huit signaux dans lesquels trois étaient des carbones de méthines à <math>\delta</math> 115,2, 115,9 et 120,2 ppm qui correspondent respectivement à C-2, C-5 et C-6.</p> <p>Les trois carbones quaternaires à <math>\delta</math> 130,6, 144,7, et 143,2 ppm ont été attribuées respectivement aux signaux de carbones C-1, C-3 et C-4.</p> <p>Enfin, deux signaux à <math>\delta</math> 38,2 et 63,3 ppm ont été attribués respectivement aux deux carbones de la chaîne latérale C-7 et C-8.</p> <p>Le spectre DEPT n'a montré que cinq signaux, dont trois sont apparus dans le sens positive à <math>\delta</math> 115,2, 115,9 et 120,2 ppm qui correspondent respectivement à C-2, C-5, et C-6, tandis que les autres signaux sont apparus dans le sens négative à <math>\delta</math> 63,3 et 38,0 ppm qui correspondent respectivement à C-7 et C-8.</p>
<p>Acide p-coumarique (5)</p>	<p>L'ion moléculaire à 163 m/z correspond à la formule moléculaire <math>C_9H_8O_3</math>.</p>	<p>La présence de deux signaux de protons aromatiques résonnant comme deux doublets à <math>\delta</math> 6,45 et 7,13 ppm qui</p>	<p>Le spectre montre sept signaux pour neuf atomes de carbone.</p> <p>Le signal à <math>\delta</math> 168,0 qui correspond au carbone du carbonyle, les quatre signaux aromatiques à <math>\delta</math> 124,1, 128,0, 113,7 et 158,0 ppm</p>

## DEUXIÈME PARTIE



ont été attribués respectivement à (C3-H et C5-H) et (C2-H et C6-H).

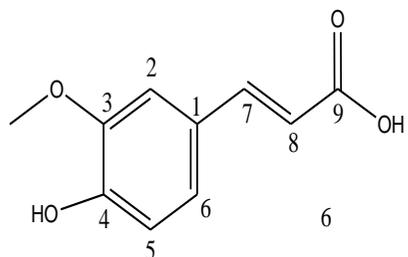
La présence de deux protons oléfiniques résonnant comme deux doublets, l'un attaché au cycle aromatique a un déplacement chimique à  $\delta$  7,31 ppm, tandis que l'autre attaché à l'acide carboxylique a un déplacement chimique à  $\delta$  5,93 ppm.

qui correspondent respectivement à C1, (C2 et C6), (C3 et C5) et C4.

Les atomes du carbone oléfinique sont apparus à  $\delta$  143,7 et 112,4 ppm qui correspondent respectivement à C7 et C8.

Le spectre DEPT n'a montré que quatre signaux dans le sens positif à  $\delta$  128,0, 113,7, 143,7 et 112,4 ppm qui correspondent respectivement à (C2 et C6), (C3 et C5), C7, et C8.

Acide férulique (6)



L'ion moléculaire à 193 m/z correspond à la formule moléculaire  $C_{10}H_{10}O_4$ .

La présence d'un signal de groupe méthoxyle à  $\delta$  3,68 ppm et trois signaux de protons aromatiques résonnant comme deux doublets à  $\delta$  6,62 et 6,89 ppm qui correspondent respectivement à C5-H et C6-H et un singulet à  $\delta$  6,98 ppm qui correspond à C2-H.

Le spectre a montré la présence de deux protons oléfiniques résonnant comme deux doublets, l'un a été

Le spectre montre des signaux pour dix atomes de carbone.

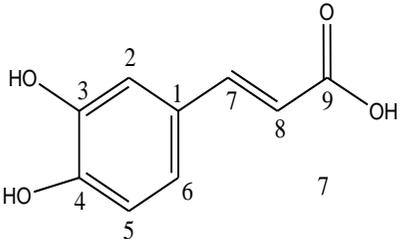
Le signal à  $\delta$  168,0 ppm a été affecté au carbone du carbonyle. Les six signaux pour le carbone aromatique à  $\delta$  124,8, 113,4, 147,4, 146,3, 112,8 et 120,9 ppm qui correspondent respectivement à C1, C2, C3, C4, C5 et C6.

Le carbone du méthoxyle résonne à  $\delta$  53,4 ppm.

Les atomes de carbone oléfinique sont apparus à  $\delta$  143,9 et 108,6 ppm qui correspondent respectivement à C7 et C8.

Le spectre DEPT n'a montré que six signaux dans le sens positif à  $\delta$  113,4, 112,8, 120,9, 143,9, 108,6 et 53,4 ppm qui

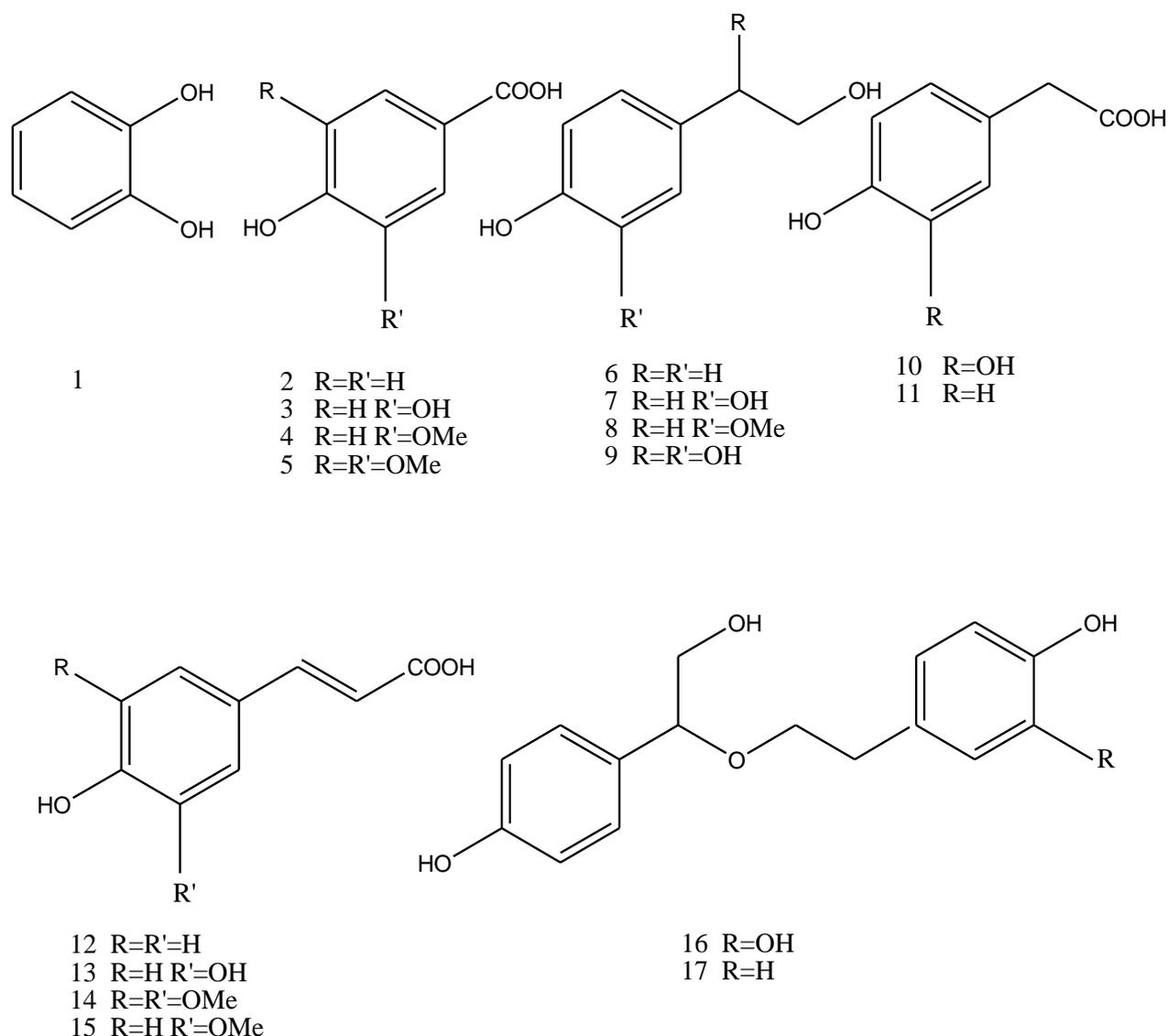
## DEUXIÈME PARTIE

		<p>affecté pour le proton attaché au cycle aromatique à <math>\delta</math> 7,43 ppm, tandis que l'autre qui correspond au proton attaché au groupement du l'acide carboxylique résonne a <math>\delta</math> 6,13 ppm.</p>	<p>correspondent respectivement à C2, C5, C6, C7, C8, et carbone méthoxyle.</p>
<p>Acide caféique (7)</p> 	<p>L'ion moléculaire à 179 m/z correspond à la formule moléculaire <math>C_9H_8O_4</math>.</p>	<p>La présence de deux doublets à <math>\delta</math> 6,68 et 6,83 ppm qui correspondent respectivement aux deux protons en C-5-H et C-6-H.</p> <p>Le singulet à <math>\delta</math> 6,93 ppm a été attribué au proton aromatique en C-2-H.</p> <p>Les deux protons de méthines en positions C-7-H et C-8-H sont apparues respectivement comme deux doublets à <math>\delta</math> 7,45 et 6,11 ppm.</p>	<p>La présence de neuf carbones dans le spectre dont cinq étaient de carbones de méthines (trois carbones aromatiques et deux carbones aliphatiques) à <math>\delta</math> 113,5, 112,1, 119,9, 144,1 et 112,5 ppm qui correspondent respectivement à C2, C-5, C-6, C-7 et C-8.</p> <p>Les quatre carbones quaternaires à <math>\delta</math> 124,8, 143,8, 146,5 et 168,1 ppm ont été attribués respectivement à C-1, C-3, C-4 et C-9.</p> <p>Le spectre DEPT n'a montré que cinq signaux dans le sens positif à <math>\delta</math> 113,5, 112,1, 119,9, 144,1, et 112,5 ppm qui correspondent respectivement à C-2, C-5, C-6, C-7 et C-8.</p>

## DEUXIÈME PARTIE

Les molécules suivantes ont également été détectées dans les margines par *DellaGreca, M et al*, [14], en utilisant la RMN  $^1\text{H}$ , la RMN  $^{13}\text{C}$  et la spectrométrie de masse :

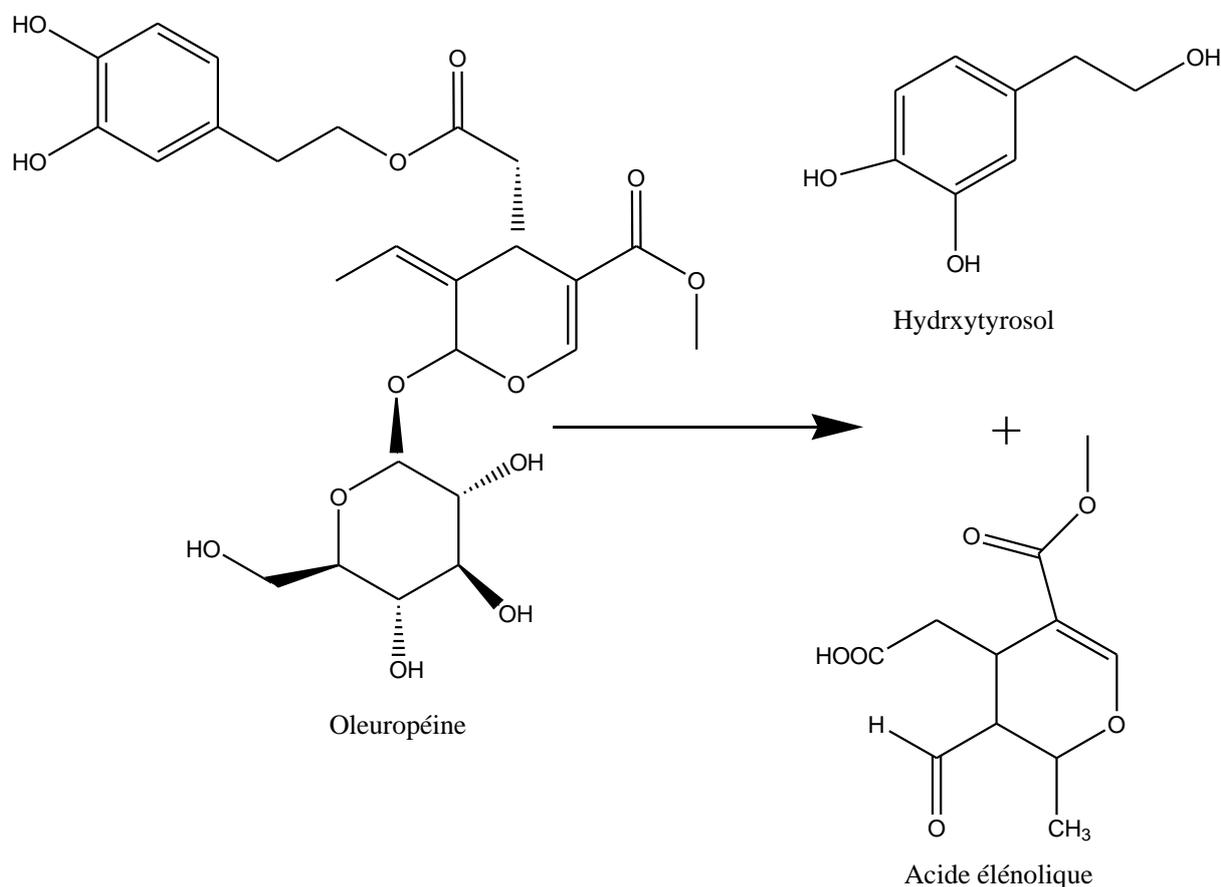
(1) : Catechol; (2) : Acide-4-hydroxybenzoïque; (3): Acide protocatechique; (4): Acide vanillique; (5): Acide-4-hydroxy—3,5-dimethoxybenzoïque; (6): Tyrosol; (7): Hydroxytyrosol ; (8): 2-(4-hydroxy-3-methoxy) phenylethanol; (9): 2-(3,4-dihydroxy)phenyl glycol; (10): Acide (3-4-dihydroxy) phenyl acétique; (11): Acide 4-hydroxy phenyl acétique; (12): Acide p-coumarique; (13): Acide férulique; (14): Acide sinapique; (15): Acide caféïque; (16,17): Dimères .



**Figure 15** : Autres composés phénoliques des margines

**Remarque :** *Visioli, F et al*, [111] ont rapporté que l'oleuropéine, un ester d'acide élénolique et l'hydroxytyrosol, est un composé phénolique majeur dans les margines, alors qu'*Allouche, N et al*, [112] n'a pas identifié ce composé dans leur margines.

Une explication pourrait être que la margine a été échantillonnée tard dans la récolte de l'olivier (olives mures), lorsque l'oleuropéine a été dégradée en acide élénolique et en hydroxytyrosol par une estérase au cours de procédé d'extraction mécanique de l'huile d'olive [111], comme précisé sur la figure 16 [104] ce qui explique la teneur élevée d'hydroxytyrosol dans les margines [48, 92, 104,113].



**Figure 16 :** Hydrolyse de l'oleuropéine en hydroxytyrosol et en acide élénolique [104]

### VII. Détermination de l'activité antioxydante par diverses méthodes

Beaucoup d'études ont été faites pour l'évaluation des propriétés antioxydantes des composés phénoliques et plusieurs méthodes spectrophotométriques ont été développées pour déterminer l'activité antioxydante des composés phénoliques. Cette activité est principalement due à leurs propriétés redox, qui les font agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène [114]. Il existe deux types de tests antioxydants utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes. La première catégorie mesure le potentiel d'extraits de plantes pour réduire les ions ou des oxydants (pour agir comme agents réducteurs) comme l'ion ferrique et l'ion cuivrique. Les deux principaux tests de cette catégorie d'activité antioxydante sont **FRAP** et **CUPRAC**. La deuxième catégorie d'activité antioxydante mesure la capacité des extraits de plantes à piéger les radicaux libres : **DPPH** et **ABTS** (des radicaux libres stables), ce sont les deux principaux exemples de cette catégorie. Ces tests sont utilisés car ils sont rapides et simples à effectuer, la réaction est reproductible et linéairement liée à la concentration molaire des antioxydants présents [104].

- *Fki, I et al*, [48] ont choisi le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) pour déterminer l'activité antioxydante de l'extrait de margines et ses principaux composés phénoliques.

Un volume de 4 ml de solution méthanolique de diverses concentrations d'échantillons ont été ajoutées aux 10 ml de solution DPPH méthanolique ( $1,5 \cdot 10^{-4}$  M).

Après avoir mélangé les deux solutions doucement et laisser 30 min dans la température ambiante, la densité optique a été mesurée à 520 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'activité antioxydante de chaque échantillon a été exprimée en termes de CI50 (la concentration de l'antioxydant qui provoque l'inhibition de 50% de l'activité de DPPH) et calculée à partir de la courbe d'inhibition.

L'effet antiradicalaire DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) de l'extrait de margines et ses principaux composés phénoliques est présenté dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Effets des composés phénoliques sur le radical DPPH

Échantillons	CI50 (µg/ml)
Extrait de margines	<b>1.20</b>
Hydroxytyrosol	<b>0.57</b>
Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique	<b>0.64</b>
Acide férulique	<b>1.21</b>
Acide caféique	<b>0.87</b>
Tyrosol	<b>10.9</b>
Acide p-coumarique	<b>9.50</b>
Acide p-hydroxyphénylacétique	<b>12.2</b>
BHA	<b>0.91</b>
BHT	<b>0.89</b>

- Les composants aromatiques ont montré une activité de piégeage plus élevée sur DPPH, en particulier l'hydroxytyrosol et l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, qui présentent des valeurs suivantes de CI50 : 0,57 et 0,64 µg/ml, respectivement.
- Cependant, le tyrosol et l'acide p-hydroxyphénylacétique, possédant qu'une seule fonction hydroxyle, donc ils n'ont montré aucune activité intéressante (CI50 = 10,9 et 12 µg/ml).
- En particulier, l'activité antioxydante d'hydroxytyrosol et d'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, ainsi que l'acide caféique étaient plus élevés que ceux du BHA et BHT. Ces résultats suggèrent que l'effet de piégeage des radicaux de l'extrait de margines (1,2 µg/ml), qui est partiellement liée à sa teneur en hydroxytyrosol, en acide caféique et en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, est comparable à celles des antioxydants synthétiques BHA et BHT.
- *Giuffrè, A.M et al, [108]* ont prouvé que l'efficacité antioxydante des différents extraits se sont révélés être en corrélation directe avec le pourcentage d'hydroxytyrosol.
- D'autres études [9,107] ont conclu que l'hydroxytyrosol est l'un des plus puissants antioxydants.

### VIII. Détermination de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique)

Beaucoup d'attention a été prêtée aux extraits bruts des plantes qui commencent à avoir plusieurs d'intérêt comme sources naturelles des antibiotiques à cause de l'effet indésirable des antimicrobiens synthétiques et la résistance des micro-organismes.

Parmi les antibiotiques naturels, on cite les composés phénoliques qui sont des agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes qui est confirmé par de nombreuses études in vitro.

Les composés phénoliques confèrent une activité antibactérienne, car ces composés sont caractérisés par une dénaturation des protéines en raison de leur chaîne latérale acide [43].

La sensibilité des différentes souches aux divers antibiotiques est traduite par la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique qui empêche et inhibe la croissance d'une bactérie à étudier, cette sensibilité est appréciable à l'œil nu après un temps d'incubation [115].

Deux genres de techniques sont les plus utilisés pour déterminer la CMI [115], la méthode de diffusion et la méthode de dilution. Dans la première méthode les extraits sont déposés sur des disques de papier ou dans des puits creusés dans la gélose. Dans la seconde méthode, les extraits sont incorporés dans des cultures liquides dans lesquels les bactéries sont présentes.

#### 1. Méthode de diffusion

Des disques à papier buvard sont imprégnés de l'antibiotique choisi et à une concentration précise, puis ils sont déposés à la surface de gélose, déjàensemencé avec une culture pure d'une souche donnée. Après une période d'incubation, les disques s'entourent de zones circulaires d'inhibition représentant une absence de croissance. Ces zones peuvent être mesurées en mm par plusieurs méthodes. Les diamètres mesurés des zones d'inhibition permettent d'estimer la sensibilité des souches. Plus le diamètre de zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique, plus il est petit, plus la souche est résistante à l'antibiotique [115].

#### 2. Méthode de dilution

Le principe de la méthode de dilution en milieu de culture liquide consiste à préparer une série de tubes de différentes concentrations d'antibiotique choisi, puis l'addition d'une souche donnée. Après une période d'incubation, on détermine la plus faible concentration d'antibiotique inhibitrice de la croissance bactérienne (CMI), appréciable à l'œil nu [115].

## DEUXIÈME PARTIE

Les activités antibactériennes des extraits ont été étudiées par une méthode de diffusion de puits par *Abu-Lafi, S et al, [104]*.

- La bactérie gram positive (*Staphylococcus aureus*) et la bactérie gram négative (*Escherichia coli*) ont été testées.
- Le milieu : Gélose Mueller Hinton.
- 100 µL de chaque extrait ont été placés dans chaque trou pour chaque plaque.
- Les plaques ont été incubées à  $37 \pm 0,5$  ° C pendant 24 heures.
- Les résultats ont montré que l'extrait des margines a une activité sur les bactéries gram positives (*Staphylococcus aureus*) avec une zone d'inhibition égale à 23 mm. Il a également un effet sur les bactéries à gram négatif (*Escherichia coli*) avec des zones d'inhibition de 25 mm, par rapport à celle des antibiotiques standards qui étaient de 10 mm pour la pénicilline utilisée contre *Staphylococcus aureus* et de 13 mm pour la gentamicine utilisée contre l'*Escherichia coli*.

L'activité antifongique des extraits a été étudiée par *Abu-Lafi, S et al, [104]*.

- La gélose Mueller Hinton a été préparée en tubes ; les tubes ont été fondus par chauffage au bain-marie. Après que l'extrait des margines (100 µl) soit ajouté à l'un des tubes à 45° C, tandis que l'autre tube est laissé sans extrait (à utiliser comme contrôle positif). Le mélange est versé dans une boîte de pétri et laissez refroidir. Une partie d'une colonie d'*Aspergillus niger* avec un diamètre de 0,5 mm a été placé au centre de la surface de la plaque.
- La plaque a été incubée à 37 ° C pendant une semaine, puis le diamètre de la colonie a été mesuré et comparé à celui sur le contrôle positif (gélose sans extrait des margines) qui était préparé en suivant les mêmes étapes.
- Les résultats ont montré que l'extrait des margines est efficace contre l'*Aspergillus niger*, le champignon filamenteux qui montre une croissance du diamètre de la colonie d'environ 20% de celle de la colonie qui a été cultivé à la surface de la gélose sans extrait (contrôle positif).
- ❖ Une étude de *Tafesh. A et al, [116]* a montré que la plupart des phénols des margines n'étaient pas efficaces contre les souches bactériennes étudiées lorsqu'ils étaient testés en tant qu'un composé unique, sauf l'hydroxytyrosol qui présente une forte activité antibactérienne et l'acide gallique :

## DEUXIÈME PARTIE

---

- L'hydroxytyrosol à 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  est capable de provoquer une inhibition complète de la croissance des quatre souches : deux bactéries gram positif (*Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*) et deux bactéries gram négatif (*Escherichia coli* et *Klebsiella*).
- L'acide gallique était efficace à 200 et 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  est contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*, respectivement, mais pas contre le gram négatif

# Conclusion

## CONCLUSION

Les margines, sous-produit obtenu par l'industrie oléicole ; une fois rejetée sans avoir subi des traitements préalables, exercent un impact négatif sur l'environnement en raison de leur charge élevée en composés phénoliques qui sont difficilement biodégradables. Elles présentent une phytotoxicité élevée contre les microorganismes du sol et la vie aquatique.

Les margines représentent une source importante de polyphénols dotés d'activités biologiques très intéressantes, par conséquent, leur valorisation répond à un double objectif, exploiter leurs propriétés biologiques et réduire leur activité polluante sur l'environnement. Les composés phénoliques constituent une richesse largement exploitée par les industries agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques, à cause de leurs larges spectres d'activité biologique, c'est la raison qui nous a poussés à s'intéresser à l'étude de l'analyse chimique et propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des extraits phénoliques séparés des margines.

Dans un premier volet, une étude des caractéristiques physico-chimiques des margines montre que le pH est légèrement acide 4,7 - 5,7, la salinité est élevée 4.7 et un pouvoir polluant très élevé représenté par le DCO et le DBO qui peut atteindre les valeurs suivantes : 16.5-190 g/l et 41.3-46 g/l.

La procédure d'extraction utilisée par plusieurs auteurs révèle que l'acétate d'éthyle est le solvant d'extraction le plus efficace avec un taux d'extraction le plus élevé.

Plus de 20 composés phénoliques des margines ont été identifiés par CLHP, dont la quantité et la composition étaient différentes en fonction de la variété d'olives et/ou du procédé de trituration.

Les 7 composés phénoliques isolés, quantifiés et identifiés par RMN  $^1\text{H}$ , la RMN  $^{13}\text{C}$  et CG/SM sont : Acide trans-cinnamique, Tyrosol, Acide vanillique, Hydroxytyrosol, Acide p-coumarique, Acide férulique, Acide caféique et le composé phénolique majoritaire était le monomère phénolique l'hydroxytyrosol avec une concentration de 315,9 mg / L.

Les résultats du dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu varient entre 2.5 à 10.1 g d'équivalent d'acide gallique / litre de margine. Ces résultats montrent clairement la richesse de margines en composés phénoliques

Pour l'évaluation de l'activité biologique des composés phénoliques, il est impératif de recourir à des tests biologiques appropriés, dont l'évaluation de l'activité antioxydante a montré que l'hydroxytyrosol est l'un des plus puissants antioxydants, aussi l'efficacité antioxydante des différents extraits est en corrélation directe avec le pourcentage d'hydroxytyrosol.

## CONCLUSION

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré que l'extrait des margines à une activité sur les bactéries gram-positives (*Staphylococcus aureus*) avec une zone d'inhibition égale à 23 mm. Il a également un effet sur les bactéries à gram négatif (*Escherichia coli*) avec des zones d'inhibition de 25 mm, également, l'extrait des margines est efficace contre le champignon filamenteux (*Aspergillus niger*).

La plupart des phénols des margines lorsqu'ils étaient testés individuellement ne présentent aucune activité antibactérienne, sauf l'hydroxytyrosol et l'acide gallique, dont l'hydroxytyrosol à  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  est capable de provoquer une inhibition complète de la croissance des quatre souches : deux bactéries gram positif (*Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*) et deux bactéries gram négatif (*Escherichia coli* et *Klebsiella*). L'acide gallique était efficace à 200 et  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*, respectivement, mais non actif vis-à-vis des bactéries gram négatifs.

Finalement, les informations acquises dans cette étude ne doivent pas rester limitées à un cadre de mémoire de fin d'études. Il serait intéressant à l'avenir de compléter cette étude par l'exploration d'autres composés phénoliques ayant d'autres activités bénéfiques.

# Références Bibliographiques

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [1] Iboukhouléf, H. (2014). *Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydation avancée basé sur le système fenton-like (H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>/Cu)* (Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie).
- [2] Mili, S. (2006). Olive oil marketing on Non-traditional markets: prospects and strategies. *Mediterranean Journal of Economics, Agriculture and Environment*, 5(1), 27-37.
- [3] ONFAA. (Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires). Juin 2016. Bilan de la campagne oléicole 2015/2016 « *Segment huile d'olive* ». République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche.
- [4] Rusan, M. J., Albalasmeh, A. A., & Malkawi, H. I. (2016). Treated olive mill wastewater effects on soil properties and plant growth. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(5), 135.
- [5] Tsagaraki, E., Lazarides, H. N., & Petrotos, K. B. (2007). Olive mill wastewater treatment. In *Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food Industry*, 133-157.
- [6] Senani-oularbi, N. (2018). *Etude des activités anti-oxydante, antifongique et hypoglycémiantes des margines d'olives et de leur extrait phénolique. Applications sur matrice alimentaire et sur modèle murin et cellulaire* (Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie).
- [7] Moussaoui, R. (2007). *Valorisation des sous-produits de l'huilerie d'olive, grignons et margines* (Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie).
- [8] Yaakoubi, A., Chahlaoui, A., Rahmani, M., Elyachioui, M., & Oulhote, Y. (2009). Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agrosolutions*, 20 (1), 35-43.
- [9] El-Abbassi, A., Kiai, H., & Hafidi, A. (2012). Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*, 132(1), 406-412.
- [10] Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulou-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532-1552.
- [11] Belaid, C., Kallel, M., & Elleuch, B. (2002). Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive (margines). *Déchets sciences et techniques*, 27, 30-34.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [12] Paredes, M. J., Moreno, E., Ramos-Cormenzana, A., & Martinez, J. (1987). Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, 16(7), 1557-1564.
- [13] Colarieti, M. L., Toscano, G., & Greco, G. (2006). Toxicity attenuation of olive mill wastewater in soil slurries. *Environmental Chemistry Letters*, 4(2), 115-118.
- [14] DellaGreca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., & Temussi, F. (2001). Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill wastewaters. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 67(3), 352-359.
- [15] El Hadrami, A., Belaqziz, M., El Hassni, M., Hanifi, S., Abbad, A., Capasso, R & El Hadrami, I. (2004). Physico-chemical characterization and effects of olive oil mill wastewaters fertirrigation on the growth of some Mediterranean crops. *Journal of Agronomy*, 3(4), 247-254.
- [16] Paixao, S. M., Mendonça, E., Picado, A., & Anselmo, A. M. (1999). Acute toxicity evaluation of olive oil mill wastewaters: a comparative study of three aquatic organisms. *Environmental Toxicology*, 14(2), 263-269.
- [17] Rana, G., Rinaldi, M., & Introna, M. (2003). Volatilisation of substances after spreading olive oil wastewater on the soil in a Mediterranean environment. *Agriculture, ecosystems & environment*, 96(1-3), 49-58.
- [18] Chasekioglou, A. N., Goula, A. M., Adamopoulos, K. G., & Lazarides, H. N. (2017). An approach to turn olive mill wastewater into a valuable food by-product based on spray drying in dehumidified air using drying aids. *Powder technology*, 311, 376-389.
- [19] Atanassova, D., Kefalas, P., & Psillakis, E. (2005). Measuring the antioxidant activity of olive oil mill wastewater using chemiluminescence. *Environment international*, 31(2), 275-280.
- [20] Liphshitz, N., Gophna, R., Hartman, M., & Biger, G. (1991). The beginning of olive (*Olea europaea*) cultivation in the Old World: a reassessment. *Journal of Archaeological Science*, 18(4), 441-453.
- [21] Blaquez, Jose.M. (1997). *Origine et diffusion de la culture de l'olivier*. Livre COI, encyclopédie de l'olivier. Madrid. P, 19-20.
- [22] Ryan, D., Robards, K., & Lavee, S. (1999). Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 832(1-2), 87-96.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [23] Fouin, J., Sarfati, C., & Guillard, J. (2002). *Le guide des huiles d'olive*. Ed. Du Rouergue. P, 335.
- [24] Muzzalupo, I. (2012). *Olive Germplasm: The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. BoD–Books on Demand.
- [25] Ghedira, K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83-89.
- [26] Fedeli, E. (1997). *Technologie de production et de conservation de l'huile*. Conseil Oléicole International, Ed. Encyclopédie Mondiale de l'Olivier. Madrid (Espagne) : COI, 253-273.
- [27] Nefzaoui, A. (1984). *Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie*. Étude FAO production et santé animales. P, 1-121.
- [28] Labdaoui, D. (2017). *Impact socio-économique et environnemental du modèle d'extraction des huiles d'olives à deux phases et possibilités de sa diffusion dans la région de Bouira (Algérie)* (Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Babis, Mostaganem, Algérie)
- [29] Aggoun-Arhab, M. (2016). *Caractérisation de la composition en micro constituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière* (Thèse de Doctorat, Institut National de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaire (INATAA), Constantine, Algérie).
- [30] Chimi, H. (2006). Technologies d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. *Bulletin de transfert de technologie*, MADRPM/DERD, 141.
- [31] Chouchene, A., Jeguirim, M., Favre-Reguillon, A., Trouvé, G., Le Buzit, G., Khiari, B., & Zagrouba, F. (2012). Energetic valorisation of olive mill wastewater impregnated on low cost absorbent: Sawdust versus olive solid waste. *Energy*, 39(1), 74-81.
- [32] Chiofalo, B., Liotta, L., Zumbo, A., & Chiofalo, V. (2004). Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition. *Small Ruminant Research*, 55(1-3), 169-176.
- [33] Nefzaoui A. (1988). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par valorisation optimale des sous-produits. *Options méditerranéens*, 1988,153-173.
- [34] Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sanchez, M., & Lopez, M. J. (1995). Bioremediation of alpechin. *International biodeterioration & biodegradation*, 35(1-3), 249-268.
- [35] Takaç, S., & Karakaya, A. (2009). Recovery of phenolic antioxidants from olive mill wastewater. *Recent Patents on Chemical Engineering*, 2(3), 230-237.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [36] Jeguirim, M., Chouchène, A., Réguillon, A. F., Trouvé, G., & Le Buzit, G. (2012). A new valorisation strategy of olive mill wastewater: Impregnation on sawdust and combustion. *Resources, Conservation and Recycling*, 59, 4-8.
- [37] Achak, M., Ouazzani, N., Yaacoubi, A., & Mandi, L. (2008). Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essais de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 21(1), 53-67.
- [38] Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parrella, A., & Temussi, F. (2003). Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(4), 1005-1009.
- [39] Khoufi, S., Feki, F., & Sayadi, S. (2007). Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 142(1-2), 58-67.
- [40] Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P., & Crowther, J. C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(1), 1-26.
- [41] Deeb, A. A., Fayyad, M. K., & Alawi, M. A. (2012). Separation of polyphenols from Jordanian olive oil mill wastewater. *Chromatography Research International*, 2012,1-8.
- [42] Zbakh, H., & El Abbassi, A. (2012). Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 53-65.
- [43] Elharchli, E., Ghomari, O., Chokrafi, F., Chraibi, M., Khalil, F. (2015). Study of Physico-chemical and Microbiological Combined Treatment of Olive Oil Mill Wastewater. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6, 909-917.
- [44] Asses, N., Ayed, L., Bouallagui, H., Sayadi, S., & Hamdi, M. (2009). Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(4), 407-413.
- [45] Aissam, H., Penninckx, M. J., & Benlemlih, M. (2007). Reduction of phenolics content and COD in olive oil mill wastewaters by indigenous yeasts and fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1203-1208.
- [46] Aissam, H. (2003). *Etude de la biodégradation des effluents des huileries (Margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase*. (Thèse de Doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fes, Tunisie).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [47] Ntougias, S., Bourtzis, K., & Tsiamis, G. (2013). The microbiology of olive mill wastes. *BioMed Research International*, 2013, 1-16.
- [48] Fki, I., Allouche, N., & Sayadi, S. (2005). 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(2), 197-204.
- [49] Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthournhout, M., & Penninckx, M. J. (2003). Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and microbial technology*, 33(6), 802-809.
- [50] De Ursinos, J. F. R., & Padilla, R. B. (1992). Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain. *Grasas y aceites*, 43(2), 101-106.
- [51] Hamdi, M. (1991). *Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive*. (Thèse de Doctorat, Université de Provence).
- [52] Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S. R., Sermanni, G. G., & Cascio, B. L. (2003). 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), 959-966.
- [53] El Hajjouji, H., Fakharedine, N., Baddi, G. A., Winterton, P., Bailly, J. R., Revel, J. C., & Hafidi, M. (2007). Treatment of olive mill wastewater by aerobic biodegradation: an analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource technology*, 98(18), 3513-3520.
- [54] Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., & Aloui, F. (2000). Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*, 35(7), 725-735.
- [55] Zenjari, B., El Hajjouji, H., Baddi, G. A., Bailly, J. R., Revel, J. C., Nejmeddine, A., & Hafidi, M. (2006). Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater-straw mixtures. *Journal of Hazardous Materials*, 138(3), 433-437.
- [56] Sassi, A. B., Boularbah, A., Jaouad, A., Walker, G., & Boussaid, A. (2006). A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*, 41(1), 74-78.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [57] Kavvadias, V., Doula, M. K., Komnitsas, K., & Liakopoulou, N. (2010). Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *Journal of Hazardous Materials*, 182(1-3), 144-155.
- [58] Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). *Olive processing waste management: literature review and patent survey*. Waste Management Series. London: Elsevier second Ed. Elsevier, Amsterdam. P, 23-24, 237-240.
- [59] Justino, C. I., Pereira, R., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A., Panteleitchouk, T. S., & Duarte, A. C. (2012). Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology*, 21(2), 615-629.
- [60] Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P., Avramaki, C., & Angelakis, A. N. (2006). Olive mill wastewater management in river basins: a case study in Greece. *Agricultural Water Management*, 82(3), 354-370.
- [61] Mekki, A., Dhoub, A., & Sayadi, S. (2013). Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 2(1), 1-7.
- [62] Saadi, I., Laor, Y., Raviv, M., & Medina, S. (2007). Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. *Chemosphere*, 66(1), 75-83.
- [63] Chowdhury, A. K. M. M. B., Akrotos, C. S., Vayenas, D. V., & Pavlou, S. (2013). Olive mill waste composting: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 108-119.
- [64] José, A., Lorite, M., Jiménez, J., & Castro, E. (2009). Valorisation of wastewater from two-phase olive oil extraction in fired clay brick production. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 271-278.
- [65] El-Abbassi, A., Saadaoui, N., Kiai, H., Raiti, J., & Hafidi, A. (2017). Potential applications of olive mill wastewater as biopesticide for crops protection. *Science of the Total Environment*, 576, 10-21.
- [66] Roig, A., Cayuela, M. L., & Sánchez-Monedero, M. A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26(9), 960-969.
- [67] Kahraman, S. İ. B. E. L., & Yeşilada, O. (2001). Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi. *Folia microbiologica*, 46(2), 133-136.
- [68] Francesco, G. L. (1993). Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae*, 47, 15-20.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [69] Knupp, G., Rücker, G., Ramos-Cormenzana, A., Hoyos, S. G., Neugebauer, M., & Ossenkop, T. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), 277-282.
- [70] Aguilera, M., Quesada, M. T., del Águila, V. G., Morillo, J. A., Rivadeneyra, M. A., Ramos-Cormenzana, A., & Monteoliva-Sánchez, M. (2008). Characterisation of *Paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. *Bioresource technology*, 99(13), 5640-5644.
- [71] Hamdi, M. (1993). Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olive : l'utilité de la microbiologie industrielle. *Olivae*, 46, 20-24.
- [72] Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- [73] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : Phytochimie des plantes médicinales*. Techniques et Documentation, 3eme Ed, Lavoisier, Paris. P, 227-228.
- [74] Nkhili, E. Z. (2009). *Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant*. (Thèse de Doctorat, Université d'avignon et des pays de vaucluse).
- [75] Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- [76] Korkina, L., De Luca, C., & Pastore, S. (2012). Plant polyphenols and human skin: friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259(1), 77-86.
- [77] Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *The phenolic composition of plants. An example of secondary metabolites of economic importance*. Ed. Polytechnic and university romandes presses, Lausanne, Italie. P, 192.
- [78] Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- [79] Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72(2), 145-171.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [80] Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications*, 9(1), 1-32.
- [81] Guillouty, A. (2016). *Plantes médicinales et antioxydants* (Thèse de Doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- [82] Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., & Manian, S. (2008). The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food chemistry*, 107(3), 1000-1007.
- [83] Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77(3), 147-161.
- [84] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- [85] Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 108-115.
- [86] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- [87] Sökmen, B. B., Aydın, S., & Kınalıoğlu, K. (2012). Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb.) Norman. *IUFS Journal of Biology*, 71(1), 43-51.
- [88] Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- [89] Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- [90] Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [91] Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G., & Węgrzyn, G. (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of Microbiology*, 184(5), 271-278.
- [92] De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., & Sacchi, R. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food chemistry*, 104(2), 858-867.
- [93] Amaral, C., Lucas, MS, Coutinho, J., Crespí, AL, do Rosário Anjos, M., & Pais, C. (2008). Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal. *Bioresource Technology*, 99 (15), 7215-7223.
- [94] Kalogerakis, N., Politi, M., Foteinis, S., Chatzisyneon, E., & Mantzavinos, D. (2013). Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *Journal of Environmental Management*, 128, 749-758.
- [95] Araújo, M., Pimentel, F. B., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. (2015). Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 200-211.
- [96] Bedouhene, S., Moulti-Mati, F., Dang, P. M. C., & El-Benna, J. (2017). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced neutrophil degranulation and chemotaxis via AKT, p38, and ERK1/2 MAP-Kinase inhibition. *Inflammopharmacology*, 25(6), 673-680.
- [97] Leger, C. L., Carbonneau, M. A., Michel, F., Mas, E., Monnier, L., Cristol, J. P., & Descomps, B. (2005). A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. *European journal of clinical nutrition*, 59(5), 727-730.
- [98] Bassani, B., Rossi, T., De Stefano, D., Pizzichini, D., Corradino, P., Macrì, N., ... & Bruno, A. (2016). Potential chemopreventive activities of a polyphenol rich purified extract from olive mill wastewater on colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 27, 236-248.
- [99] Richard, N., Arnold, S., Hoeller, U., Kilpert, C., Wertz, K., & Schwager, J. (2011). Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta medica*, 77(17), 1890-1897.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [100] Visioli, F., Bellosta, S., & Galli, C. (1998). Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life sciences*, 62(6), 541-546.
- [101] Polzonetti, V., Egidi, D., Vita, A., Vincenzetti, S., & Natalini, P. (2004). Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food chemistry*, 88(1), 11-15.
- [102] Briante, R., La Cara, F., Tonziello, M. P., Febbraio, F., & Nucci, R. (2001). Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3198-3203.
- [103] Caporaso, N., Formisano, D., & Genovese, A. (2017). Use of phenolic compounds from olive mill wastewater as valuable ingredients for functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–54.
- [104] Abu-Lafi, S., Al-Natsheh, M. S., Yaghmoor, R., & Al-Rimawi, F. (2017). Enrichment of phenolic compounds from olive mill wastewater and in vitro evaluation of their antimicrobial activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative medicine*, 2017, 1–9.
- [105] Zghari, B., Benyoucef, F., & Boukir, A. (2018). Impact environnemental des margines sur les eaux d'oued oussefrou : caracterisation physico-chimique et evaluation par chromatographie gazeuse couplee a la spectrometrie de masse (CPG-SM) the environmental impact of olive mill wastewater in oussefrou. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 7(4):276-291.
- [106] Leouifoudi, I., Harnafi, H., & Ziad, A. (2015). Olive mill waste extracts polyphenols content, antioxidant, and antimicrobial activities. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2015, 1–11.
- [107] Leouifoudi, I., Ziad, A., Amechrouq, A., Oukerrou, M. A., Mouse, H. A., & Mbarki, M. (2014). Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater. *Food Science and Technology*, 34(2), 249-257.
- [108] Giuffrè, A. M., Sicari, V., Piscopo, A., & Louadj, L. (2012). Antioxidant activity of olive oil mill wastewater obtained from different thermal treatments. *Grasas y aceites*, 63(2), 209-213.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [109] Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Lorquin, J., Delattre, M., ... & Labat, M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75(4), 501-507.
- [110] Dais, P., & Hatzakis, E. (2013). Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: a critical review. *Analytica Chimica Acta*, 765, 1-27.
- [111] Visioli, F., Poli, A., & Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews*, 22(1), 65-75.
- [112] Allouche, N., Fki, I., & Sayadi, S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 267-273.
- [113] Bianco, A., Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F., Jasionowska, R., & Margherita, P. (2003). Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I. *Journal of Separation Science*, 26(5), 409-416.
- [114] Scalfi, L., Fogliano, V., Pentangelo, A., Graziani, G., Giordano, I., & Ritieni, A. (2000). Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of Corbarini small tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1363-1366.
- [115] Mesbah, M. (2018). *Synthèse Caractérisation et Application Biologique de Nouveaux Ligands Bases de Schiff et Leurs Complexes métalliques* (Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie).
- [116] Tafesh, A., Najami, N., Jadoun, J., Halahlih, F., Riepl, H., et Azaizeh, H. (2011). Effets antibactériens synergiques des composés polyphénoliques des eaux usées des moulins à huile. *Médecine complémentaire et alternative factuelle*, 2011, 1-9.