

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ KASDI MERBAH OUARGLA



Mémoire
MASTER ACADEMIQUE
Domaine: Science de la Nature et de la Vie
Filière: Sciences Biologiques
Spécialité: Biochimie appliquée

Présenté par :
Mme. BOUABIDA NORA

Thème

**Etudes des propriétés biologiques des composés phénoliques
issus de sous-produits oléicoles**

Soutenu publiquement le : 09/2020

Devant le jury:

Président	BOUAL Zakaria	Pr.	U.Ouargla
Encadreur	OULD EL HADJ Mohamed Didi	Pr.	U. Ouargla
Co-Encadreur	M ^{elle} HADRI Nassima	Doctorante	U. Ouargla
Examineur	BENAOUN Fatima	Docteur	U.Ouargla

Année Universitaire 2019/2020

Remerciements

Au terme de ce mémoire nous tenons à nous exprimer avant tout à l'égard de l'omniscient, notre Dieu, clément miséricordieux, de notre sincère et profonde gratitude, pour nous avoir donné les facultés nécessaires, la précieuse énergie du savoir, un souci d'endurance, pour entamer, compléter et mener à bien ce modeste travail, mémoire de fin d'étude

Je tien à remercie Monsieur OULD HEDJ Mohamed Didi qui je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie durant la réalisation de ce travail et m'avoir permis de le mener dans de bonnes conditions ce mémoire.

Ainsi M^{elle} Hadri Nassima notre Co- encadreuse qui m'a orientée et encourager pour la réalisation de ce travail.

Pour tous les membres de jurys pour leur éventuel jugement appréciable à ce travail, nous leur disons merci pour tout éristique:

Mr BOUAL Zakaria., pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury.

Mme BENAOUN Fatima., pour l'honneur que nous nous faites en acceptant d'examiner le travail.

A tout ce qui nous ont aides de prêts de loin notre profonde reconnaissance.

Dédicace

Pour que cette merveilleuse journée soit la plus belle de ma vie, je cris à haute voix à Dieu de m'avoir guidé à atteindre ce but.

Pour l'étoile et lumière de l'islam Mohamed sala Allah ailaihi Wassalam

Au terme de ce mémoire je tiens à exprimer mes remerciements et ma profond gratitude :

A ce rayon lumière qui était mon père, plaise à Dieu qu'il le bénisse et l'accepte dans son paradis et j'aurai aime que tu sois près de moi ce jour pour lire sur ton visage la fierté et le bonheur de notre sucée

A celle qui ma donnée la vie, a cette précieuse émeraude du fonds des océans, ma mère.

A ma sœur Radja la princesse et la bougie djozal.

A mon mari pour ses encouragements, son dévouement, et son appui à toutes mes entreprises.

A mon frère Chouaib le cœur de lion

A mes filles Amira Rawnak, Nibrasse, Roudaina, Ranssi

Pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

Nora

Liste des abréviations

<i>Abréviations</i>	<i>Signification</i>
<i>DCO</i>	Demande chimique en oxygène
<i>DBO</i>	Demande biologique en oxygène
<i>PT</i>	Phénols totaux
<i>TC</i>	Tanins condensés
<i>cp</i>	Composés phénoliques
<i>Uv</i>	Ultra violet
<i>EOR</i>	Espèces réactives de l'oxygène
<i>DPPH</i>	1,1-diphényl -2-picryl-hydrazyl
<i>CPG</i>	Chromatographie en phase gazeuse
<i>CMT</i>	concentration minimale inhibitrice
<i>MS</i>	Matière sèche
<i>MM</i>	Matière minérale
<i>MO</i>	Matière organique

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Bilan annuel des produits et sous-produits de l'industrie oléicole en Algérie (Khodja, 2011)	5
2	Processus d'extraction de l'huile d'olive	8
3	Le tyrosol(4-hydroxyphenylethanol) (De marco et al., 2007)	18
4	L'hydroxytyrosol(3,4- dihydroxyphenylethanol) (De marco et al., 2007)	18
5	Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002)	23
6	Piégeage des EOR par les flavonoïdes.	23
7	Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des margines (De marco et al., 2007)	33
8	Etapas de dosage des polyphénols selon (Singleton et Rossi , 1965)	36
9	Structure de DPPH· (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH.	37

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Les principales classes des composés phénoliques (Harborne, 1989; Macheix et al., 2006 ; Crozier et al., 2006)	15
2	Les principaux composés phénoliques des margines	16
3	Les acides phénoliques et leur structure présent dans les margines (Borja et, 1995)	17
4	Les principaux composés phénoliques polymériques retrouvés dans les margines	19
5	Les composés phénoliques des margines et leurs activités biologiques	20
6	Méthodes les plus couramment utilisées pour estimer le pouvoir antioxydant.	24
7	L'effet antimicrobien des extraits phénoliques des produits et sous-produits de l'olivier (feuilles, olives, huile d'olive, saumure d'olives et grignons d'olives).	25
8	Activité antimicrobienne des margines brutes et leurs extraits phénoliques	27
9	Tableau regroupant l'appareillage utilisé lors de l'expérimentation	30

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Chapitre I -. Les sous produits oléicoles

I.- L'industrie oléicole et les sous-produits de l'olivier.....	5
I.1.- Huile d'olive	5
I.2.- Grignons d'olives.....	6
I.3.- Les margines	6
I.3.1.- Origine des margines	6
I.3.1.1.- Les procédés d'extraction d'huile d'olive.....	6
1.3.1.1.2.- Procédés continus ou systèmes à centrifugation	7
I.3.1.2.- Les principaux produits du processus d'extraction de l'huile d'olive	9
I.4.- Caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines	9
I.4.1.- Caractéristiques physico-chimiques.....	9
I.4.2.- Caractéristiques microbiologiques.....	10
I.5.- Impact des effluents d'huileries d'olive sur l'environnement	10
I.5.1.- Impact sur les eaux.....	11
I.5.2.- Impact sur les sols.....	11
I.5.3.- Impact sur les plantes :.....	12
I.6.- Valorisation des margines.....	12

Chapitre II.- Les composés phénoliques

II.- Les métabolites secondaires	14
II.1.-Définition.....	14
II.2.-Classification des métabolites secondaires	14
II.3.-Les composées phénoliques.....	14
II.3.1.-Les composées phénoliques des margines.....	14
II.3.1.1.-Classification des structures phénoliques	14
II.3.2.-monomères aromatiques	15
II.3.3.-Les polymères phénolique	18

II.4.- Biosynthèse des composés phénoliques	19
II.4.1.- La voie de Shikimate	19
II.4.2.-La voie de l'acide malonique.....	19
II.5.- Activites biologiques des composes phenoliques.....	20
II.6.- Valorisation des composes phenoliques des margine.....	20
II.6.1.- En agro-alimentaire	21
II.6.2.- En cosmétologie.....	21
II.6.3.-En phytothérapie :.....	21
III.- Les anti-oxydant.....	22
III.1.-Mecanismes d'action d'un anti-oxydant	22
III.2.- Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant	23
IV.- Effet antimicrobien des margines	24

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

I.1.-Matériel.....	30
I.1.1.-Appareillage	30
I.1.2.-Echantillon	30
I.2.- Méthodes.....	30
I.2.1.-Analyses physico-chimiques.....	30
I.2.1.1. - MESURE DU PH	31
I.2.1.2. - Matière sèche (MS) et d'humidité :	31
I.2.1.3.- Matières minérale (MM) et organique (MO).....	31
I.2.1.4.-Conductivité électrique	31
I.2.2.-Extraction des composés phénoliques	31
I.2.3.-Criblage phytochimique	34
I.2.3.1.-Les flavonoïdes	34
I.2.3.2.- Tanins.....	34
I.2.3.3.- Test des phénols.....	34
I.2.4.- Dosage des composés phénoliques par colorimétrie.....	34
II .1.-Etude de l'activité anti-oxydante	37
II.1.1.- Capacité de piégeage d'espèces radicalaires	37
III .- Evaluation de l'activité antibactérienne	39
III .1.- Évaluation de l'activité antibactérienne	39
III .1.1.- Tests antibactériens	39
III .2.- Méthode de diffusion en milieu gélosé	40

III .2 .1.-Test de sensibilité aux extraits bruts, et aux composés phénoliques.....	40
Conclusion.....	42
Références bibliographiques.....	45

Introduction

Introduction

Le patrimoine oléicole mondial compte actuellement environ 750 millions d'oliviers cultivés sur une superficie de 9,23 millions d'hectares. Les pays méditerranéens comptent 715 millions d'oliviers sur une superficie d'environ 8.16 millions d'hectares, soit 95% du patrimoine oléicole mondial. L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est le plus favorable à la culture de l'olivier. Elle se place après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs d'huile d'olive (**Bensemmane, 2009**).

32 millions d'oliviers est estimé dans le patrimoine oléicole algérien, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. La production annuelle en huile a atteint 35.000 Tonnes et celle de l'olive de table 80.000 tonnes (**Digio et al., 1988**).

L'industrie oléicole, en plus de sa production indispensable qui est l'huile (huile d'olive vierge et huile de grignons), laisse deux pertes l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons). De plus, l'olivier engendre des feuilles, des brindilles et du gros bois. Les margines, sous-produit obtenu par centrifugation ou sédimentation de l'huile après le pressage de l'olive, sont caractérisées par une concentration élevée en sucres, lipides, protéines et surtout en composés phénoliques. Une fois rejetées sans avoir subi des traitements préparatoires, ces margines posséderont des méfaits sur l'environnement dû à leur pouvoir d'inhiber le développement des plantes et de certains microorganismes. Leur phytotoxicité est principalement attribuée à l'existence des lipides et des poly phénols (**Rumpler et al., 1986**).

Dans notre pays, ces margines sont habituellement rejetées en l'état ou déversées dans des puits individuels pouvant directement se mélanger aux eaux pluviales, aux eaux usées et inonder les fermes environnantes et/ou indirectement drainées pour finir dans la mer. Il faut également noter que 100 kg d'olives écrasées donnent 40 litres de margines et qu'un seul mètre cube de marge est équivalent aux déchets domestiques de 1000 habitants. Ainsi, le traitement de ces margines avant leur rejet s'avère indispensable afin de préserver les nappes phréatiques et limiter les dégâts sur l'environnement (**Rumpler et al., 1986**).

Les poly phénols de margine ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leurs propriétés biologiques (**Lopez-Miranda, 2010 ; Ghanbari *et al.*, 2012**).. Ils sont doués de diverses activités anti oxydantes, antivirales, anti-inflammatoires, antiallergiques et antimicrobiennes (**D'angelo *et al.*, 2005; Visioli *et al.*, 2005; Brenes *et al.*, 2007**). Ces propriétés ont orienté les chercheurs, vers l'extraction et la propriété de ces polyphénols dans divers domaines (agriculture, pharmacologie, agro-alimentaire) (**Paredes *et al.*, 2000; Bouaziz *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009**).

Face a ce constat le présent travail vise à rechercher, identifier et quantifier la fraction phénolique des margines et à déterminer leur éventuelles propriétés antioxydant et antibactérienne.

Le travail se subdivise en deux parties :

- La première partie portant sur les sous produit oléicole notamment les margines, ces caractéristiques et leur origine, les polyphenols présents dans le margine et leur activité antioxydant, antimicrobienne.
- La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisées pour effectuer les différents tests.

CHAPITRE I .-

Sous produits oléicoles

I.- Industrie oléicole et sous-produits de l'olivier

L'industrie oléicole, en plus de la production d'huile d'olive procède deux types de sous -produits, l'un liquide, représenté par des eaux de végétation ou margines et l'autre solide représenté par les noyaux d'olives ou grignons. En outre, l'olivier, à travers la taille génère des feuilles, des brindilles et du gros bois (**Nefzaoui, 1991**).

Les olives comportent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% de margines (**Digiovacchino et al., 1989**). Ces dernières résultent de l'eau contenue dans le fruit (olives) et l'eau de fabrication ajoutée au cours du processus de trituration (**achak et al., 2009**) .

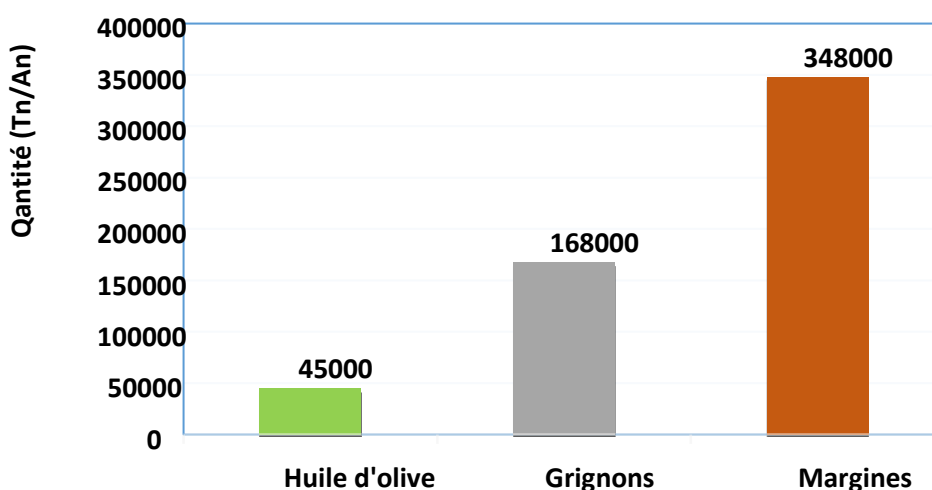


Figure 01.- Bilan annuel des produits et sous-produits de l'industrie oléicole en Algérie
(**Khodja, 2011**)

I.1.- Huile d'olive

On signale par l'huile d'olive pur toute huile extraite du fruit de l'olivier (*Olea europaea L.*) exclusivement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques et dans des conditions, particulièrement thermiques, n'entraînant pas d'altération de l'huile, à l'exception des huiles obtenues par solvant ou par des procédés de ré-estérification et de tout mélange avec des huiles d'autre nature. L'huile d'olive vierge ne doit avoir subi aucun autre traitement que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration (**COI, 2003**).

L'huile d'olive vierge comprend diverses désignations : vierge extra, ou vierge fine, vierge courante et vierge lampante (**Perrin, 1992**). L'appartenance à une catégorie est définie en fonction de l'évaluation de quelques paramètres de qualité de l'huile d'olive à savoir :

l'acidité, l'indice de peroxyde, l'absorbance dans l'UV et les caractéristiques organoleptiques **(Fedeli, 1999)**.

L'intérêt pour l'huile d'olive a été accru depuis la découverte de sa richesse en vitamines liposolubles et en polyphénols qui sont des antioxydants. Elle constitue également une source importante d'acides gras polyinsaturés essentiels car non synthétisables par le corps humain **(Veillet, 2010)**.

I.2.- Grignons d'olives

Les grignons sont les résidus solides formés de la pulpe et des noyaux d'olives, elles représentent environ un tiers du poids des olives fraîches triturées. Les grignons peuvent être transformés en un produit destiné à l'alimentation animale, engrais et la fabrication de savon, ou subir une extraction chimique afin de produire de l'huile de grignons d'olive **(Labdaoui, 2017)**.

I.3.- Margines

Les margines sont des eaux de végétation qui sont générées lors de l'extraction de l'huile d'olive vierge. Ce sont des effluents riches en matière organique (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines...) Et en sels minéraux (potassium, sodium, magnésium...). Ces margines sont souvent épandues de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou stockées dans les cuvettes, exposant ainsi les systèmes eau sol- plant à une pollution inéluctable **(Nefzaoui , 1987)**.

I.3.1.- Origine des margines

I.3.1.1.- Procédés d'extraction d'huile d'olive

Avec le développement du secteur oléicole, les systèmes traditionnels ont été transformés par des équipements modernes. Le rétablissement des procédés a permis d'extraire l'huile en continue à travers des phases successives alors qu'au paravent les processus étaient réalisés de manière discontinue (lavage des olives, broyage mécanique, malaxage, extractions des moûts huileux). De même, après le développement des instruments de centrifugation, la séparation de l'huile des eaux de végétation est devenue moins onéreuse **(Tsagariki e et al., 2007)** figure 02.

1.3.1.1.1.- Procédés discontinus ou systèmes à presses

Les systèmes à presses sont des systèmes classiques. Ils débutent par un broyage des olives suivi du malaxage et du pressage. Le sous -produit de cette opération est le grignon brut et un moût fait d'effluents d'huileries d'olive et d'huile. La séparation des deux phases se fait par purification. Les effluents d'huileries d'olive sont généralement rejetés dans le milieu naturel sans aucun traitement. Par contre les grignons sont utilisés par certaines huileries industrielles pour produire l'huile de grignon par une extraction au solvant ou comme combustible dans des chaudières industrielles, des fours et des bains publics **(Yaakoubi, 2009)**.

1.3.1.1.2.- Procédés continus ou systèmes à centrifugation**a.- Procédé continu à trois phases**

L'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec de l'eau chaude et malaxées pour former la pâte d'olive qui est ensuite diluée. Les phases liquides et solides sont séparées par centrifugation donnant les grignons et le moût. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des effluents d'huileries d'olive **(Cossu, 1993)** .

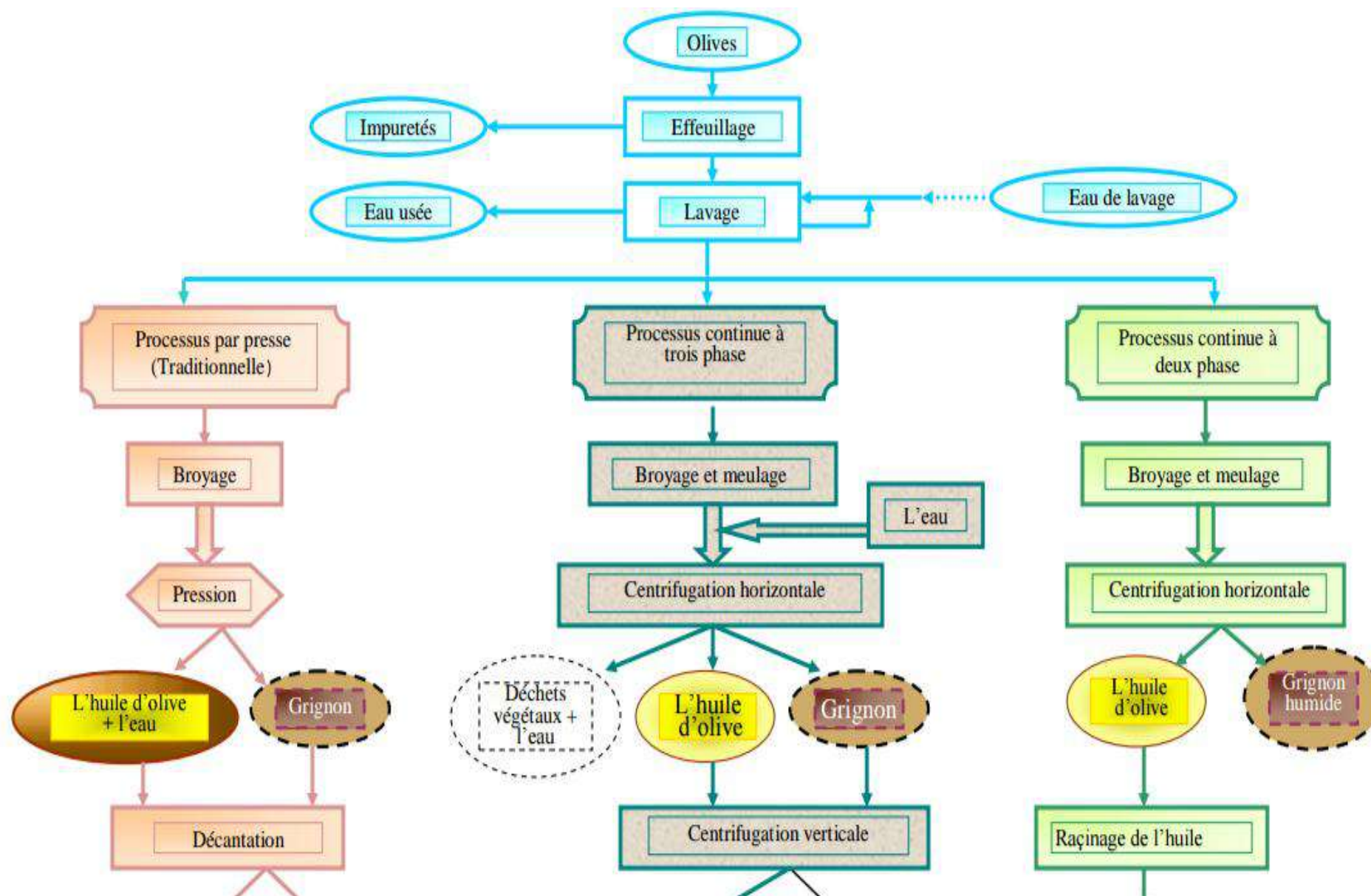


Figure 02.- Processus d'extraction de l'huile d'olive

b.- Procédé continu à deux phases ou procédé écologique

Variante du système précédant, ici le décanteur sépare l'huile et mélange le grignon et les eaux de végétation en une unique phase de consistance pâteuse appelée grignon humide ou grignon à deux phases. Ce système permet d'extraire une huile d'olive de bonne qualité sans production d'effluents d'huileries d'olive. Son seul inconvénient est la production de grignons humides. En effet, les grignons résultant de ce procédé contiennent 8 à 10% plus d'eau que ceux du procédé à trois phases. Il est donc indispensable d'équiper les huileries travaillant selon le procédé écologique d'une installation de séchage des grignons. Ce système écologique a été introduit en Espagne en 1992, en 1995 environ 50% des olives destinées à la production d'huile étaient triturées par ce procédé. Actuellement le gouvernement espagnol ne subventionne que les huileries qui installent le procédé écologique. Ce procédé est également utilisé au Portugal, en Italie, en France et en Grèce (**Balice et al., 1990**).

I.3.1.2.- Principaux produits du processus d'extraction de l'huile d'olive

Le processus de broyage des olives produit principalement l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon (huile secondaire extraite par des solvants organiques) et engendre deux déchets l'un liquide, les margines et l'autre solide, les grignons. Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation (**Dryne, 1999**).

Les margines sont composées de 40 à 50% de l'eau végétal qui provient du fruit (olive) et le reste de l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration (**Cossu et al., 1993**).

I.4.- Caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines**I.4.1.- Caractéristiques physico-chimiques**

Les margines présentent une composition plus au moins variable. Elle appartient de la qualité des olives, de leur degré de maturité, du système d'extraction et de la qualité d'eau rajoutée lors de la phase d'extraction d'huile. Les effluents sont généralement constitués de : 83.2% d'eau, 15% de substances organiques et de 1.8% de substances minérales (**Balice et Cera, 1984**) ces effluents se présentent comme un liquide aqueux, de couleur brun-rougeâtre à noir. Ils ont un pH acide (4.2 à 5.9) et une salinité élevée exprimée en conductivité électrique (18 à 50mS/cm) (**C.O.T, 1993; Evi-minzi et al., 1992**) due surtout aux ions potassium, chlorure, calcium et magnésium. Les effluents d'huileries d'olive ont un pouvoir

polluant très important avec une demande biologique en oxygène (DBO) de 100 g/L et une demande chimique en oxygène (DCO) de 200g/L (**Balice et al., 1990**) Ces valeurs sont 200 à 400fois supérieures à celles des eaux municipales (**Cossu et al., 1993**) La matière organique des effluents d'huileries d'olive est constituée par des polysaccharides (13-53%), des protéines (8- 16%), des polyphénols (2-15%), des lipides (1-14%), des polyalcools (3-10%) et des acides organiques (3-10%) (**Balice et Cera, 1984**) Cette composition dérive de la dégradation des tissus de l'olive au cours de la trituration et de l'extraction de l'huile (**Cossu et al., 1993**).

I.4.2.- Caractéristiques microbiologiques

Les études microbiologiques effectuées sur plusieurs échantillons de margines ont confirmé l'absence totale de micro-organismes pathogènes. Donc, ces effluents ne donne aucun problème hygiénico-sanitaire (**Ranali, 1991**) Des analyses microbiologiques ont présenté que les levures et les champignons sont capables de s'y développer mieux que les bactéries (**El hajouji, 2007**) Ces micro-organismes supportent la salinité élevée et le pH acide caractéristiques de ces effluents, et résistent plus que les bactéries aux substances phénoliques. Parmi les levures, on découvre *Trichosporium cutaneum*, *Cryptococcus albidus* ainsi que les genres *Rhodotorula sp.*, *Candida sp.* et *Saccharomyces sp.* (**Mouncif et al., 1993; Elhajjouja, 2007**). La flore fongique se compose essentiellement d' *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium negricans*, et *Alternaria sp.* La flore bactérienne regroupe les bactéries qui résistent aux polyphénols particulièrement les bactéries à Gram-négatif. Le genre *Pseudomonas sp.* ainsi que *Bacillus megaterium* ont été décrits.

Une étude microbiologique menée par (**Mouncif et al., 1993**) sur les margines Marocaines a noté la présence des levures et des champignons (*Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Geotrichum candidum*). La caractérisation microbiologique des margines de 4 stations d'évaporation en Espagne a révélé l'existence d'un nombre variable de bactéries, de levures et de champignons (**Millanu et al., 2000**).

I.5.- Impact des effluents d'huileries d'olive sur l'environnement

Le rejet des margines est un problème majeur dans les pays du bassin méditerranéen. Ces eaux fortement polluées causent de sérieux dégâts environnementaux. L'absence de méthodes de traitements adaptées pousse les propriétaires de moulins à huile à rejeter ces eaux dans la nature sans aucun contrôle ou à surcharger le réseau d'égouts avec des substances

toxiques. La concentration et la charge en matières organiques ne peut qu'entraîner un disfonctionnement des stations d'épuration **(Elhajjouji, 2007)**

I.5.1.- Impact sur les eaux

Les margines sont peu dégradables à cause des substances phytotoxiques et antimicrobiennes (phénols, acides gras, etc.) qu'ils contiennent. Souvent rejetés dans des récepteurs naturels sans aucun traitement préalable, les margines nuisent fortement à la qualité des eaux de surfaces. La coloration des eaux naturelles due aux tannins est l'un des effets les plus visibles de la pollution. La très forte charge en DCO et surtout en DBO empêche les eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances **(Mebirouk , 2002)** Les polyphénols contenus dans les margines, rejetés dans les cours d'eau de faible débit où l'échange de l'air est limité, exercent une action antagoniste sur la flore et la faune aquatique en causant souvent leur mort. , ce qui finit par rendre le milieu totalement anoxique et provoquant ainsi la mort de tous les êtres vivants par asphyxie **(Ranali, 1991)**, L'épandage des margines sur les sols peut également poser des problèmes environnementaux. Les eaux souterraines peuvent être polluées, ce qui affecte la qualité de l'eau potable **(Fkii et al., 2005)** Aussi, l'épandage des margines, très riches en éléments azotés, peut causer une pollution par les nitrates des nappes situées dans la zone ou à proximité de la zone d'épandage et souiller la qualité de l'eau potable **(Benyahya et Zein, 2003)** ; or dans le bassin méditerranéen, les ressources en eau sont rares et leur préservation, tant quantitativement que qualitativement est capitale. Les lipides présents dans les margines peuvent avoir aussi un impact négatif sur les eaux. Ils forment un film impénétrable à la surface des rivières et ses bords empêchant ainsi la pénétration de la lumière et de l'oxygène **(Nassif, 2002)**.

I.5.2.- Impact sur les sols

L'épandage direct des margines sur les sols provoque un colmatage des sols et une diminution de leur qualité. Ces déchets sont à l'origine de l'augmentation de la salinité des sols **(Fiestas, 1981)**et de la diminution du pH, qui pourrait être à l'origine du changement des caractéristiques physico-chimiques. De même, les substances toxiques contenues dans ces margines se fixent dans les sols. Certaines de ces substances telles que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne et détruire la microflore du sol **(Marisot et Tournier, 1986)**.

I.5.3.- Impact sur les plantes

Les composés phénoliques sont les responsables majeurs de la phytotoxicité des margines. L'application directe des margines bruts diminue les rendements en matière sèche des tomates et du soja (**Sumperdo et al., 2004**) et inhibe la germination de quelques graines comme le pin, la tomate et l'atriplex (**Dellagrecia m et al., 2001 ; Muscolo et al., 2001**). Les résidus de pesticides présents dans les effluents d'huileries d'olive peuvent également être nocifs pour les plantes. Par conséquent, l'utilisation agronomique par épandage direct des déchets d'huileries d'olive a de mauvaises répercussions sur les eaux, les sols, les microorganismes et les plantes. D'où la nécessité de traiter ces effluents afin de palier aux problèmes environnementaux qu'ils engendrent. Dans ce sens, plusieurs travaux ont été effectués pour remédier à ce problème (**Elhajjouji, 2007**).

I.6.- Valorisation des margines

Les margines peuvent faire l'objet de plusieurs types de valorisation. On peut citer :

- Transformation des substances organiques des margines en biogaz (80% des substances organiques se transforment en biogaz pour donner 65-70% de méthane) par une série de réactions biochimiques effectuées par deux types de bactéries acidogènes et méthanogènes (**Loulan et Thelier , 1987**)
- Récupération des composés phénoliques qui peuvent être utilisées en industries pharmaceutique et cosmétique (**Knupp et al., 1996**)
- Production de protéines unicellulaires : ce procédé ne manque pas d'intérêt car il se traduit par une diminution de la DBO (60 à 70%) et l'obtention de 13 kg de levure par mètre cube de margine. En plus, les cellules de levure absorbent le colorant brun des margines qui empêche l'épuration parfaite des eaux polluées. Utilisation des margines comme substrat pour la culture de levures de types Candida (**El alami, 2000**).
- Les margines peuvent être utilisées pour obtenir un compost fertilisant pour les sols(**Tomati et galli , 1992**) L'avantage du compost formé à partir des margines est l'absence des microorganismes pathogènes avec des concentrations élevées en phosphore et en potassium (**Galli e et al., 1994**).

Chapitre II.- composées phénoliques

II.- Métabolites secondaires

II.1.- Définition

Les métabolites secondaires sont repartis en plusieurs grandes familles chimiques : les composés phénoliques, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les saponines (**Mamadou, 2011**). Les composés produits par les plantes sont séparés en métabolites primaires et secondaires. Les métabolites secondaires ont une répartition limitée. Elles sont typiquement produites dans un organe, tissu ou type cellulaire spécifique à des stades particuliers du développement, en faible quantité et sont emmagasinés surtout dans les vacuoles (**Raven et al., 2003**).

II.2.-Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont repartis en plusieurs grandes familles chimiques : les composés phénoliques, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les saponines (**Mamadou, 2011**).

II.3.-Les composées phénoliques

II.3.1.-Les composées phénoliques des margines

Les composés phénoliques des margines sont très variés et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines (**Ranalli, 1999**).

II.3.1.1.-Classification des structures phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de classes (**Harborne, 1990 ; Mancheix et al., 2006**) (tableau 1) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) (**Mancheix et al., 2006**). Ces espèces sont des monomères, des

polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre **9000 (Harbone, 1990 ; Crozier *et al.*, 2006).**

Tableau 1.- Principales classes des composés phénoliques (Harbone, 1989 ; Macheix *et al.*, 2006 ; Crozier *et al.*, 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acide caféïque, Acide férulique Scopolétine	Pomme de terre, pomme Citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides □ Flavonols □ Anthocyanes □ Flavanols □ Flavanones Isoflavonoides	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C ₆ -C ₂) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C ₁₅)	Tannins		Raisin rouge, kaki

II.3.2.-monomères aromatiques

Plusieurs monomères aromatiques ont été identifiés dans les margines par des techniques de chromatographie (HPLC ou CPG). Ils sont représentés essentiellement par des alcools et des acides phénoliques. Le tableau 2 récapitule les composés phénoliques détectés dans les margines

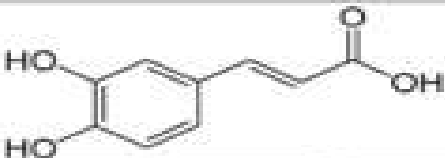
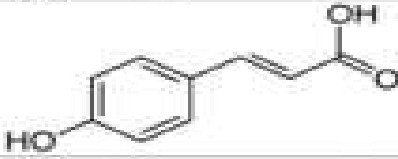
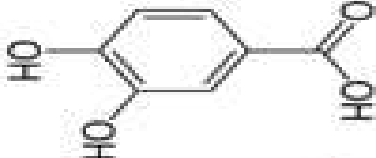
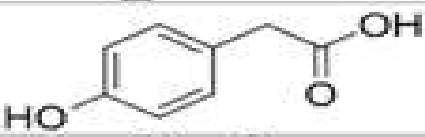
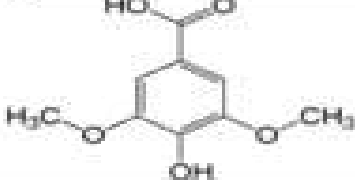
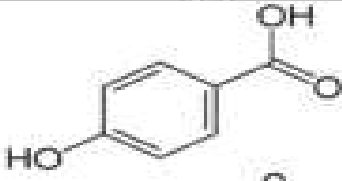
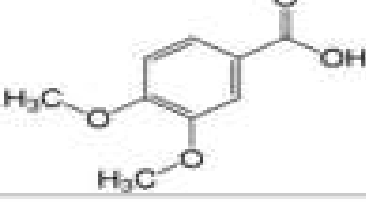
Tableau 2.- Principaux composés phénoliques des margines.

Composés phénoliques	Références
Acide cafféique	(VAZEQUEZ, 1978 ; BORJA <i>et al</i> , 1995 ; D'ANNIBALE <i>et al</i> , 2004 ; EL HAJJOUJI <i>et al</i> ., 2007).
Acide <i>p</i> -coumarique	(VAZEQUEZ, 1978 ; BORJA <i>et al</i> , 1995 ; D'ANNIBALE <i>et al</i> , 2004 ; EL HAJJOUJI <i>et al</i> , 2007).
Oleuropéine	(EL HAJJOUJI <i>et al</i> , 2007).
Hydroxytyrosol	(FKI <i>et al</i> , 2005 ; ERGÜ <i>et al</i> , 2009).
Tyrosol	(FKI <i>et al</i> , 2005 ; ERGÜ <i>et al</i> , 2009).
Acide vanillique	(VAZEQUEZ <i>et al</i> , 1974 ; BALICE et CERA, 1984 ; BORJA <i>et al</i> , 1995 ; AZABOU <i>et al</i> , 2007).
Acide ferrulique	(D'ANNIBALE <i>et al</i> , 2004 ; FKI <i>et al</i> , 2005)
Acide protocatéchique	(VAZEQUEZ, 1978 ; BORJA <i>et al</i> ., 1995)
Acide 4-hydroxyphénylacétique.	CICHELLI et SOLINAS, 1984 ; BORJA <i>et al</i> , 1995).
Acide syringique	(CICHELLI et SOLINAS, 1984 ; BORJA <i>et al</i> ., 1995).
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	(CICHELLI et SOLINAS, 1984 ; BORJA <i>et al</i> , 1995).
Acide vératrique	BALICE et CERA, 1984 ; MARTINEZ <i>et al</i> , 1992).
Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique	(BORJA <i>et al</i> , 1995).
Acide férulique	(DERMECHE <i>et al</i> , 2013).
Acide gallique	(DERMECHE <i>et al</i> , 2013).
Verbascoside	(DERMECHE <i>et al</i> , 2013).
Lutéoline	(FKI <i>et al</i> , 2005 ; DERMECHE <i>et al</i> , 2013).
Rutine	(FKI <i>et al</i> , 2005 ; DERMECHE <i>et al</i> , 2013).
Lutéoline 7-O-glucoside	(DERMECHE <i>et al</i> , 2013).
Lutéoline 7-O-rutinoside	(DERMECHE <i>et al</i> , 2013).
Lutéoline 4-O-glucoside	(DERMECHE <i>et al</i> , 2013).

a. Acides phénolique

Ce sont les monomères les plus abondants dans les margines. Ils sont représentés dans le tableau 3 (Borja *et al.*, 1995).

Tableau 3.- Acides phénoliques et leur structure présent dans les margines (Borja *et*, 1995)

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

b.- Alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Les principaux alcools phénoliques rencontrés dans les margines sont fig : 03et 04 (**De Marco Elena et al., 2007**) :

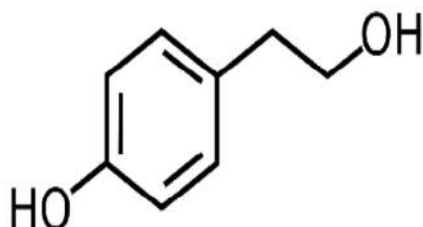


Figure 03.- Le tyrosol(4-hydroxyphenylethanol) (**De marco elena et al., 2007**)

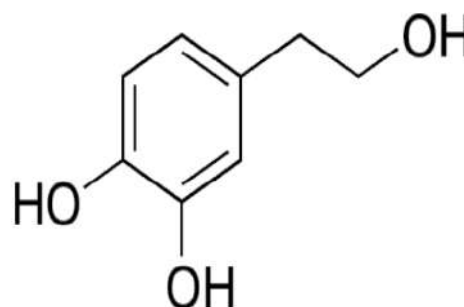


Figure 04.- L'hydroxytyrosol(3,4-dihydroxyphenylethanol) (**De marco elena et al., 2007; et al., 2007**)

La variabilité des margines influence considérablement leur contenu qualitatif et quantitatif en composés phénoliques. Toutefois, ceux-ci restent la fraction dominante de la matière organique. L'analyse qualitative des composés phénoliques par les techniques de chromatographie reste très délicate. Ceci est dû à la polymérisation des monomères phénoliques en polyphénols, et au chevauchement de certains pics dans le chromatogramme des molécules ayant des poids moléculaires et des structures très proches.

II.3.3.-Les polymères phénolique

Les composés phénoliques à haut poids moléculaire identifiés dans les margines sont particulièrement les tannins : leur structure est très complexe, leur concentration peut atteindre 12 g/L (**Balice et al., 1982**). Le catécholmélaninique est un flavotanin, il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines (**Aissam, 2003 ; Zbakh et El abbassi, 2012**). Il est formé par la polymérisation de la catéchine à différents degrés. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3 000. En ce qui concerne la lignine, aucun auteur n'a cité la présence de ce polymère dans les margines, bien que les pulpes d'olives contiennent au moins 3% de composés cellulosiques (**Aissam, 2003**).

Tableau 4.- Principaux composés phénoliques polymériques retrouvés dans les margines

Composés phénoliques à haut poids moléculaires principalement les tanins	
Tanins hydrolysables	Tanins condensés (flavotanin)
- Esters d'acides phénoliques	Le catécholmélaninique
- Esters d'acides phénoliques et sucres	
- Glucosides	

La composition chimique des margines est assez variable. Cette variation est due essentiellement aux facteurs suivants (**Karapinar et Worgan, 1983 ; Bambalov *et al.*, 1989**): stade de maturation des olives, conditions édaphiques (les caractéristiques du sol) et climatiques, variété des oliviers, système de culture, situation géographique, temps de stockage des olives avant la trituration, techniques et lieu de stockage, nature de conservation des olives, procédé d'extraction d'huile d'olive qui représente l'élément le plus important (**Ramos-cormenzana, 1996 ; Annaki *et al.*, 1999 ; Fiorentino *et al.*, 2003 ; Achak *et al.*, 2009**).

II.4.- Biosynthèse des composés phénoliques

Du point de vue biosynthétique ,les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques: la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, flavonoïdes et lignines et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (**Machaeix *et al.*, 2006**).

II.4.1.- Voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (**Yao *et al.*, 1995**).

II.4.2.- Voie de l'acide malonique

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Fleegeer et Flipse, 1964**).

II.5.- Activités biologiques des composés phénoliques

Tableau 5.- Composés phénoliques des margines et leurs activités biologiques.

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

II.6.- Valorisation des composés phénoliques des margine

Il y a une exactitude croissante que les radicaux libres soient impliqués dans plusieurs maladies humaines, et jouent un rôle capital dans la dégradation oxydative des aliments et des produits cosmétiques. Par conséquent, l'extraction des composés phénoliques biologiquement actifs à partir des margines constitue une alternative viable pour valoriser cet effluent problématique (Obeid *et al.*, 2009)

En effet, la fraction phénolique possède des activités biologiques intéressantes, il a été montré aussi que l'absorption journalière des polyphénols peut dépasser 1g/jour. Ce qui veut dire qu'elle est supérieure à celle des autres classes de métabolites secondaires et des antioxydants alimentaires. Par exemple, elle est 10 fois supérieure à l'absorption de la vitamine C et 100 fois plus élevée à celle de la vitamine E et les caroténoïdes (**Visser et al., 2000**)

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

II.6.1.- En agro-alimentaire

Selon **Berset et Bondini, 2000**, les composés phénoliques agissent sur la qualité sensorielle des aliments, couleur, odeur et goût. Mais aussi sur leur conservation avec un rôle antibactérien et antioxydant (**Bers et Bondinil, 2000**)

II.6.2.- En cosmétologie

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

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

Le seul frein de l'utilisation des composés phénoliques en cosmétologie est leur forte réactivité à l'oxydation et leurs instabilités dans les formulations cosmétiques conduisant ainsi à la variation possible de l'odeur et de la couleur (**G hedira, 2005**)

II.6.3.- En phytothérapie

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

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

De nombreuses études se sont penchées sur l'analyse du mode d'action des polyphénols dans la prévention de ces pathologies, qui met en cause les propriétés réductrices des composés phénoliques (**G hedira,2005**)

III.- Anti-oxydants

III.1.- Mécanismes d'action d'un anti-oxydant

Les principaux mécanismes d'activité antioxydante (**Halliwell, 1994 ; bouzid et al., 2011**) sont :

- Le piégeage direct des EOR ;
- L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR;
- La protection des systèmes de défense antioxydants.

Les polyphénols peuvent agir selon ces divers mécanismes.

Les antioxydants sont ordonnés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation, sont considérés comme éliminateurs de radicaux libres (**Shahidi et al., 2003 ; Chew et al., 2009**)

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Grâce à leur faible potentiel redox, les polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes (Fl-OH), sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes (ROO), alkoxydes



Où X représente l'un des EOR mentionnés ci-dessus. Le radical aryloxyde (Fl-O[•]) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable.

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxydes, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (**Hodek et al., 2002**) (figure 06) ; soit par chélation des

métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres.

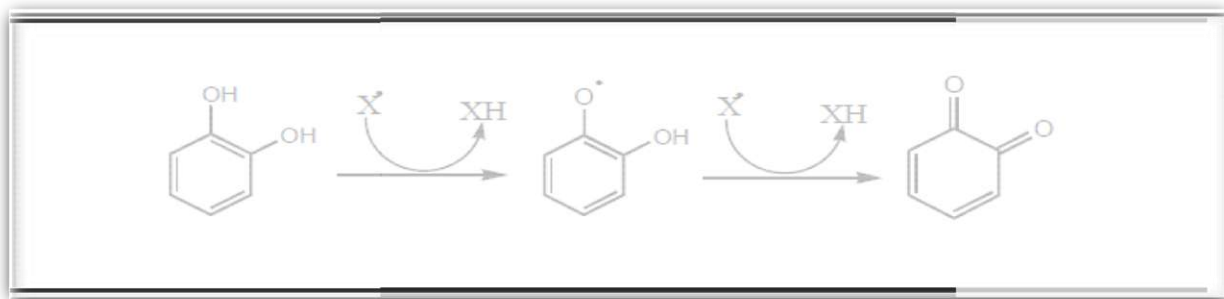


Figure 06.- Piégeage des EOR par les flavonoïdes

Les propriétés antioxydantes des polyphénols varient en fonction de leur structure chimique (**Rice-evans, 1996**). Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des polyphénols. Les polyphénols porteurs d'un groupement catéchol (un noyau aromatique porteur de deux fonctions hydroxyles adjacentes) ont un potentiel antioxydant élevé. Ainsi, tous les flavonoïdes portant une hydroxylation en 3' et 4' possèdent une activité antioxydante significative (**Aberouma et Deokule, 2008**). De plus, une hydroxylation supplémentaire en 5' comme sur la myricétine augmentera cette activité comparativement à des composés comme la quercétine qui en sont dépourvus (**Dziedzic et al., 1983**). L'hydroxylation du noyau B joue donc un rôle important dans l'activité antioxydante des flavonoïdes (**Shahidi et al., 2003**) tandis que l'hydroxylation en 5 et 7 sur le cycle A a peu d'influence.

III.2.- Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant

Les méthodes de l'évaluation du potentiel antioxydant sont nombreuses et variées. Le tableau 6 reprend les méthodes d'estimation de l'activité antioxydant.

Tableau 6.- Méthodes les plus couramment utilisées pour estimer le pouvoir antioxydant

Méthode	Réaction	Auteurs
Méthode FRAP(Ferric Reducing Antioxidant Power)	Réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux(Fe^{2+}). Évalue le pouvoir réducteur des composés. La lecture se fait à 700 nm.	Pulido et al, 2000 ; Hinneburg et al, 2006).
Méthode DPPH	Réduction du radical libre stable de 2,2-diphényl picrylhydrazyl (DPPH.). La lecture se fait à 517 nm.	Koleva et al, 2002).
Méthode ABTS	le sel de ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2, 2 - azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) perd un électron pour former un radical cation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) de couleur sombre en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation ABTS^+ , ce qui entraîne la décoloration de la solution. La lecture se fait à 734 nm.	Re et al, 1999
Méthode PPM (PhosPhoMolybdate)	L'hydrogène et l'électron sont transférés vers le complexe oxydant (PPM).	Popovici et al, 2009

IV.- Effet antimicrobien des margines

Les margines comprennent plusieurs composés phénoliques qui ont des propriétés phytotoxiques et antimicrobiennes (tableau 7) (**Ramos-cormenzana, 1996 ; Niaounakis et**

Halvadakis, 2004). L'effet inhibiteur des CP des margines a été montré contre la sporulation des bactéries telluriques ainsi que la croissance des bactéries Gram positives et Gram négatives (**Perez et al., 1992 ; Capasso et al., 1995 ; Larif et al, 2015 ; Leouifoudi et al., 2015 ; Roila et al., 2016).**

Tableau 7.- L'effet antimicrobien des extraits phénoliques des produits et sous-produits de l'olivier (feuilles, olives, huile d'olive, saumure d'olives et grignons d'olives)

	Microorganisme	Référence
Feuilles	Staphylococcus aureus	(Erdohan et Turhan, 2011)
	Pseudomonas aeruginosa	(Djenane <i>et al.</i> , 2011)
	Bacillus cereus Bacillus subtilis Escherichia coli Candida albicans Cryptococcus neoformans	(Pereira <i>et al.</i> , 2006)
	Klebsiella pneumoniae Salmonella enteritidis	(Korukluoglu <i>et al.</i> , 2008)
Olives	Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa	(Medjkouh <i>et al.</i> , 2016)
	Haemophilus influenzae Moraxella catarrhalis Salmonella typhi Vibrio parahaemolyticus Staphylococcus aureus	(Bisignano <i>et al.</i> , 1999)
Huile d'olive	Listeria monocytogenes Staphylococcus aureus Salmonella enteritidis Yersinia sp. Shigella sonnei	(Medina <i>et al.</i> , 2006)
	Helicobacter pylori	(Romero <i>et al.</i> , 2007)
Saumures d'olives	Erwinia Clavibacter Agrobacterium Pseudomonas	(Brenes <i>et al.</i> , 2011)
Grignons d'olives	Alternaria solani Botrytis cinerea Fusarium culmorum	(Winkelhausen <i>et al.</i> , 2005)

Elles réalisent sur les bactéries en dénaturant leurs protéines cellulaires et en altérant leurs membranes cytoplasmiques (**Ranalli, 1991**). Nombreuses études ont également révélées l'action des polyphénols des effluents oléicoles sur la croissance des champignons (**Özdemir, 2009 ; Vagelas *et al.*, 2009 ; Senani-oularbi *et al.*, 2011**) et des algues (**Della greca *et al.*, 2001**).

En plus du coût élevé des opérations d'extraction, la récupération des polyphénols des margines reste une tâche analytique difficile pour plusieurs raisons. Les phénols sont des espèces chimiques réactives, vulnérables à l'oxydation, à la conjugaison, à l'hydrolyse, à la polymérisation, ceci est aggravé par le contact direct de ces polyphénols avec les enzymes et les substrats (protéines, lipides, polysaccharides) qui se trouvent en grande quantités dans les margines (**Obeid *et al.*, 2005b**).

L'analyse immédiate des margines fraîches est donc toujours la situation idéale, en raison des modifications possibles dans leur composition chimique lors de la manipulation de l'échantillon

(**Bianco, 2003**). Plusieurs auteurs ont recommandé l'utilisation des margines brutes, filtrées et stérilisées comme agents antibactériens et antifongiques. Ces eaux de végétations ont présentés des résultats similaires à leurs extraits phénoliques (**Capasso *et al.*, 1995 ; Visioli et Galli, 1998 ; Vagelas *et al.*, 2009 ; Esmail *et al.*, 2015**).

Tableau 8.- Activité antimicrobienne des margines brutes et leurs extraits phénoliques

Microorganisme	Espèce	Référence
Algues	Ankistrodesmus braunii	(DELLAGRECA <i>et al.</i> , 2001)
Champignons	Fusarium solani	(YANGUI <i>et al.</i> , 2008)
	Botrytis cinerea	(VAGELAS <i>et al.</i> , 2009)
	Aspergillus flavus	(SENANI-OULARBI <i>et al.</i> , 2018)
Bactéries	Clavibacter michiganensis	(ÖZDEMİR, 2009)
	Pseudomonas syringae	(CAPASSO <i>et al.</i> , 1995 ; ÖZDEMİR, 2009)
	Corynebacterium michiganense	(CAPASSO <i>et al.</i> , 1995)
	Bacillus subtilis	(OBIED <i>et al.</i> , 2007B)
	Pseudomonas fluorescens	(ROILA <i>et al.</i> , 2016).
	Proteus sp.	(OBIED <i>et al.</i> , 2007B ; TAFESH <i>et al.</i> , 2011 ;
	Enterococcus faecalis	
	Pseudomonas aeruginosa	
	Klebsiella pneumoniae	ESMAIL <i>et al.</i> , 2015 ;
	Escherichia coli	LARIF <i>et al.</i> , 2015 ;
	Staphylococcus aureus	LEOUIFOUDI <i>et al.</i> , 2015)
	Streptococcus pyogenes	(Tafesh <i>et al.</i> , 2011)
	Pseudomonas savastanoi	(Krid <i>et al.</i> , 2011

Il faut signaler que les poly phénols de l'olivier ne sont pas disponibles commercialement en grande quantité. Plusieurs méthodes ont été proposées pour leur synthèse chimique (Tuck et Hayball, 2002) ou enzymatique (Espin *et al.*, 2001) mais les protocoles sont généralement lents et coûteux. La récupération des polyphénols des effluents oléicoles offre donc une double opportunité d'obtenir des biomolécules à haute valeur, et de réduire la toxicité environnementale de margines.

Matériel et Méthodes

I.1.-Matériel

I.1.1.-Appareillage

Les différents appareils utilisés sont donnés dans le tableau :09

Tableau 9.- Tableau regroupant l'appareillage utilisé lors de l'expérimentation

Appareil
Balance de précision
Etuve
Agitateur magnétiques plaque chauffante
Agitateur magnétique
Rotavapor
Bain-marie thermostaté
Spectrophotomètre UV-Visible
Centrifugeuses (réfrigérée et non réfrigérée)
Vortex
Lampe UV (254 et 366nm)
Lyophilisateur à plateaux

I.1.2.-Echantillon

Les échantillons des margine prélevés à partir du bassin de stockage des margines après avoir bien mélangés puis transportés dans un bouteille de 1,5 litre, puis on conserve à l'abri de la lumière dans un environnement non oxygéné et à 4° C, jusqu'à utilisation.

I.2.- Méthodes

I.2.1.-Analyses physico-chimiques

La caractérisation physico-chimique des margines a été étudiée par plusieurs chercheurs est généralement tributaire des techniques et des systèmes d'extraction de l'huile d'olives, elle diffère d'un pays à l'autre.

I.2.1.1. - Mesure du PH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre l'analyse est effectuée en triple.

I.2.1.2. - Matière sèche (MS) et d'humidité

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines. La MS est déterminée par la pesée d'un échantillon de margines avant et après évaporation à 105°C pendant 24 heures. Elle est exprimée en g/100 g de poids frais(**Tovar et al., 2002**)

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

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

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

I.2.1.3.- Matières minérale (MM) et organique (MO)

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

I.2.1.4.- Conductivité électrique

La conductivité, la salinité sont mesures à l'aide d'un conductimètre. La conductivité est exprimée en mS/cm

I.2.2.- Extraction des composés phénoliques**❖ Extraction des polyphénols totaux à l'acétate d'éthyle**

Les composés phénoliques contenus dans les margines sont extraits selon la méthode décrite par (**DE MARCO et al., 2007**). Les margines doivent, au préalable, subir un prétraitement par l'hexane pour éliminer les lipides. Il s'agit d'une extraction liquide – liquid l'acétate d'éthyle celui-ci est souvent utilisé pour ce type d'extraction (**Della greca**

et al., 2004). En effet, **FKI et al., 2004** ont démontré que l'acétate d'éthyle est plus efficace que les autres solvants d'extraction avec un taux d'extraction élevé.

❖ Délipidation des margines

10 ml de margines sont ajoutées à 10 ml d'hexane (V/V). La solution est mélangée pendant 3 min. Le mélange subit ensuite une agitation suivie d'une décantation pendant 10 min. Les margines délipidées sont recueillies après séparation complète en deux phases : l'hexane (surnageant) et les margines délipidées (phase aqueuse) prêtes à une extraction liquide-liquide. Cette étape est reprise trois fois (3 lavages à l'hexane).

❖ Extraction à l'acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle est additionné aux margines dilapidées (V/V), l'ensemble est homogénéisé. Après une centrifugation à 4000g pendant 20 min, le mélange est complètement séparé en deux phases : l'acétate d'éthyle riche en poly phénols (surnageant) et les margines (culot) (figure 06). L'opération d'extraction est répétée trois fois dans le but de récupérer le maximum de composés phénoliques. La phase organique riche en composés phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C (**Zahari et al., 2014**). Le protocole est illustré par la figure 06.

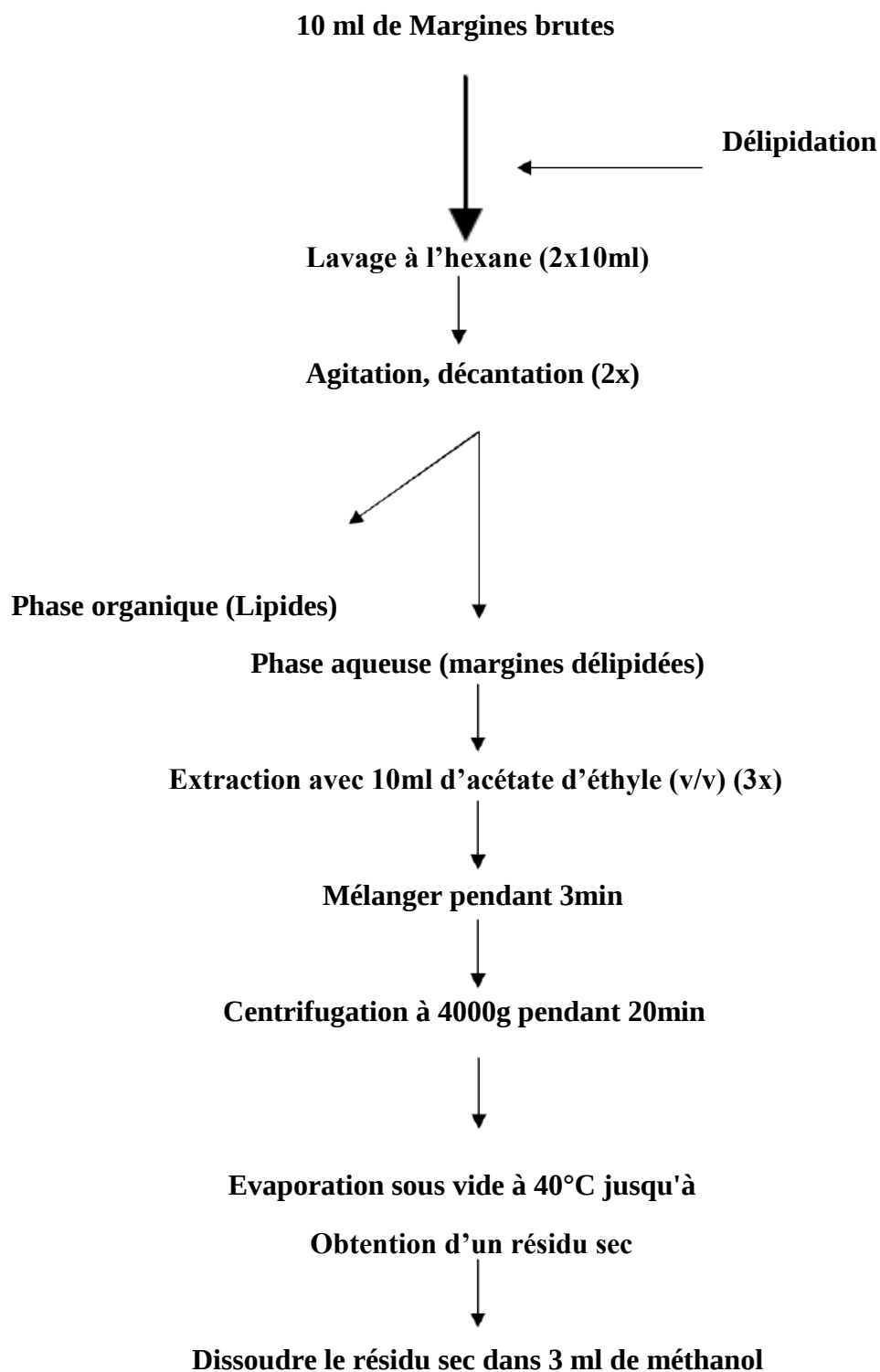


Figure O7.- Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des margines (De marco *et al.*, 2007).

I.2.3.-Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est une étude qui permet d'avoir et d'identifier les différents constituants de la plante. Il est basé sur des tests chimiques qui indiquent la présence ou non de ces constituants tels que : les flavonoïdes, les alcaloïdes, les tanins, les saponines, les quinones libres, les phénols, le stérol et les polyterpènes.

I.2.3.1.-Les flavonoïdes

Dix gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium sont ajoutés à 0.5 ml de l'extrait. La coloration rose-rouge ou jaune, après trois minutes d'incubation à température ambiante, indique la présence des flavonoïdes (**Hadduchi et al., 2014**).

I.2.3.2.- Tanins

Huit gouttes d'une solution diluée de chlorure ferrique à 1 % sont ajoutées à 1 ml de l'extrait. Après quelques minutes d'incubation à température ambiante, le chlorure ferrique développe une coloration verdâtre qui indique la présence des tanins catéchiques ou bleu noirâtre qui révèle l'existence des tanins galliques (**Hadduchi et al., 2014**).

I.2.3.3.- Test des phénols

2ml de l'éthanol est ajouté à 2 ml de l'extrait, L'ajout de quelques gouttes de FeCl₃ permet l'apparition d'une coloration qui indique la présence des phénols (**Iqbal hussain et al., 2011**).

1.2.4.- Dosage des composés phénoliques par colorimétrie

La teneur en composés phénoliques des différents extraits obtenus à partir des margines traitées et non traitées a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de poly phénols présents dans l'échantillon. Les solutions des

différents échantillons à doser et la gamme étalon sont préparées de la même manière et dans les mêmes conditions.

A 125 l de chaque extrait ou dilution, sont ajoutés 500 l d'eau distillée puis 125 l du réactif Folin-Ciocalteu, six minutes plus tard, 1,25 ml de la solution aqueuse de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7% (annexe 1 0) sont additionnés au milieu réactionnel puis le mélange est ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée. Après 60 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm au spectrophotomètre contre un blanc sans extrait (figure 08) La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de la forme $y = ax$ réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence. Les résultats seront donc exprimés en équivalents d'acide gallique. La quantité des poly phénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 g/ml) est exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matières sèches totales des margines brutes et de margines délipidées selon le cas.

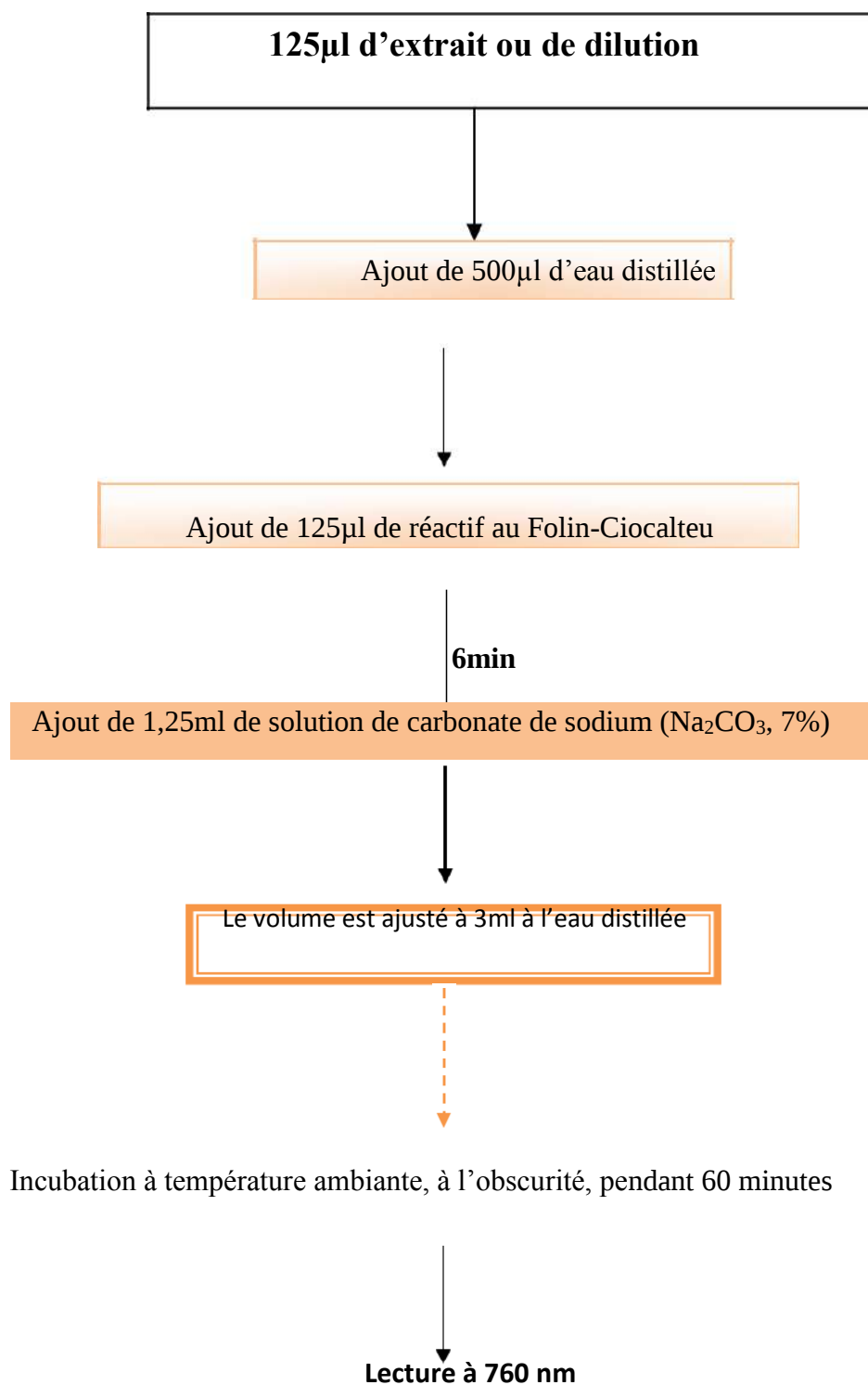


Figure 08.- Etapes de dosage des polyphénols selon SINGLETON et ROSSI (1965).

II .1.-Etude de l'activité anti-oxydante

La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel d'activité anti-oxydante (Meir *et al*, 1995 ; Apak *et al.*, 2007).

II.1.1.- Capacité de piégeage d'espèces radicalaires

Réaction entre le radical libre DPPH[•] et l'antioxydant

❖ Principe

Le composé chimique 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 09). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, donc le DPPH[•] reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH[•]. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleu-violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH[•], mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

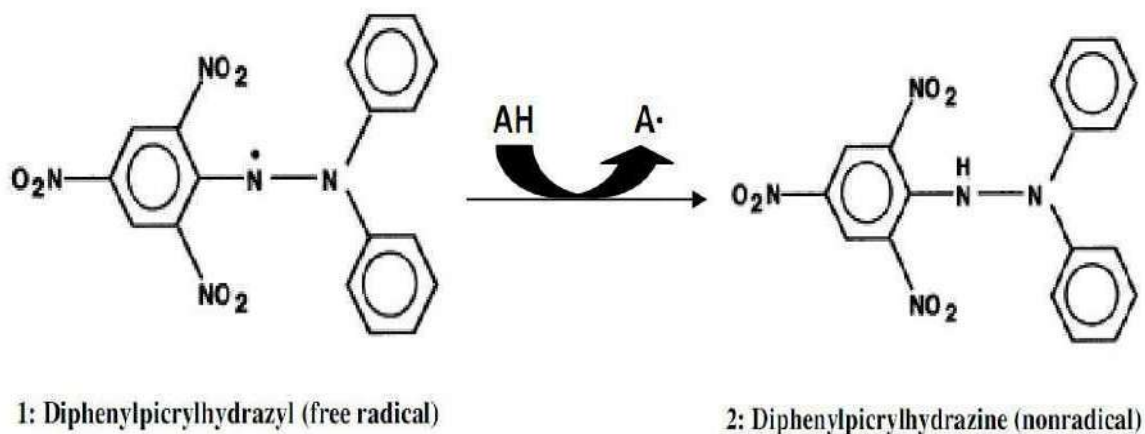


Figure 09.-Structure de DPPH[•] (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH.

Le test DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydant. En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au

sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH[•] donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH[•] par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (Molyneux, 2004).

Dans la réaction ci-dessous (1), le radical DPPH est représenté par Z[•] et la molécule du donneur par AH, la réaction primaire est: $Z^{\bullet} + AH \rightarrow ZH + A^{\bullet}$ (1)

ZH est la forme réduite du radical DPPH. Notons que compte tenu de la solubilité en milieu organique du DPPH, cette méthode est plus adaptée pour les dosages qui se déroulent en milieu alcoolique (méthanol et éthanol) (Mansouri *et al.*, 2011).

Evaluation du potentiel anti-radicalaire

Pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH[•] à un temps de référence (par exemple après une heure du début de la réaction) ou la détermination de la quantité.

D'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction (Sanchez-moreno *et al.*, 1998 ; Godoy et Scherer, 2009). Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage % RSA (Radical Scavenger Activity) ou pourcentage d'inhibition (% I), ou l'absorbance du mélange réactionnel qui obtient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (contrôle négatif) à un temps t :

$$\% \text{ RSA} = [(\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle négatif}] \times 100\%$$

❖ Mode opératoire

Le protocole expérimental utilisé est celui de BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995). La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100ml de méthanol. 50 μ l des solutions d'extraits phénoliques ou standards sont ajoutés à 2ml de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 1heure et la décoloration par rapport au contrôle négatif qui contient uniquement la solution de DPPH qu'on mesure à 517nm. Dans notre test le contrôle positif est représenté par une solution d'acide gallique synthétique comme un antioxydant standard. Les concentrations des extraits phénoliques de margines (avant et après déglycosylation) dans le milieu réactionnel, ainsi que celle de l'acide gallique utilisé comme

témoin dans plusieurs tests, sont de 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100 ; 150 ; 200 et 250 g/ml. La diminution de l'absorbance est évaluée par le pourcentage d'inhibition (% I) et l'IC₅₀ (quantité équivalente en extrait qui neutralise 50% du DPPH). Une IC₅₀ faible correspond à une activité antioxydant ou anti-radicalaire élevée de l'extrait. Ce paramètre a été introduit par **Brand-Williams** et ses collaborateurs (1995) et a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (**Brand-williams et al., 1995 ; Boskou et al., 2006 ; ložiene et al., 2007 ; chew et al., 2009**).

Le pouvoir anti radicalaire APR est inversement proportionnel à l'IC₅₀ ($APR=1/IC_{50}$) (**Prakash et al., 2007 ; chew et al., 2009**)

III.- Evaluation de l'activité antibactérienne

III .1.- Évaluation de l'activité antibactérienne

III .1.1.- Tests antibactériens

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antibactériens des différents extraits bruts des feuilles de l'olivier, margines, et les CP :

- La méthode de diffusion en milieu gélosé, qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne ;
- La méthode de micro-dilution, qui a pour objectif la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture.

❖ Préparation des pré-cultures

A partir des milieux de conservation des souches de référence, des repiquages successifs sont effectués. Ces derniers sont réalisés sur des boîtes de gélose nutritive (ensemencement par stries) après revivification dans des bouillons de culture.

Préparation de la suspension bactérienne

A partir de la culture bactérienne jeune, quelques colonies sont prélevées et remises en suspensions dans de l'eau physiologique stérile. Une agitation est ensuite effectuée au vortex

pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à 10^6 UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm.

Selon Mac Farland, on admet une densité optique (DO) comprise entre 0,08-0,1 correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml, la suspension d'inoculum est diluée à 1/10 pour avoir une concentration de 10^6 germes/ml.

III .2.- Méthode de diffusion en milieu gélosé

III .2 .1.-Test de sensibilité aux extraits bruts, et aux composés phénoliques

- ❖ **Ensemencement et dépôt des disques:** L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'écouvillon est rechargé à chaque fois pour ensemer une nouvelle boîte de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits ou de CP sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées.
- ❖ **Lecture des resultants:** La lecture a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions autour des disques. Chaque essai a été réalisé trois fois et les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart type. La sensibilité aux différents extraits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit :
 - Non sensible (-) pour le diamètre moins de 8 mm ;
 - Sensible (+) pour un diamètre entre 9 à 14 mm;
 - Très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15 à 19 mm et extrêmement sensible (++++) pour le diamètre plus que 20 mm (**Moreira et al., 2005**).

Conclusion

Conclusion

Le présent travail a été consacré à l'étude de poly phénol présent dans la margine Les margines sont des eaux de végétation qui sont générées lors de l'extraction de L'huile d'olive vierge. Ce sont des effluents riches en matière organique (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines...) Et en sels minéraux (potassium, sodium, magnésium...) **(Nefzaoui, 1987)**.

Les effluents d'huileries d'olive ont un pouvoir polluant très important, auront un impact négatif sur l'environnement, dû leur impact sur : les eaux, qui affecte la qualité de l'eau potable **(Fkii et al., 2005)** et sur les sols qui subit un changement des caractéristiques physico-chimiques, par l'augmentation de la salinité des sols **(Fiestas, 1981)**, et de la diminution du pH. **(Marisot et Tournier, 1986)**., les composés phénoliques sont les responsables majeurs de la phytotoxicité des margines donc il inhiber le développement des plantes et de certains microorganismes **(Sumperdo et al., 2004)**. Dans ce sens, plusieurs travaux ont été effectués pour remédier à ce problème, cette situation nous a réaliser une étude expérimentale basé sur La richesse des margine par les composée phénolique grâce a leur structure qui montre une solubilité dans l'huile inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines **(Ranalli, 1999)**.

Grace à la propriété de compose phénolique le margine peuvent faire plusieurs types de valorisation, dans Trois grands créneaux d'applications : en agro-alimentaire agissent sur la qualité sensorielle des aliments, couleur, odeur et goût. Mais aussi sur leur conservation avec un rôle antibactérien et antioxydant **(Bers et Bondinil, 2000)**, en cosmétologie Ils permettent de lutter contre le vieillissement cutané **(G hedira, 2005)** et en phytothérapie, cette situation nous a réaliser une étude basé sur les paramètrant physico-chimique **(PH,conductivité matière minérale)**.

Dans l'ensemble, les margines issus des huileries constituent une source précieuse de bio-phénols naturels, doués d'une activité antibactérienne remarquable, pouvant servir dans l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire ou en agriculture. La récupération de ces polyphénols offre la double opportunité d'obtenir des biomolécules à haute valeur additive d'un côté, et de réduire le caractère polluant des margines d'un autre côté

Le test antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, a permis de conclure que les extraits de feuilles de l'olivier et des margines ont une source prometteuse

d'agents antioxydants avec forte activité anti-radicalaire liée au contenu en polyphénols **(NIKI, 2010)**.

La valorisation nous a permis de remédier l'impact négative, améliorer la rentabilité du secteur oléicole.

Références bibliographiques. -

Références bibliographiques

ABEROUMAND A. & DEOKULE S.S. (2008). Comparison of phenolic compounds of some edible plants of iran and india. *Pakistan J. of Nutr.*, 7 (4): 582-585.

Achak M., Ouazzani N., Mandi L. (2009) Traitement des margines d'une huilerie moderne par infiltration-percolation sur un filtre à sable. *Revue des sciences de l'eau, Journal of Water Science* ; 22 : 421-433.

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

Annaki A., Chaouch M., Rafiq M. (1999a) Elimination des margines par évaporation

APAKR., GÜÇLÜ K., DEMIRATA B., ÖZYÜREK M., ÇELİK S.E.,

AZABOU S., NAJJAR W., GARGOUBI A., GHORBEL A. and SAYADI S. (2007). Catalytic wet peroxide photo-oxidation of phenolic olive oil mill wastewater contaminants: Part II. Degradation and detoxification of low-molecular mass phenolic compounds in model and real effluent. *Applied Catalysis B: Environmental.*, 77: 166-174.

BALICE V. and CERA O. (1984). Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. *Grasas y Aceites.*, 25: 178-180.

Balice V., Boari G., CERA O., Abbaticchio P. (1982) Indagine analitica sulle acque di

Balice V., Carrieri C., Cera O. (1990). Caratteristiche delle acque di vegetazione. *Rivista Italiana Sostanze Grasse.* 67:9-16.

Balice V., Cera O. (1984) Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. *Grasas y Aceites.* 25:178 – 180.

Bambalov G., Israilides C., Tanchev S. (1989) Alcohol Fermentation in olive Oil Extraction Effluents, *Biological Wastes*, 27, 71-75.

BEKTASOĞLUB., BERKER K.I. and ÖZYURT D. (2007). Comparative evaluation of various totalantioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. *Mol.*, 12: 1496-1547.

BERTIN L., MAJONE M., DI GIOIA D. and AVA F. (2001) Anaerobic fixed-phase biofilm reactor system for the degradation of the low-molecular weight aromatic compounds occurring in the effluents of anaerobic digestors treating olive mill wastewaters. *J. Biotechnol.*, 87 (2): 161-77

Bianco A., Buiarelli F., Cartoni G. P., Coccioli F., Jasionowska R., Margherita P. (2003) Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters. *Journal of Separation Science*; 26(5): 409–416

Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 51:

BORJA R., BANKS C.J. and ALBA J. (1995). A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture. *Environ. Sci. Health A.*, 30: 607-626.

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

BORJA R., MARTIN M.A., DURAN BARRANTES M.M. (1992) Kinetic study of biomethanization of olive mill wastewater previously subjected to aerobic treatment with *Geotrichum candidum*. *Grasas. Y. Aceites.*, 43: 82-86.

BOSKOU G., SALTA F.N., CHRYSOSTOMOU S., MYLONA A., CHIOU A. and ANDRIKOPOULOS N.K. (2006).Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chem.*, 94: 558–564.

BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E. and BERSET C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28: 25–30.

- Brenes M., Garcia A., Santos B.L., Medina E., Romero C., De Castro A. et al. (2011)** Olive glutaraldehyde-like compounds against plant pathogenic bacteria and fungi. *Food Chemistry*, 125: 1262–1266.
- CAPASSO R. (1997).** The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Top. Phytochem., Res. Trends.*, 1: 145-156
- Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A., Cristinzio G. (1995)** Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*; 79: 393-398.
- CASA R., D'ANNIBALE A., PIERUCCETTI F., STAZI S.R., GIOVANNOZZI SERMANI G., LO CASCIO B. (2003)** Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosph.*, 50 (8) : 959-66.
- CHANG S.K., LI C., HIANG S. and CHANG M.C. (1995)** Intracellular protoplast fusion of *Candida tropicalis* for enhancing phenol degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43 : 534-538.
- CHEW Y-L., GOH J-K. and LIM Y-Y. (2009).** Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem.*, 116 : 13–18
- CICHELLI A. et SOLINAS M. (1984)** I composti fenolici delle olive e dell'olio di oliva. *Riv. Merceol.*, 23 : 55-69.
- Conseil Oléicole International (C.O.I) (2003)** Classification des huiles d'olive. Normes internationales applicables à l'huile d'olive et à l'huile de grignon d'olive. Disponible sur <http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/3619-normaf/5>
- Cossu R., Blakey N., Cannas P. (1993).** Influence of codisposal of municipal solid waste and olive vegetation water on anaerobic digestion of sanitary landfill. *Water Sciences Technology*. 27: 261-271.

CROZIER A., CLIFFORD M.N. and ASHIHARA H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

D'ANNIBALE A., STAZI S.R., VINCIGUERRA V., GIOVANNOZZI and SERMANNI G. (2000) Oxiraneimmobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.*, 77 (2-3): 265-73

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

Della Greca 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: 352-359.

DELLA GRECA M., PREVITERA L., TEMESSI F., and CARRELLI A. (2004). Lowmolecular- weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochem. Analys.*, 15 : 184–188

DellaGreca M., Monaco P., Pinto G., Pollio A., Previtera L., Temussi F. (2001). Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 67: 352-359.

DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F. and MICHAUD P. (2012). Olive mill wastes : Biochemical characterizations and valorisatio strategies. *Process Biochemistry.*, 48 :1532-1552

Di Giovacchino L. (1989) Olive Processing Systems. Separation of the Oil from the Must. *Olivae*; 26: 21-29.

DI-GIOVACCHINO L. (1996). L'influence des systèmes d'extraction, sur la qualité de l'huile d'olive, *Olivea.*, 63, 52-63.

DI-GIOVACCHINO L., MASCOLO A. and SEGHITTI L. (1988) Sulle caratteristiche delle acque di vegetazione delle olive. *La Rivista delle Sotanze Grasse*. 65

Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P. (2012) Extrait de feuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie* ; 10-18.

El Alami B. (2000). Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante de la fraction phénolique des margines. Mémoire de 3ème cycle, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc. p 93

El hajjouji H. (2007). Evolution des caractéristiques physico-chimiques, spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries d'olive au cours de traitements biologique et chimique. Thèse doctorat. Université de Marakech.147p

El Hajjouji H., Pinelli E., Guiresse M., Merlina M., Revel J.C., Hafidi M. (2007) Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat Res*; 634: 25-31

EL-ABBASSI A., KHAYET M. and HAFIDI A. (2011). Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater. *Watr. Res.*, 45: 4522–4530.

Erdohan Z.Ö., Turhan K.N. (2011) Olive leaf extract and usage for development of antimicrobial food packaging. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Edition A. Méndez Vilas* ; 1094-1101

ERGÜL F.E., SARGIN S., ONGEN G. ET SUKAN F.V., 2009 . Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *Inter. Biodeter. & Biodegr.*, 63: 1-6.

Esmail A., Chahboun N., Mennane Z., Amiyare R., Abed H., Barrahi M (2015) Étude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis-à-vis de souches pathogènes. *J. Mater. Environ. Sci* ; 6 (3): 869-876.

Espín J.C., Soler-Rivas C., Cantos E., Tomás-Barberán F.A., Wichers H.J. (2011) Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J Agric Food Chem*; 49 (3):1187-1193.

FADIL K., CHAHLAOUI A., OUAHBI A., ZAID A. and BORJA R. (2003). Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *Inter. Biodeter. & biodegr.*, 51, 37-41.

Farhat Ali Khan; ZahoorUllah and SajjadHaider, 2011 : Phytochemicals screening and antimicrobial activities of selected medicinal plants of *Khyberpakhtunkhwa* Pakistan African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5(6), pp. 746-750.

Fedeli E. (1999) Qualité (stockage, conservation et conditionnement de l'huile), réglementation et contrôle. Séminaire international sur les innovations scientifiques et leurs applications en oléiculture et oléotechnique. *Conseil Oleicole International* ; 1-20

Fiestas Ros de Ursenos J.A. (1981). Différentes utilisations des margines : Actes séminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. FAO-UNDP. Tunisie, pp 93-110.

Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A., Panella A. et Fabio T., Environmental effects caused by olive mill waste waters: Toxicity comparison of lowmolecular- weight phenol compounds. *Journal Agricultural. Food Chemistry*, 51, 1005-1009, (2003).

FKI I., ALLOUCHE N. ET 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 Chem.*, 93: 197-204.

Fleeger J. L., et Flipse I. J. 1964. Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*.47 (5): 535-538.

Fylaktakidou, K.C., Hadjipavlou-Litina, D.J., Litinas, K.E., Nicolaides, D.N., (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr. Pharm. Des.* 10 (30), 3813-3833.

Galli E, Pasetti L, Volterra E, Tomati U. (1994). Compost from olive processing industry waste waters. Congresso Internazionale, L'apporoccio Integrato della Moderna Biologia: Uomo, Territorio, Ambiente, 1, 22-25. Vieste (FG). 22-25 Settembre Italia.

GARCIA GARCIA I, JIMENEZ PENA PR, BONILLA VENCESLADA JL, MARTIN MARTIN A, MARTIN SANTOSMA, RAMOS GOMEZ E.(2000) Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process. Biochem.*, 35 (8) : 751-758.

GARRIDO HOYOS S.E., MARTINEZNIETO L., CAMACHORUBIO F. and RAMOSCORMENZANA A. (2002). Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*. *Pro.Biochem.*, 37 : 1169-1176.

GODOY H.T. and SCHERER R. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazylmethod. *Food Chem.*, 112 : 654-658.

Habtemariam, S., (2003). Cytotoxic and cytostatic activity of erlangerins from *Commiphora erlangeriana*. *Toxicon*. 41 (6), 723-7

Hadduchi.F; Chaouche.TM; Ksouri.R, 2014. Phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of aqueous-extracts of *Helichrysumstoechas subsp. rupestre* and *Phagnalonsaxatile subsp. saxatile*. *Chin J Nat Med* 12:415–22.

HAMDI M. (1992). Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 37 : 155

HAMDI M. and ELLOUZ P. (1993) Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluized bed processes. *Environ. Technol.*, 14 : 183-188.

HARBORNE J.B. (1990). Constraints on the evolution of biochemical Pathways. *Biol. J. of the Linnean Societ.*, 39: 135-151.

Iqbal Hussain; Moneeb.Ur RehmanKhattak; Riazullah; Zia Muhammad; Naeem Khan;

KABEB RYMA 2014 Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issusdes margines d'olives de la variété*Chamlal* : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation PP,66

KARAKAYA S. (2009).Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67(11), 632-8.

Karakaya, S., (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (6), 453-64.

Karapinar M., Worgan M.J.T. (1983) Bioprotein production from the waste products of

Khodja I. (2011) Valorisation des sous-produits de l'activité oléicole ; République Algérienne démocratique et populaire, *Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement centre National des Technologies de Production plus Propre (CNTPP)*; 8p.

KISSI M., MOUNTADAR M., ASSOBEI O., GARGIULO E., PALMIERI G., GIARDINA P., SANNIA G. (2001) Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 57 (1-2) : 221-226.

Knupp G, Rücker G, Ramos-Cormenzana A, Garrido Hoyos S, Neugebauer M, OssenkopT. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 38, 277-282

Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit A. (2008)Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of Food Safety*; 28: 76-87.

Krid S., Bouaziz M., Triki M.A., Gargouri A., Rhouma A. (2011) Inhibition of olive knot disease by polyphenols extracted from olive mill waste water. *Journal of Plant Pathology*; 93 (3): 561-568.

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 Badis Mostaganam*. 143p.

LAKHTAR H., ZAOUIA N., SALIH G., TANTAOUI-ELARAKI A., LAMRANI K., CHEHEB M., HASSOUNI H., ISMAILI-ALAOUI M., VERHE F., GAIME-PERRAUD I., AUGUR C. et ROUSSOS S. (2006). Diversité des champignons filamenteux isolés dans esl maâsra au Maroc. *International Congress on Bioprocesses in Food Industries (ICBF-2006)*.

Larif M., Ouhssine M., Soulaymani A., Elmidaoui A. (2015) Potential effluent oil mills and antibacterial activity polyphenols against some pathogenic strains. *Res Chem Intermed*; 41:1213-1225.

LEON W., NITIEMA., SAVADOGO A., JACQUES S., DAYERI D. et ALFRED S. (2012). Traoré Activité antimicrobienne in vitro de certains composés phénoliques (Coumarine et quercétine) contre la gastroentérite souches bactériennes, 183-187

Leong, L.P., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 76, 69-75.

Leouifoudi I., Harnafi H., Ziad A. (2015) Olive mill waste extracts: Polyphenols content, antioxidant, and antimicrobial activities. *Advances in Pharmacological Sciences* ; 1-11

Loulan PY, Thelier Y. (1987). Procédé et dispositif de traitement par fermentation méthanique des eaux résiduaires lipidiques, Brevet français, 2620439

LOŽIENE K., VENSKUTONIS P., AUSRA S ., and JUOZAS L A.R. (2007). scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem.*, 103 : 546–559.

Macheix ,J. J., Fleuriet A., et Sarni-Manchado , P. 2006. Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: « Les polyphénols en agroalimentaire ». Ed. Tec &Doc. Lavoisier. 1-26

MACHEIX J.J., FLEURIET A. and P. SARNI-MANCHADO (2006). Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris

MACHEIX J.J., FLEURIET A. and P. SARNI-MANCHADO (2006). Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris

Malik, N. S.A., Bradford, J. M., (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in “Arbequina”olives. *Scientia Horticulturae* 110, 274-278.

Mamadou.B, 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Other. Université Blaise Pascal - Clermont Ferrand II, France

MANSOURI N., SATRANI B., GHANMI M., EL GHADRAOUI L., GUEDIRA A. et AAFI A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l’huile

essentielle de *juniperus communis* du maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 80 : 791 – 805.

Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 51, 304-315

MARTINEZ N.L., RAMOS-CORMENZANA A., GARCIA PAREJA M.P., GARRIDO HOYOS S.E. (1992). Biodegradacion de compuestos fenolic del alpechin con *Aspergillus terrus*, *Grasas. Y. Aceites.*, 43 (2) : 75-81.

Martinez.JP; Ledent.JF; Bajji.M and Kinet.J-M, 2003. effect of water stress on growth, Na⁺ and K⁺ accumulation and water use efficiency in relation to osmoticaadjustment in two population of *Atriplex halimus L.* *Plant Growthregulation* 41,p 64-65.

Mebirouk M. (2002). Rejets des huileries. Développement d'un procédé intégré dans la biodégradation des polyphénols dans la margine. *CMPP News*, n°11.

Medina E., De Castro A., Romero C., Brenes M. (2006) Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oil and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54: 4954-4961.

Medjkouh L., Tamendjari A., Alves R.C., Araújo M., Oliveira B. M. P. P. (2016) Effect of *Bactrocera oleae* on phenolic compounds and antioxidant and antibacterial activities of two Algerian olive cultivars. *Food Funct*; 7: 43-72

MIDDELHOVEN W.J. (1993) Catabolism of benzene compounds by Ascomycetous and Basidiomycetous yeasts and yeast like fungi. A. Literature Review and experimentapproach. *Antome van Leewenhoek. Inter. J. of gen. and molecular microbiol.*, 63 : 125-144.

Millan B., Lucas R., Robles A., García T., Alvarez de Cienfuegos G., Gálvez A. (2000). A study on the microbiota from olive-mill wastewater (OMW) disposal lagoons, with emphasis on filamentous fungi and their biodegradative potential *Microbiol Res.* 155(3):143-7.mills (alpechin) : inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere*, 2, 423-432.

MOLYNEUX P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2) : 211-219

MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E., ROURA S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, **38** p, 565-570.

Mouncif M., Achkari-Begdouri A., Faid M. (1993). Traitement des margines par digestion anaérobique. *Actes Inst. Agron. Vet. Maroc*.13(2):13-19.

Mouncif M., Tamoh S., Faid M., Achkari-Begdouri A. (1993). A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco. *Grasas y Aceites*. 44: 335-338.

Muscolo A., Panuccio M.R., Sidari M. (2001). The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. *Plant Growth Regulation*. 35: 31-35.

Nassif D. (2004). Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant naturelle. *L'eau, L'industrie, Les nuisances*, **1**, 99-107.

NEFZAOUI A. (1987) Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'olivier. Tunis

Nefzaoui A. (1991) Valorisation des sous-produits de l'olivier. *Fourrages et sous-produits méditerranéens (Zaragoza) CIHEAM* ; 101-108.

Niaounakis M., C. P.Halvadakis (2004) Olive-mill wastemanagement: Literature Review and Patent Survey. *Typothito-George Dardanos Publications, Athens (Greece)*; 430p

Obied H.K., Bedgood Jr. D.R., Prenzler P.D., Robards K. (2007b) Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*; 45: 1238-1248

outayeb wasila 2014 activité antibactérienne et antioxydante des poly phénols extrait des sous-produit oleicoles :margines et feuilles de l'olivier (variété ,chamlal)70 ,77

Özdemir Z., (2009) Growth inhibition of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* and *Pseudomonas syringae* pv *tomato* by olive mill wastewaters and citric acid. *Journal of Plant Pathology*; 91: 221-224.

Ozkaya, M.T, et Celik, M., (1999). Quantitative analysis of phenolic compounds in olive cuttings. *Acta Horticulturae*, 474, 477-480.

parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of

Pereira A.J., Pereira A.P., Ferreira I.C., Valentão P., Andrade P.B., Seabra R., et al. (2006) Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *J Agr Chem*; 54: 8425-8431

Pérez J., De la Rubia T., Moreno J., Martínez J. (1992) Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environ. Toxicol. Chem*; 11: 489-495.

POPOVICI C., SAYKOVA I. et TYLKOWSKI B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* ., 4 : 25-39.

PRAKASH D., UPADHYAY G., BRAHMA N. and SINGH H.B.(2007). Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food chemistry*, 104 : 783-790.

PULIDO R., BRAVO L., and SAURA-CALIXTO F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.*, 48 (8) : 3396-402

qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Libanaise, Liban. 41 p

Ramos-Cormenzana A. (1990) Studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil

Ramos-Cormenzana A., Juárez-Jiménez B., García-Pareja M.P. (1996) Antimicrobial Activity of Olive Mill Wastewaters (Alpechin) and Biotransformed Mill Wastewater Waste-Olive Oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*;283-290.

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

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

Raven.PH; Evert.RF; Eichhorn.SE; Bouharmont.J, 2003. Biologie végétale, Traduction de la 7e édition américaine par J

RICE-EVANS (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 20 : 933-956.

Rodis P. S., Karathanos V. T., Mantzavinou A. (2002) Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50: 596-601

Roila R., Branciari R., Ranucci D., Ortenzi R., Urbani S., Servili M. et al. (2016) Antimicrobial activity of olive mill wastewater extract against *Pseudomonas fluorescens* isolated from mozzarella cheese. *Italian Journal of Food Safety*; 5: 57-60.

Romero C., Medina E., Vargas J., Brenes M., De Castro A. (2007) In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem*; 55: 680-686.

SANCHEZ-MORENO C., LARRAURI JOSE A . and SAURA-CALIXTO F. A. (1998). Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. of the Sci. of Food and Agricultur.*, 76(2) : 270-276.

Senani-Oularbi N., Riba A., Moulti-Mati F. (2018) Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production by olive mill wastewater. *Bioscience Research*; 15 (1): 369-380

SINGLETON V.L. and AROSSI J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technol. & Viticultur.*, 16 : 144-153

Tafesh A., Najami N., Jadoun J., Halahlih F., Riepl H., Azaizeh H. (2011) Synergistic Antibacterial Effects of Polyphenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 1-9

Tomati U, Galli E. (1992). In Humus, its structure and role in agriculture and environment, Kubat J. Ed. Elsevier, London. 117-126

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

- TSIOULPAS A., DIMOU D., ICONOMOU D. and AGGELIS G.(2002).** Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, 84: 251-257
- Tuck K.L.,Tan H.W.,Hayball P.J. (2000)** Synthesis of tritium-labeled hydroxytyrosol, a phenolic compound found in olive Oil.*J Agric Food Chem*; 48(9): 4087-4090.
- Uccella, N., (2001).** Olive biophenols : biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends Food Science and Technology*. 11, 315-327
- Vagelas I., Kalorizou H., Papachatzis A., Botu M. (2009)** Bioactivity of olive oil mill wasterwater against plant pathogens and post harvest diseases. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*; 23 (2): 1217-1219.
- Vagelas I., Kalorizou H., Papachatzis A., Botu M. (2009)** Bioactivity of olive oil mill wasterwater against plant pathogens and post harvest diseases. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*; 23 (2): 1217-1219.
- VAZEQUEZ R.A. (1978).** Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile. *Revue française des corps gras* , 25(1) : 21-26.
- Veillet S. (2010)** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive: Entre Tradition et Innovation. *Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Marseille (France)*; 153p.
- VISOLIF., BELLOMOG., GALLIC. (1998).** Free radical-scavenging properties of olive oilpolyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **247**, 60-64
- Winkelhausen E., Pospiech R., Laufenberg G. (2005)** Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bulletin of the chemists and technologists of Macedonia*; 24: 41-46.
- YAKHLEF WAHIBA 2019** Caractérisation des profils phénoliques et évaluation de l'activité antibactérienne du contenu phénolique des margines monovariétales.P57 ,58
- Yangui T., Rhouma A., Triki M.A., Gargouri K., Bouzid J., (2008)** Control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strains. *Crop Protection*; 27(2): 189-197.

YAO L.H., JIANG Y.M., SHI J., TOMAS-BARBERAN F.A., DATTA N., SINGANUSONG R. and CHEN S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59: 113-122.

ZAHARI A., TAZI A. and AZZI M. (2014). Optimisation des conditions de traitement des margines par un superoxydant K3FexMnyO8 [Optimization of treatment conditions of Olive Oil Mill Wastewater by superoxidant K3FexMnyO8]. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5 (2): 484-489.

Zbakh H., El Abbassi A., Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: a review. *J Funct Foods*, 4, 53-65, (2012).

Résumé

Les margines sont des effluents qui sont générées lors de l'extraction de l'huile d'olive vierge, ils sont riches en matière organique (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines...) épanchés dans la nature. Plusieurs travaux ont été effectués pour remédier à l'impact négatif des margines sur l'environnement. Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude expérimentale basée sur la présentation des techniques pour effectuer une analyse physico-chimique (pH, conductivité et matière sèche, matière minérale), extraction des polyphénols totaux à l'acétate d'éthyle, criblage phytochimique et dosage des composés phénoliques par colorimétrie (la méthode de Folin-ciocalteu) afin d'évaluer l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et l'activité antibactérienne des extraits phénoliques.

La valorisation nous a permis de remédier à l'impact négatif, améliorer la rentabilité du secteur oléicole.

Les mots clés : Margines, Valorisation, composés phénoliques, Antioxydant.

Summary

The vegetable waters are effluents which are generated during the extraction of virgin olive oil, they are rich in organic matter (phenolic compounds, lipids, sugars, proteins....) spread in nature, several works have been carried out to remedy the negative impact of vegetable waters on the environment, in this context, we carried out an experimental study based on the presentation of techniques for performing a physico-chemical analysis (pH, conductivity and dry matter mineral matter), extraction of polyphenols total with ethyl acetate, phytochemical screening and determination of phenolic compounds by colorimetry (the Folin - Ciocalteu method) in order to evaluate the antioxidant activity by the method of scavenging the free radical DPPH and the antibacterial activity of the extracts phenolic.

The valuation has enabled us to remedy the negative impact, to improve the profitability of the olive sector.

The key words : Margines, valorization, phenolic compounds, antioxidant.

ملخص

المياه النباتية عبارة عن نفايات سائلة تتولد أثناء استخلاص زيت الزيتون البكر، فهي غنية بالمواد العضوية (المركبات الفينولية، الدهون، السكريات، البروتينات....) ونظرا لانتشارها في الطبيعة، قد تم تنفيذ العديد من الأعمال لمعالجة التأثير السلبي للمياه النباتية على البيئة.

في هذا السياق أجرينا دراسة تجريبية تعتمد على عرض تقنيات إجراء التحليل الفيزيائي والكيميائي (pH، الإنتاجية والمادة الجافة، المواد المعدنية)، استخراج البوليفينول الكلي مع أسيتات الإيثيل، الفحص الكيميائي النباتي وتحديد المركبات الفينولية عن طريق قياس الألوان (طريقة فولين سيوكلتو) وتطرقنا أيضا لتقييم نشاط مضادات الأكسدة من خلال طريقة تنظيف الجذور الحرة DPPH والنشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات الفينول.

وبالتالي لقد مكّننا هذا التثمين من معالجة التأثير السلبي لها، وهذا لتحسين ربحية قطاع الزيتون.

الكلمات المفتاحية : النفايات السائلة لمعاصر الزيتون، التثمين، المركبات الفينولية، مضادات الأكسدة.