



*République Algérienne Démocratique Et Populaire*  
*Ministère De L'Enseignement Supérieure Et De La Recherche*  
*Scientifique*

**Université ABBES LAGHROURE-KHENCHELA**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
*Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire*

*Mémoire*

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

**FILIERE : Sciences Biologiques**

**OPTION : Biochimie appliquée**

*Thème*

*Étude phytochimique des margines issus de  
l'extraction à froid de l'huile d'olive*

Présenté par :

*M<sup>lle</sup>* GHODBANE Nadia

&

*M<sup>lle</sup>* CHERMIME Samya

**Jury de soutenance :**

<b>Présidente :</b>	Dr. HAMLIA Sofia	(MCB)	Univ. Khenchela
<b>Promotrice :</b>	Dr. Kadi Kenza	(MCA)	Univ. Khenchela
<b>Examinatrice :</b>	Dr. DJEMIL Randa	(MCB)	Univ. Khenchela

**Promotion : 2017/2018**

---

*Laboratoires où le travail a été réalisé : laboratoire de l'université Abbes Laghroure-Khenchela.  
Laboratoire central de l'Institut des Régions Arides (IRA) à Médenine - Tunisie.*

## **Remerciements**

*Nous tenons tout d'abord à remercier Allah le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous tenons également à remercier «Dr. Kadi Kenza » pour la qualité du sujet, son support et les orientations durant toute la réalisation de ce mémoire par ses conseils qui m'ont appris la patience.*

*À «Dr. HAMLI Sofia» de bien vouloir présider ce jury et d'examiner ce travail.*

*À «Dr. DJEMIL Randa » d'avoir accepté examiner et juger ce travail.  
Un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire central de l'Institut des Régions Arides (IRA) à Médenine –Tunisie-.*

*À toute l'équipe du Campus des Laboratoires Pédagogiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.*

*Enfin, on remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

# *DEDICACE*

*A mes très chers parents,*

*Nul mot ne pourra exprimer mes sentiments et ma gratitude envers vous, je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

*Que Dieu vous préserve une longue vie heureuse.*

*A mes frères, Hichame et Manssour, et A mes sœurs,*

*Kamilia, Chahinez.*

*Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.*

*À tous mes collègues de promotion avec qui j'ai partagé les joies et les difficultés durant ces années.*

*A tous ceux que j'aime, Je dédie le fruit de mon projet de fin d'études.*



## *Dédicace*

*Je dédie ce travail, tout d'abord à mes parents qui m'ont  
soutenu tout au long de mes études  
par leur dévouement et abnégation et pour leur amour,  
leurs sacrifices et leurs  
encouragements qui ont fait de moi ce que je suis  
aujourd'hui.*

*A ma sœur qui n'a jamais cessés de  
m'encourager pour qui je souhaite que du bonheur et la  
réussite pour ses études.*

*A tous mes collègues de la promotion avec qui j'ai  
partagé les joies et les difficultés durant  
ces années.*

*Samya*

## Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des photographies	
Introduction	
<b>Revue bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Les margines</b>	
I. L'olivier	01
I.1. L'oléiculture	01
I.2. Technologie de fabrication d'huile d'olives	01
I.2.1. Opérations préliminaires	01
I.2.2. Broyage et malaxage	01
I.2.3. Séparation des phases liquides-solides et liquides-liquides	02
I.2.4. Procédés d'extraction d'huiles d'olives	02
I.2.4.1. Système Discontinu ou le système traditionnel	02
I.2.4.2. Système continu ou système à centrifugation	02
I.2.4.2.1. Système continu à trois phases	02
I.2.4.2.2 Système Continu à deux phases	03
II. Margine	05
II.1. Caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines	05
II.1.1. La caractérisation physico-chimique	05
II.1.2. La Caractérisation microbiologiques	05
II.2. Composition chimique des margines	06
II.2.1. La fraction organique	06

II.2.1.1. Les glucides, les composés azotés et les vitamines	06
II.2.1.2. Les huiles et les acides organiques	06
II.2.1.3. Les composés phénoliques	05
II.2.2. La fraction minérale	07
II.3. Impact des effluents d'huileries d'olive sur l'environnement	08
II.3.1. Pollution des sols	09
II.3.2. Pollution de l'air	09
II.3.3. Pollution des eaux	09
II.4. Traitement et valorisation des margines	10
II.4.1. Traitement des margines	10
II.4.1.1. Procédés biologiques	10
II.4.1.2. Procédés physiques	10
II.4.1.3. Procédés chimiques	10
II.4.2. Valorisation des margines	12
II.4.2.1. Epannage	12
II.4.2.2. Production de compost	12
II.4.2.3. Production des protéines d'organismes unicellulaires (POU)	13
II.4.2.4. Utilisation en alimentation animale	13
II.4.2.5. Production des enzymes	13
II.4.2.6. Production de biogaz	13
<b>Chapitre II : Les polyphénols</b>	
I. Les polyphénols	14
I.1. Structure chimiques et classification	14
I.1.1. Polyphénols simples	14
I.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques	15
I.1.1.2. Les acides hydroxycinnamiques	16
I.1.2. Les composés phénoliques complexes	16
I.2. Biosynthèse	17
I.2.1. La voie shikimate	17

I.2.2. La voie polyacétat	17
I.3. Intérêt des polyphénols	19
I.3.1. Rôle physiologique	19
I.3.2. Rôle technologique	19
I.3.3. Rôle nutritionnel et thérapeutique	19
I.4 .Activités biologiques des polyphénols	20
I.4.1. Activités antioxydantes	20
I.4.2. Activités antimicrobienne	20
I.4.3. Activité antibactérienne	20
I.4.4. Activité antifongique	21
II. Les composées phénoliques des margines	21
II.1. Monomères aromatiques	21
II.2. Les polymères phénoliques	22
II.3. Activités biologiques des composés phénoliques des margines	22
II.3.1. Effets contre le vieillissement	22
II.3.2. Effets contre SIDA	22
II.3.3. Effets contre l'athérosclérose	22
II.3.4. Effets anticancéreux	23
II.3.5. Effets antioxydants	23
<b>Matériel et Méthodes</b>	
1. Matériel	24
1.1. Echantillonnage	24
1.2. Réactifs chimiques et instruments	25
2. Méthodes	25
2.1. Caractérisation des margines	25
2.1.1. Mesure de pH, conductivité électrique, et la salinité	25
2.1.2. Détermination de l'humidité et de la matière sèche	26
2.1.3. Solide total en suspension	27

2.1.4. Teneur en azote totale	27
2.1.5. Matière organique et minérale	28
2.1.6. Dosage des sucres totaux	29
2. 2.Etude phytochimique des margines	29
2.2.1. Tests phytochimiques	30
2.2.1.1. Les flavonoïdes	30
2.2.1.2. Les coumarines	30
2.2.1.3. Alcaloïdes	30
2.2.1.4. Terpénoïdes	30
2.2.1.5. Les saponines : Test de mousse	30
2.2.1.6. Les composés réducteurs	30
2.2.3. Extraction des composés phénoliques	31
2.2.3.1. Délipidation des margines	31
2.2.3.2. Extraction à l'acétate d'éthyle	31
2.2.3.3. Dosage des polyphénols totaux	33
2.2.3.4. Dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de trichlorure d'Aluminium	34
2.2.4. Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse	35
2.2.5. Analyses des phénols et flavonoïdes par HPLC-MS	36
<b>Résultats et discussion</b>	
1. Caractérisation physicochimique des margines	38
1. 1. PH	38
1. 2. La conductivité électrique et salinité	38
1. 3. L'humidité et la matière sèche	39
1.4. Solide total en suspension	40
1.5. Matière organique et minérale	40
1.6. Teneur en azote total	41
1.7. Dosage des sucres totaux	41
2. Etude phytochimique des margines	41

2.1. Screening phytochimique des margines	41
2.2. Dosage des composés phénoliques	43
2.2.1. Dosage des polyphénols totaux	43
2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux	43
3. Analyse chromatographique des acides gras par chromatographie phase gazeuse	44
4. Analyse chromatographique des polyphénols par HPLC-MS	46
Conclusion et perspectives	47
Références bibliographiques	48
Annexes	

### Résumé

Les industries oléicoles, en plus de leur production principale qui est l'huile d'olive, génèrent des quantités énormes d'effluents nommés Margines dont le déversement dans la nature entraîne une pollution accrue de l'environnement et un gaspillage d'une source potentielle de produits à divers usages.

L'objectif de cette étude est de faire une étude phytochimique des margines issues de l'extraction d'huile d'olives (de la variété Chemlal) dans la région de Baghai Wilaya de Khenchela.

La caractérisation physico-chimique des échantillons a montré des rejets liquides avec un taux d'humidité élevés [95%], acides [pH = 4,46] et un teneur en solide total en suspension beaucoup plus important (0,90%), très riches en matières organique [MO = 98 %] et en sucres totaux [0,36 mg/ml] et pauvres en élément minéraux [CE = 4,76 mS/cm], et en azote total 0,30 g/l. Une extraction liquide-liquide a été effectuée, en utilisant l'acétate d'éthyle. Les dosages des polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu [0,05mg EAG /ml E] et les flavonoïdes totaux sont déterminés par le trichlorure d'aluminium [8,24µg EQ /ml E].

Le screening phytochimique réalisé nous a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, les coumarines, composés réducteurs avec des quantités importante et en quantités moindres des alcaloïdes et des terpénoïdes. De même nous avons noté l'absence totale des saponines.

L'analyse qualitative des extraits par CPG-MS et HPLC-MS a révélé la richesse des margines par de nombreux acides gras et des composés phénoliques.

**Mots clés :** margine, extraction, screening phytochimique, polyphénols, acide gras, chromatographie.

**Abstract**

The olive-growing industries, in addition to their main production which is olive oil, generate huge quantities of effluents named Margine whose discharge into the environment leads to an increased pollution of the environment and a waste of a potential source of products for various uses.

The objective of this study is to make a phytochemical study of the olive mill waste water resulting from the extraction of olive oil (of the Chemlal variety) in the region of Baghai Wilaya of Khenchela.

The physicochemical characterization of the samples showed liquid discharges with high humidity [95%], acids [pH = 4.46] and higher total suspended solids content (0.90%). very rich in organic matter [MO = 98%] and total sugar [0.36 mg / ml] and poor in mineral elements [EC = 4.76 mS / cm], and in total nitrogen 0.30 g / l. Liquid-liquid extraction was performed using ethyl acetate. The total polyphenol assays were determined by the method of Folin-Ciocalteu [0.05 mg EAG / ml E] and the total flavonoids are determined by aluminum trichloride [8.24 µg EQ / ml E].

The phytochemical screening carried out allowed us to highlight the presence of flavonoids, coumarins, reducing compound with significant amounts and in smaller amounts of alkaloids and terpenoids. Similarly, we noticed the total absence of saponins.

The qualitative analysis of the extracts by GC-MS and LC-MS revealed the presence of numerous fatty acids and phenolic monomers.

**Key words:** olive mill waste water, extraction, phytochemical screening, polyphenols, fatty acid, chromatographic.

بالرغم مما عرفته صناعة الزيتون من نمو كبير وإنتاجها الرئيسي لزيت الزيتون إلا أنها خلفت كميات هائلة من النفايات السائلة يشكل طرح هذه الأخيرة في الطبيعة تلوث وإهدار لمصدر كبير لمواد ذات استعمالات عديدة. الهدف من هذه الدراسة هو القيام بدراسة فيتو كيميائية للنفايات السائلة الناتجة عن استخراج زيت الزيتون للصنف شمال في منطقة بغي ولاية خنشلة.

أظهرت الخصائص الفيزيوكيميائية لعينات حمض النفايات السائلة رطوبة وحموضة عاليتين [98%, PH=4,46], ومحتوى جد مهم لكل من المواد [0,90%] والمواد العضوية [MO=98%] وكذلك السكريات الكلية

[0,36 / ] و محتوى ضعيف لكل من العناصر المعدنية [4,76= / ] [0,30 / ]

باستخدام خلات الايثيل وتم تحديد جرعات من إجمالي البوليفينول

Folin Ciocalteu [0,05mg EAG/ml E] وجرعات من إجمالي الفلافونويد حددت بواسطة

Trichlorure d'aluminium [8,24µg EQ/ml E]

التقصي الفيتو كيميائي سمح بالكشف عن وجود نواتج ابيضية ثانوية بكميات مهمة الفلاقونويد الكومارينس

القلويات أما فيما يخص التحليل النوعي للمستخلصات عن طريق الكروماتوغرافيا الغازية

عن ثراء المرج بالعديد من الأحماض الدهنية وعديدات الفينول

:النفايات - -التقصي الفيتو كيميائي-البوليفينول- الدهنية-

## Liste des abréviations

---

<b>%</b>	pourcentage
<b>AG</b>	Acide gras
<b>C°</b>	Degré Celsius
<b>AOACA</b>	Association of Official Analysis Chemist
<b>CAR/PP</b>	Centre d'activité régionale pour la production propre
<b>CE</b>	Conductivité électrique
<b>Cm</b>	Centimètre
<b>COI</b>	Conseil Oléicole International
<b>CPG</b>	Chromatographie phase gazeuse
<b>CPs</b>	Composés phénoliques
<b>CPG</b>	La chromatographie en phase gazeuse
<b>DBO5</b>	Demande biochimique en oxygène en cinq jours
<b>DCO</b>	Demande chimique en oxygène
<b>DO</b>	Densités optiques
<b>DSA</b>	Direction des services agricoles.
<b>g</b>	Gramme
<b>H</b>	Heure
<b>H</b>	Humidité
<b>H2O</b>	L'eau distille
<b>H2O2</b>	L'eau oxygénée
<b>H3PMo12O40</b>	Phosphomolibdique
<b>H3PW12O40</b>	Acide phosphotungstique
<b>Ha</b>	Hectare
<b>HCl</b>	Chlorure d'hydrique
<b>HPLC</b>	La chromatographie liquide à haute performance
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>Kg</b>	Kilogramme
<b>L</b>	Litre
<b>LDL</b>	Lipoprotéine d'une faible densité
<b>m<sup>3</sup></b>	Mètre cube

## Liste des abréviations

---

<b>M</b>	Masse
<b>M</b>	Mètre
<b>Mg</b>	Milligramme
<b>ml</b>	Millilitre
<b>mm</b>	Millimètre
<b>mn</b>	Minute
<b>MO</b>	Matière organique
<b>MoO<sub>3</sub></b>	Molybdène
<b>ms</b>	Milli Siemens
<b>mS/cm</b>	Milli siemens/centimètre
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonate de sodium
<b>ND</b>	Non déterminé
<b>Nm</b>	Nanomètre
<b>O<sub>2</sub></b>	Dioxygène
<b>Ph</b>	Potentiel hydrique
<b>Ph</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>P.O.U</b>	Protéines d'origines unicellulaires
<b>PP</b>	Polyphénols
<b>Ppm</b>	Partie par million
<b>Q</b>	Quintaux
<b>SOD</b>	Super oxyde dismutase
<b>STS</b>	Solides totaux suspension
<b>STS</b>	Solides totaux suspendu
<b>Tr</b>	Tour
<b>V</b>	Volume
<b>µg</b>	Microgramme
<b>µl</b>	Microlitre
<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>W<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Tungstène

## Liste des figures

Figures	Titres	Pages
01	Principaux processus d'extraction de l'huile d'olive	04
02	Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel.	10
03	Structure du noyau phénol.	14
04	Exemples d'acides hydroxybenzoïques.	15
05	Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques (C6-C3).	16
06	Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.	18
07	Droite d'étalonnage de D-glucose.	26
08	Schéma de l'extraction des polyphénols totaux des margines.	29
09	Schéma de dosage des polyphénols totaux des margines.	30
010	Droite d'étalonnage de l'acide gallique.	31
11	Schéma de dosage des flavonoïdes totaux.	31
12	Droite d'étalonnage de la quercétine.	32

## Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
01	la composition minérale des margines	08
02	Les principales classes de composés phénoliques	16
03	les principaux monomères aromatiques	21
04	Les caractéristiques des margines étudiées	21
05	les conditions opératoires des dosages des acides gras par GC-MS	33
06	les conditions opératoires des analyses des phénols et flavonoïdes par HPLC-MS	34
07	Caractéristiques physico-chimiques des margines étudiées.	35
08	Résultats des tests phytochimique sur les margines	39
09	Identification des chromatogrammes des acides gras	42
10	Identification des chromatogrammes des composés phénoliques	43

**Liste des photographies**

<b>Photographies</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>01</b>	Fruits d'olives de la variété Chemlal	22
<b>02</b>	La détermination de PH et de la Conductivité électrique (CE)	23
<b>03</b>	Détermination de la matière sèche.	23
<b>04</b>	Détermination des solides totaux suspendus	24
<b>05</b>	La détermination de la matière azotée	25
<b>06</b>	Détermination des cendres dans un four à moufle	25
<b>07</b>	Appareillage des chromatographies ; (A) chromatographie phase gazeuse (CPG), (B) chromatographie liquide à haute performance.	34

# *Introduction*

Dans la région Méditerranéenne, l'olivier (*Olea europea. L*) constitue une essence fruitière principale, tant par le nombre de variétés cultivées que par l'importance sociale et économique de sa culture et de son rôle environnemental (**Muzzalupo et al., 2014**).

Aujourd'hui, près d'un milliard d'oliviers sont cultivés à travers le monde sur presque tous les continents et ils occupent une superficie de 10 millions d'hectares, dont 98% sont concentrés sur le pourtour méditerranéen (**Wiesman, 2009**).

En Algérie, l'oléiculture est située principalement dans la partie nord du pays, elle est la première richesse arboricole du pays, où elle constitue une source de subsistance pour plusieurs familles (**Aggoun-Arhab, 2016**). Les industries oléicoles, en plus de leur production principale qui est l'huile d'olive, génèrent des quantités énormes d'effluents liquides appelés « margines ». Ces dernières sont constituées un problème sérieux avec l'impact négatif grave sur la qualité de sol et de l'eau ainsi que sur l'agriculture et l'environnement (**Sayadi et al., 2000; El Hajjouji et al., 2007**).

Les grandes variétés des composés trouvées dans les margines nécessitent des technologies différentes de traitement pour éliminer les agents polluants ayant des effets nocifs sur l'environnement (**Abeer et al., 2014**). Divers procédés sont applicables tels que les traitements biologiques, traitements physiques et les traitements chimiques (**Achak et al., 2008**).

Malgré leur profil polluant, les margines d'huile d'olive sont considérées comme une source très riche en antioxydants naturels tels que les polyphénols (**El-Abbassi et al., 2012**). De plus les polyphénols ont montré des propriétés biologiques : antimicrobiennes, antibactériennes, antioxydantes, antifongiques ... (**Sayadi et al., 2000**).

Dans ce contexte, s'inscrit notre travail qui a pour objectif de faire une étude phytochimique des margines issues de procédé d'extraction à froid d'huile d'olive dans la région de BAGAY Wilaya de KHENCHELA.

Le travail a été réalisé en quatre étapes :

- ✚ La caractérisation physico-chimique des margines.
- ✚ Screening phytochimique
- ✚ L'extraction des polyphénols de ces margines et leur caractérisation quantitative par Spectrophotomètre (contenu en polyphénols et les flavonoïdes) et qualitative par HPLC

### ✚ Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse (CPG)

Notre mémoire s'articule autour de deux parties. Dans la première partie nous présentons une revue bibliographique qui regroupe deux chapitres :

- ✓ Les margines
- ✓ Les polyphénols

Dans la deuxième partie nous nous démontrons les différentes méthodes suivies pour la réalisation de ce travail ainsi que les différents appareils utilisés, suivi par la présentation des résultats obtenus et leurs discussions et fini par une conclusion générale.

*Revue*  
*Bibliographique*

# *Chapitre I*

## *Les Margines*

## I. L'olivier

L'olivier (*Olea europea*) est un arbre méditerranéen de 6 à 8 mètres de hauteur, à tronc tortueux et à écorce grisâtre, crevassée (Mbourmad, 2011), et un système racinaire d'une profondeur de 500 à 700 cm. Les feuilles sont simples, lisses, coriaces, lancéolées. Leur durée de vie est de trois ans, c'est pourquoi la perte des feuilles, ou défoliation, se fait par tiers de frondaison (Roland et al., 2015). Le fruit est généralement allongée et ovale, son diamètre est compris entre 1 et 3cm, sa forme est variable suivant les variétés (Manallah, 2012). Sa couleur est d'un vert à brun noir à maturité, la pulpe contient de l'huile, et constitue la partie comestible du fruit (Terral et al., 1996). Le noyau (amandon) est très dur, osseux, contient une graine, rarement deux (Manallah, 2012).

### I.1. L'oléiculture

Le bassin méditerranéen c'est la terre de prédilection pour la culture de l'olivier. Il couvre près de 95% des oliveraies mondiales et qui assurent 82,98% de la production mondiale d'huile d'olives et 86,92% d'olive de table (COI, 2014).

Au niveau national, la superficie oléicole algérienne est de 239 350 ha, cette surface est répartie dans trois régions : le Centre 54,3% (112.921 hectare), l'Est 28,3% (35.192 hectare) et l'Ouest 17% (58.764 hectare) (COI, 2005).

### I.2. Technologie de fabrication d'huile d'olives

#### I.2.1. Opérations préliminaires

Dans la cour de l'huilerie, les olives sont pesées puis passent dans un système de laveuse-effeuilleuse qui va les nettoyer et permettre d'en retirer les impuretés (Aggoun-Arhab, 2016).

#### I.2.2. Broyage et malaxage

La trituration des olives permet de détruire les cellules des olives et libérer leur contenu. La pâte qui résulte est plus ou moins homogène qui devra être malaxée (Chimi, 2006). Où la pâte est mélangée lentement pour augmenter le rendement en huile (Veillet, 2010).

### **I.2.3. Séparation des phases liquides-solides et liquides-liquides**

Cette étape consiste à séparer les liquides (huile et margines) de la matière solide (grignons) ; qui renferme la majeure partie des solides présents dans l'olive (la peau, le noyau, la pulpe) et constitue l'un des deux principaux coproduits de la fabrication de l'huile d'olive (CAR/PP, 2000).

### **I.2.4. Procédés d'extraction d'huiles d'olives**

#### **I.2.4.1. Système Discontinu ou le système traditionnel**

L'olive est broyée dans un moulin en pierre. La pâte solide qui résulte est étendue en fines couches sur des disques de matière filtrante appelés scourtins (disques en fibre coco ou de nylon) (Chimi, 2006). L'application de la pression sur la charge des scourtins doit être réalisée de manière progressive, les scourtins doivent être lavés pour éviter l'augmentation d'acidité de l'huile (CAR/PP, 2000). L'extraction par presse donne une huile de qualité inférieure à cause de l'exposition de la pâte à l'air et génère des quantités importantes des margines (60 à 70 L/100 kg d'olives) (Chimi, 2006).

#### **I.2.4.2. Système continu ou système à centrifugation**

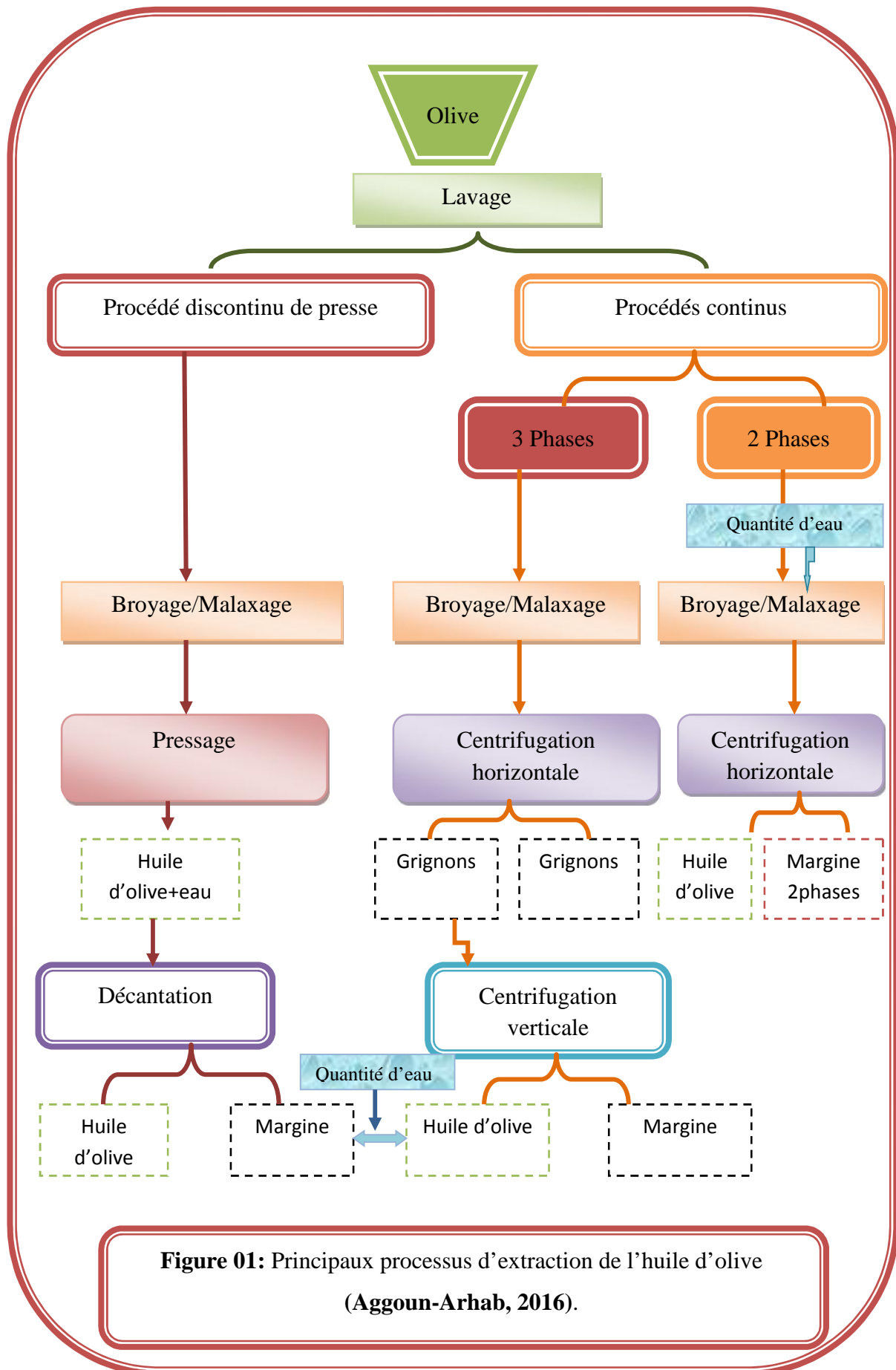
##### **I.2.4.2.1. Système continu à trois phases**

Le système Continu à trois phases permet une extraction successive de l'huile d'olive. Il s'agit d'un système de type mouture/centrifugation à trois phases où le broyage est réalisé par des broyeurs mécaniques à marteaux. Ces broyeurs, placés sur un axe entraîné par un moteur électrique, fonctionnent en continu et la pâte est alors obtenue instantanément. Cette pâte est soumise à une centrifugation donnant trois fractions, les grignons, les margines avec un peu d'huile et l'huile d'olive avec un peu d'eau (CAR/PP, 2000).

Ce système d'extraction permet d'éviter les inconvénients associés à l'extraction par pression dont la durée du stockage des olives et donc une production oléicole de moindre acidité. Il consomme d'importantes quantités d'eau chaude ce qui fait que l'huile extraite se trouve amoindrie en composés aromatiques et en composés phénoliques avec comme conséquences une résistance plus faible à l'oxydation (Aggoun-Arhab, 2016).

**I.2.4.2.2 Système Continu à deux phases**

Le système continu à deux phases permet une extraction d'huile d'olive sans ajout d'eau dans le décanteur ; ce décanteur engendré pour minimiser les inconvénients des systèmes précédents. La centrifugation sépare deux fractions seulement, une fraction huileuse et une fraction solide contenant. Ce système permet d'obtenir une huile riche en polyphénols totaux en comparaison avec les huiles obtenues avec le décanteur conventionnel à trois phases et le système traditionnel. L'intérêt majeur de ce type de système est qu'aucune étape supplémentaire n'est requise après centrifugation : lorsque l'appareil est bien réglé, l'huile d'olive sera directement séparée des grignons humides et produit une quantité moindre de margines et avec une charge polluante plus réduite (Chimi, 2006).



**Figure 01:** Principaux processus d'extraction de l'huile d'olive (Aggoun-Arhab, 2016).

## II. Margine

A l'origine, les margines ou eaux de végétation (aqua Reflue en Italie, alpechin en Espagne, ktsigaros en Grèce, zebbar dans les pays Arabes) (Mbourmad, 2011), sont des effluents issus de l'extraction de l'huile d'olive (Moumni, 2014) (qui représentent 50% de l'eau obtenue lorsque l'olive est écrasée), de couleur brune rougeâtre, qui se transforme en margine de couleur noire, d'aspect trouble et une odeur spécifique d'huile d'olive, de goût amer (Ghomari, 2015). Elles sont constituées par l'eau contenue dans les cellules de la drupe, les eaux de lavage et celles liées au processus de traitement (Moumni, 2014), et caractérisées par un pH acide de 4 à 5 et une très grande conductivité électrique due surtout aux ions potassium, chlorure, calcium et magnésium. La DCO (demande chimique en oxygène) peut varier de 50 à 220 g/l (Benyahia et Zein, 2003), et la DBO5 (demande biochimique en oxygène) varier de 45 à 50 kg/m<sup>3</sup> (max 100 kg/m<sup>3</sup>) (Moumni, 2014). Sa couleur noire résulte de la présence de polyphénols (Khoufi et al., 2007 ; Bazoti et al., 2006).

### II.1. Caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines

#### II.1.1. La caractérisation physico-chimique

La caractérisation physico-chimique des margines est généralement tributaire des systèmes d'extraction de l'huile d'olives, elle diffère d'un pays à l'autre (Blika et al., 2009). Ils ont un pH acide avec des valeurs comprises entre 4,2 et 5,9 (Eroglu et al., 2008). Les valeurs de la conductivité électrique des margines, est varient entre 18 et 50 mS/cm. Cette mesure ne donne pas forcément une idée immédiate sur la charge minérale du milieu (Paredes et al., 1986). L'extrait sec des effluents est extrêmement élevé et variable. Il est situé entre 15,5 et 266,5 kg /m<sup>3</sup> pour les margines de pression et entre 9,5 et 161,2 kg/m<sup>3</sup> pour les margines de centrifugation (Di Giovacchino et al., 1988).

#### II.1.2. La Caractérisation microbiologiques

Dans les margines d'olive, seuls quelques microorganismes arrivent à se développer. Ce sont essentiellement des levures et des moisissures (Ramos-Cormenzana et al., 1996). Ces derniers supportent la salinité élevée et le pH acide caractéristique de ces effluents et résistent plus que les bactéries aux substances phénoliques. On y trouve *phanerochaete chrysosporium* (Bautista et al., 2007), *pleurotus* (Kim et al., 2007),

*Lactobacillus plantarum* (Gallard et al., 1999). De nombreuses études microbiologiques effectuées sur plusieurs échantillons de margines ont confirmé l'absence totale de micro-organismes pathogènes.

Dans la plupart des cas, le pouvoir antimicrobien des margines (Ramos-Cormenzana et al., 1996) est lié essentiellement à l'action exercée par les composés phénoliques et les pigments bruns (Hamdi et Ellouz, 1993). Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (Ranalli, 1991).

## II.2. Composition chimique des margines

De nombreuses études sur la composition des effluents d'huileries ont montré qu'elles comportent environ 83 à 94 % d'eau, 4 à 16 % de matières organiques et 0,4 à 2,5 % de substances minérales (Ghomari, 2015). La composition des margines est très variable et dépend d'une multitude de facteurs parmi lesquels il faut distinguer le type d'olive et le processus d'élaboration de l'huile (CAR/PP, 2002).

### II.2.1. La fraction organique

#### II.2.1.1. Les glucides, les composés azotés et les vitamines

Les fractions lignocellulosiques et les pectines jouent un rôle important dans la texture des olives ; ils forment respectivement environ 3 % et 0,6 % du poids de la pulpe fraîche. Outre, la cellulose et la pectine issues de la pulpe d'olives (Fernandez Diaz, 1983), plusieurs autres sucres simples sont présents : raffinose, mannose, saccharose, glucose, arabinose et xylose (Salvemini, 1985). La fraction azotée est principalement représentée par des protéines avec une concentration qui varie de 1,2 à 2,4%. Tous les acides aminés ont été identifiés. Les plus abondants sont les acides aspartique et glutamique, la proline et la glycine (Capasso et al., 2002). En ce qui concerne les vitamines, plusieurs ont été identifiées dans les margines notamment les vitamines du groupe B, vitamines du groupe D et la vitamine pp (124 mg/kg) (Salvemini, 1985).

#### II.2.1.2. Les huiles et les acides organiques

Les principaux acides organiques rencontrés sont les acides fumarique, glycérique, lactique, malique, oléique, palmitiques, linoléiques, maslinique et malonique (Tsagariki et al., 2007), leur proportion varie entre 0,5 et 1,5%. La concentration des acides gras contenue dans les margines dépend du procédé d'extraction utilisé, elle varie entre 0,02 et

1%. L'acide oléique est le plus abondant, il représente 65% de la totalité d'huile (Salvemini, 1985).

### II.2.1.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées. Dans les margines, ces composés ont une structure variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction (Vazequez *et al.*, 1974). En général, La teneur en composés phénoliques varie entre 2 et 6 g/l (Fakharedine *et al.*, 2009) et elle peut même dépasser les 9g/ l (Kissi *et al.*, 2001). Plus de 50 composés phénoliques ont été identifiés dans les margines (Tanchev *et al.*, 1980). Les acides phénoliques sont les monomères les plus abondants dans les margines, ce qui explique leur acidité. Plusieurs acides phénoliques ont été identifiés dans différents types de margines (Acide 4-hydroxyphénylacétique, acide syringique, acide p-hydroxybenzoïques) (Borja *et al.*, 1995), en outre le 4-Hydroxyphényléthanol, et le 3,4 dihydroxyphényléthanol sont parmi les alcools phénoliques les plus rencontrés dans les margines, ces alcools peuvent être parfois liés à des glucosides comme le 4-diglycoside (3,4 dihydroxyphényl) éthanol (Vazequez *et al.*, 1974).

Les composés phénoliques à haut poids moléculaire sont essentiellement des tanins dont la concentration peut atteindre 12 g/l (Seraphim *et al.*, 2008). Le catéchol mélaninique est un flavotanin, il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines (Aissam, 2003).

### II.2.2. La fraction minérale

Les margines comportent des quantités significatives de sels minéraux (tableau 01). Une proportion de 80% de ces sels sont solubles (phosphate, sulfates et chlorures) et 20% sont insolubles (carbonates et silicates) (Salvemini, 1985). Les éléments les plus représentatifs sont le potassium, les carbonates, les phosphates et le sodium (Ros d'Ursinos *et al.*, 1992).

Tableau 01 : la composition minérale des margines (Salvemini, 1985)

Espèces	Concentration (mg .l)	Concentration (mg .l)
Orthophosphate		800,6
Zinc		270,2
Sulfate		16,68
Chlorures		5370,9
Sodium		15295,5
Potassium		1167,6
Calcium		410,3
Magnésium		103,4
Fer		8,34
Aluminium		0,66
Chrome		3,36
Nickel		1,33
Cobalt		1,66
Manganèse		0,83
Cadmium		41,7
Oxyde de silicium		10,0

### II.3. Impact des effluents d'huileries d'olive sur l'environnement

Les margines et les grignons d'olives représentent la masse restante considérée comme résidu de la trituration des olives, Les grignons ne posent pas de problèmes particuliers pour l'environnement et connaissent a diverses voies d'utilisation et de valorisation telles que : la production de charbon de bois et la possibilité éventuelle d'exploitation des éclats de bois pour la fabrication de la pâte à papier. Contrairement, les margines constituent une source d'inquiétude. Elles créent d'importantes nuisances et perturbations du milieu récepteur. Ces effluents sont acides et extrêmement chargés en matières organiques qui contiennent essentiellement des composés phénoliques (Ghomari, 2015) ; c'est parce que les phénols d'huiles d'olives sont amphiphiles et essentiellement hydrophiles (Léger, 1999), seulement une fraction des composés phénoliques entre dans la phase huile, et une large proportion (>98 %) est perdue avec le flux des déchets durant la transformation (Rodis et al., 2002). D'où la forte activité polluante des margines sur les

eaux de surface. Le rejet des margines des industries productrices d'huile d'olives est un problème majeur surtout pour les pays du bassin méditerranéen du fait qu'elles renferment une fraction organique importante et provoquent plusieurs type de pollution (**Ghomari, 2015**).

L'absence des méthodes de traitement adaptées poussent les propriétaires des moulins à huiles à rejeter les margines dans la nature sans aucun contrôle (**Mbourmad, 2011**) ou à surcharger avec ces substances toxiques un réseau d'égout pas adapté (**Benyahia et Zein, 2003**).

### **II.3.1. Pollution des 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 du changement des caractéristiques physico-chimiques des sols (l'augmentation de la salinité, et de la diminution du pH), et les effets phytotoxiques sur les oliviers. De même, les substances toxiques contenues dans ces eaux se fixent dans les sols. Certaines de ces substances telles que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne et détruire la microflore du sol, d'autres des résidus de pesticides notamment, sont nocives aux plantes (**Moumni, 2014**).

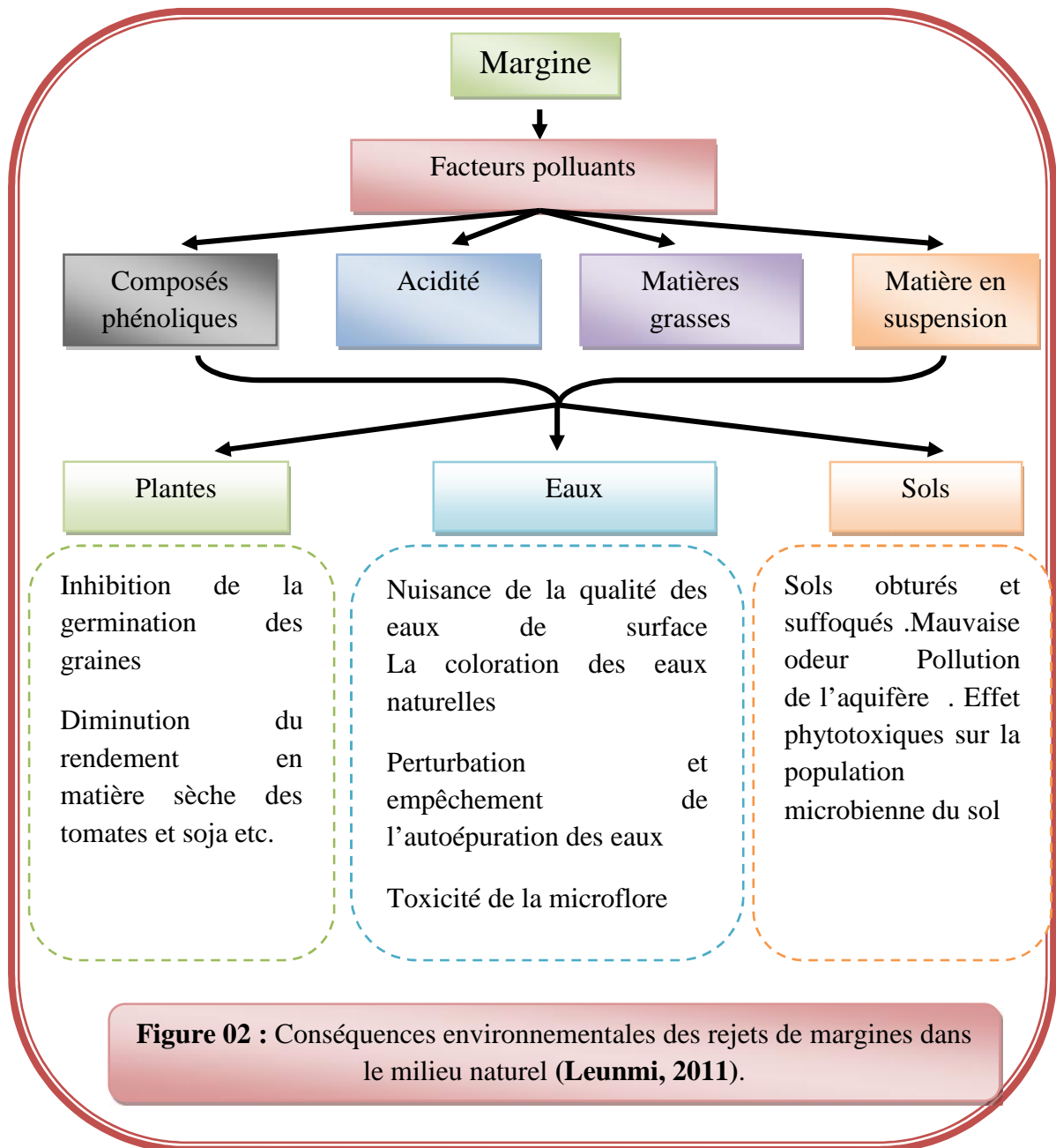
### **II.3.2. Pollution de l'air**

Les mauvaises odeurs, introduites par les margines provoquent des problèmes de pollution de l'air par le haut taux d'ammoniacque et d'autres gaz produits surtout lors du traitement de ces effluents (**Ghomari, 2015**).

### **II.3.3. Pollution des eaux**

Les margines rejetées dans la nature par épandage sur les sols peuvent polluer les eaux souterraines et les nappes phréatiques elles-mêmes (**Mechichi et sayadi, 2005**), ce qui automatiquement affecte la qualité de l'eau potable (**Benyahia et Zein, 2003**).

L'enrichissement des margines par les sucres provoquent une élévation de la population microbienne, par conséquent une augmentation de la consommation d'oxygène dissout, donc une réduction de sa disponibilité pour d'autres organismes vivants entraînant un déséquilibre de l'écosystème aquatique. De plus les lipides forment un film imperméable, ce qui empêche la pénétration des rayons lumineux et de l'oxygène (**Lacomelli, 2000**).



**Figure 02 :** Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel (Leunmi, 2011).

## II.4. Traitement et valorisation des margines

### II.4.1. Traitement des margines

Le traitement des margines constitue un problème complexe (**Ranalli, 1991**) ; le choix du procédé de traitement adéquat est lié à plusieurs facteurs, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la charge produite par les huileries et la voie de valorisation des margines (**Leunmi, 2012**).

#### II.4.1.1. Procédés biologiques

Les techniques de traitement biologique des margines basées sur les processus aérobie et anaérobie à l'aides des microorganismes (bactéries, champignons, levures) pour oxyder et dégrader la matière organique polluante en métabolites simples (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> et les composés aliphatiques). Cependant, l'effet antioxydant des polyphénols reste le facteur limitant pour ces procédés (**Fountoulakis et al., 2002**).

#### II.4.1.2. Procédés physiques

Les traitements physiques des margines qui ne sont pas transformées sont essentiellement des opérations d'épaississement des matières polluantes organiques et minérales (solubles et insolubles), et de séparation de ces derniers de la phase liquide (eau). Le problème de ces procédés est qu'ils engendrent une pollution solide très abondante, à cause de sa forte concentration en matière sèche et de son état visqueux, la margine pose des problèmes sérieux lors des opérations de filtration et d'ultrafiltration (**Renzo et Amirente, 1988**).

#### II.4.1.3. Procédés chimiques

Les traitements chimiques des margines sont utilisés pour réduire l'intensité de leur coloration (**Balice et al., 1997**).

La difficulté de traitement des margines est essentiellement due à l'existence de deux groupes de composés phénoliques. Le premier groupe (tanins, anthocyanes, oligomères et monomères phénoliques) responsable de la coloration rouge foncé des margines. Ces composés sont connus pour leur effet très toxique pour les microorganismes. Le second groupe est formé de polymères phénoliques responsables de la coloration noire des margines. Ce groupe de composés semble constituer une forme de la lignine

(pseudolignine) et des produits d'oxydation des composés du premier groupe (**Hamdi, 1991**).

#### **II.4.2. Valorisation des margines**

Un sous-produit est considéré comme un produit résidu qui apparaît durant la fabrication ou la distribution d'un produit fini. Il est non intentionnel, non prévisible et accidentel. Il peut être utilisé directement ou bien constituer un ingrédient d'un autre processus de production en vue de la fabrication d'un autre produit fini (**Ademe, 2000**). Ainsi, la valorisation des margines consiste dans le réemploi, le recyclage ou toute autre action visant à obtenir, à partir des déchets, des matériaux réutilisables ou de l'énergie (**Proot, 2002**).

Compte tenu de leur pourcentage en matière organique et de leur composition chimique de nombreux travaux ont été réalisés pour l'utilisation de ces effluents parmi ces applications :

##### **II.4.2.1. Epannage**

De nombreuses recherches ont été publiées sur les effets de l'épandage des effluents d'olive directement ou après traitement, sur des sols plantés de céréales et d'autres cultures annuelles. Les résultats obtenus ont montré que l'épandage des effluents des huileries d'olive sur les sols agricoles avait généralement des effets positifs sur la productivité de la plante, sur les caractéristiques du sol. Il peut être utilisé sur le sol pour remplacer partiellement ou totalement les fertilisants chimiques (**Abichou et al., 2003**).

##### **II.4.2.2. Production de compost**

Le compostage a pour but la transformation des matières organiques en substances humiques, tout en détruisant les parasites et les micro-organismes pathogènes. Le compostage des margines a été réalisé traditionnellement en Espagne dans des bassins d'évaporation. La technique consiste à ajouter aux margines toutes sortes de résidus secs, agricoles ou forestiers, et le mélange subit une fermentation aérobie-anaérobie. En suite, un séchage partiel et un conditionnement sous forme de pellette sont effectués. Le produit ainsi obtenu est utilisé comme engrais. Le compost est une source de matière organique pour la construction et la maintenance de l'humus du sol. Il peut améliorer la croissance et la vigueur des cultures, réduire les pathogènes des plantes et améliorer la résistance de celles-ci aux maladies (**Fiorentino et al., 2003**).

### II.4.2.3. Production des protéines d'organismes unicellulaires (POU)

La plupart des procédés appliqués sont basés sur l'utilisation des levures (*Candida krusei*, *Saccharomyces chevalerie* et *Saccharomyces rouxii*) capables de transformer les substances organiques en biomasse à haut contenu en protéines et vitamines de grande valeur pour l'alimentation animale et même humaine. Cette valorisation permettant d'obtenir d'une part, une diminution de 50 à 70% de la charge organique et d'autre part une biomasse protéique qu'on peut utiliser pour l'alimentation animale (**Fiorentino et al., 2003**).

### II.4.2.4. Utilisation en alimentation animale

Les effluents d'huileries d'olive ont été utilisés directement comme boisson pour le bétail et ils ont été donnés à des volailles à la place de l'eau potable. Ces expériences ont montré un abaissement du taux de mortalité de ces animaux et une diminution de leur coût par kilo de viande produite (**Abichou et al., 2003**).

### II.4.2.5. Production des enzymes

Les margines peuvent servir aussi comme milieu favorable pour la production d'enzymes par des micro-organismes ; les pectinases qui sont employé dans l'élaboration des jus de fruits et les laccases après purification, ces enzymes sont utilisées dans le traitement des eaux usées à cause de leur haut pouvoir de dégradation (**Aissam, 2003**).

### II.4.2.6. Production de biogaz

L'application du processus de digestion anaérobie aux margines a permis de transformer par des réactions biochimique environ 80% des substances organiques en biogaz (65% à 70% de méthane et gaz carbonique) (**Fiorentino et al., 2003**).

Malgré les nombreux procédés testés pour le traitement et la valorisation des margines, uniquement quelques-uns sont appliqués à l'échelle industrielle en raison du coût élevé des installations. En plus, les résultats obtenus par **Aissam (2003)** montrent pour la plupart des procédés, que le coût et l'énergie consommée étaient trop élevés par rapport au rendement d'épuration obtenu. Ceci est lié essentiellement à la grande quantité des margines produites annuellement et à leur forte et complexe charge polluante (**Aissam, 2003**).

# *Chapitre II*

## *Les polyphénols*

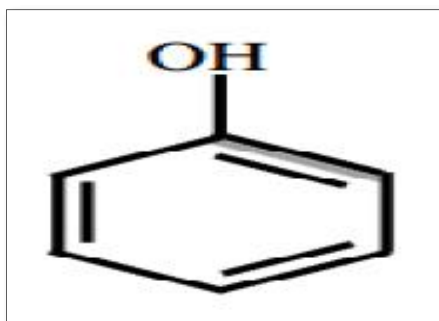
## I. Les polyphénols

Les composés phénoliques, sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement disposé dans la règne végétal (Collin et Crouzet, 2011), on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique auquel est directement lié un groupement hydroxyle libre, ou intercepté dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside (Lugasi *et al.*, 2003).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, c'est à dire ils n'exercent pas des fonctions directes au niveau des activités fondamentales dans l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (Belkhiri, 2009).

### 1. Structure chimiques et classification

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques secondaire, qui dérive du phénol C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH qui est un monohydroxybenzène (Figure 03).



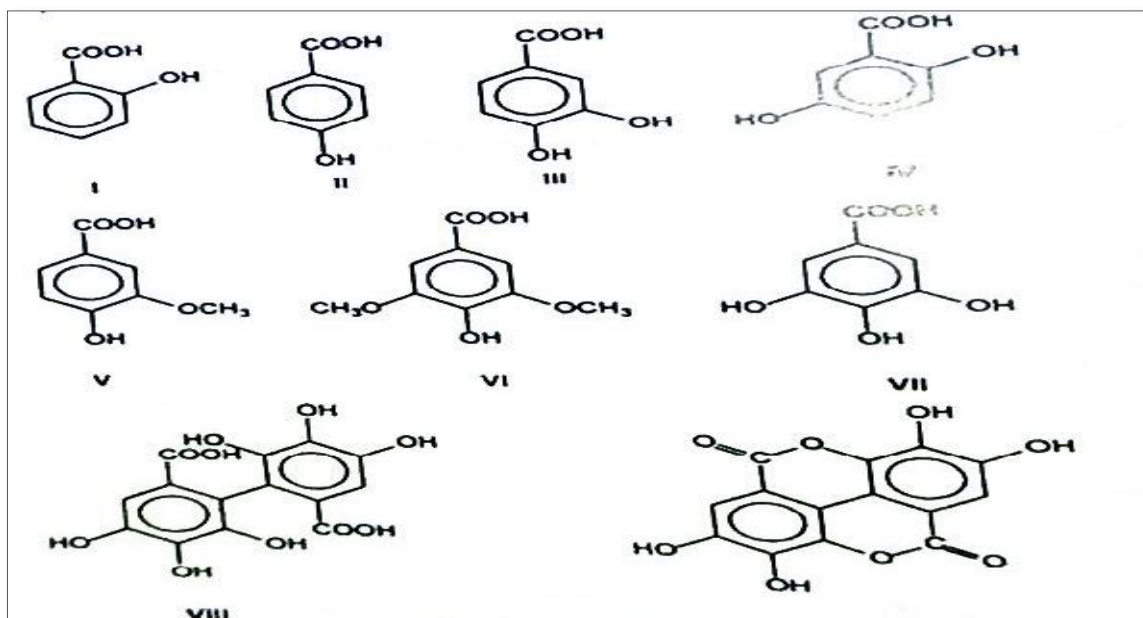
**Figure 03** : structure du noyau phénol (Achat, 2013)

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories ; les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (Achat, 2013).

#### I.1.1. Polyphénols simples

Les acides phénoliques peuvent être partagés en deux grands groupes, les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique.

**I.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques** sont des composés organiques, dérivés de l'acide benzoïque possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Les structures des acides hydroxybenzoïques varient, comme l'illustre la figure (04), suivant les hydroxylations et les métoxylation sur le cycle phénolique aromatique (Collin et Crouzet, 2011).

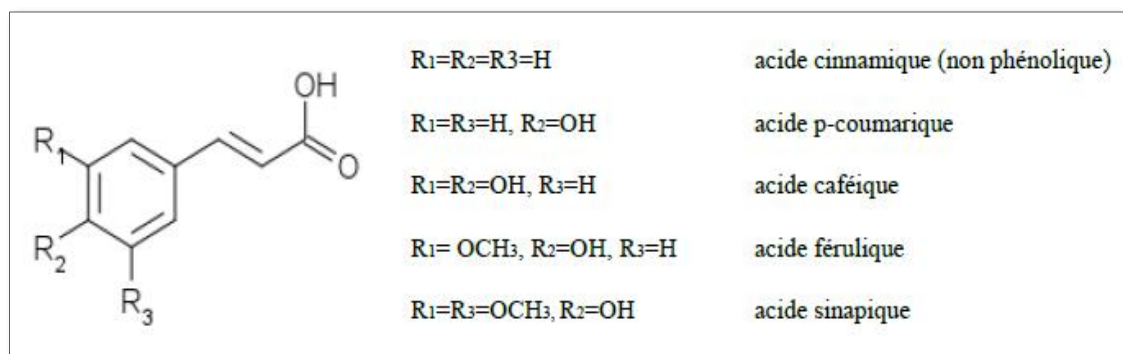


**Figure 04:** Exemples d'acides hydroxybenzoïques (Collin et Crouzet, 2011)

I : acide salicylique ; II : acide 4-hydroxybenzoïque ; III : acide protocatéchique ; IV : acide gentisique ; V : acide vanillique ; VI : acide syrigique ; VII : acide gallique ; VIII : acide hexahydroxydi-phénique ; IX : acide ellagique (dilactone de l'acide gallique)

**I.1.1.2. Les acides hydroxycinnamiques** sont des composés organiques, représentent une classe très importante dont la structure de base (C6 – C3) dérive de celle de l'acide cinnamique grâce à des substitutions au niveau du cycle aromatique (Macheix *et al.*, 2005).

La figure se dessous illustre la structure des principaux acides hydroxycinnamiques (C6-C3) présents dans les plantes. Alors que les acides hydroxybenzoïques se présentent majoritairement sous forme libre, les acides hydroxycinnamiques peuvent exister sous une forme estérifiée par l'acide quinique (figure 04) (Collin et Crouzet, 2011).




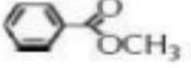







**Figure 05:** structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques (C6-C3)

(Macheix *et al.*, 2005).

### I.1.2. Les composés phénoliques complexes

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (Aguilera-Carbo *et al.*, 2008). Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (Linden et Lorient, 1994).

**Tableau 02 :** Les principales classes de composés phénoliques (Crozier, 1997)

Nombre de C	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénones	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphénylacétique	
9	C6-C3	Acide hydroxycinnamique	Acide coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

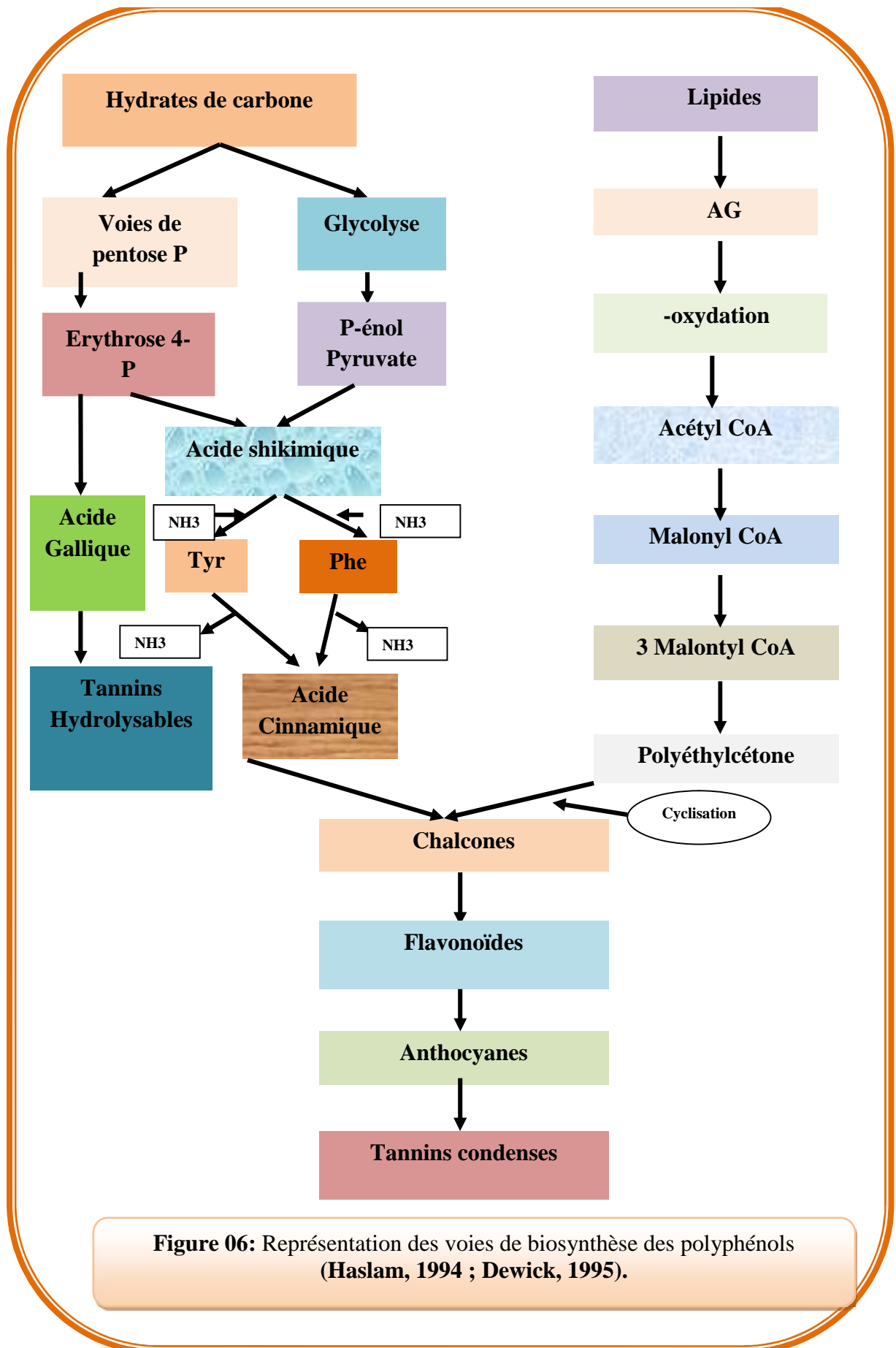
## I.2. Biosynthèse

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales (Figure 17) qui sont :

**2.1. La voie shikimate :** La voie shikimate responsable de la synthèse des acides aminés Phe et Tyr (**Achat, 2013**). Dans cette voie, l'érythrose-4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés (**Haslam, 1994**) Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (**Crozier et al., 2006**).

**I.2.2. La voie polyacétat :** 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 (**Fleeger et al., 1964; Richter, 1993**).

Cette biosynthèse a permis la constitution d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière (**Achat, 2013**).



**Figure 06:** Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (Haslam, 1994 ; Dewick, 1995).

### I.3. Intérêt des polyphénols

#### I.3.1. Rôle physiologique

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques ; croissance cellulaires, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison (**Alibert *et al.*, 1977**).

Les composés phénoliques peuvent constituer entre les plantes des signaux de reconnaissance, ou bien lui donnant une résistance aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes, et ils sont également assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (**Macheix *et al.*, 2005**).

#### I.3.2. Rôle technologique

Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. Certains composés phénoliques participent à la coloration des fruits murs, ils donnent aux fruits et légumes leurs coloration rouge ou bleuté (**Lugasi *et al.*, 2003**).

#### I.3.3. Rôle nutritionnel et thérapeutique

Les polyphénols jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments, certains d'entre eux ont des propriétés vitaminiques utilisées par l'industrie pharmaceutique. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments.

Les composés polyphénoliques sont utilisés en thérapeutique, ces derniers participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires .Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydant du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des LDL, qui est le facteur de l'athérosclérose. (**Hadi, 2004**) où ces composés inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribuent à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus. (**Manallah, 2012**) D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (**Macheix *et al.*, 2005**).

## I.4 .Activités biologiques des polyphénols

### I.4.1. Activités antioxydantes

Actuellement, les études portant sur les polyphénols connaissent un grand essor. Une grande partie d'entre elles a été effectuée afin d'informer et de sensibiliser les consommateurs et les pouvoirs publics sur l'intérêt des fruits et légumes riches en polyphénols, antioxydants naturels aux forts potentiels antioxydants (**Bouayed et al., 2008**).

La capacité antioxydant est le principal rôle physiologique attribué aux polyphénols (**Navarro et al., 2008**).

Au sens large, un antioxydant c'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres (**Halliwell, 1990**). L'action antioxydant d'un composé phénolique peut être issue d'une combinaison d'évènements chimiques, dont l'inhibition enzymatique, la chélation de métaux ou encore la donation d'hydrogène et l'oxydation en un radical stable (**Parr et Bolwell, 2000**).

Les polyphénols peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde, radical hydroxyle OH) pour produire des radicaux phénoxy stables. Ils peuvent aussi agir comme des antioxydants grâce à leur capacité à complexer les ions métalliques. Malheureusement, certains polyphénols ont également une action pro-oxydante par transfert d'électrons à des ions métalliques (**Collin et Crouzet, 2011**).

### I.4.2. Activités antimicrobienne

Les polyphénols sont des composés principaux antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action diverses et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'une grande catégorie de microorganismes procaryotes et eucaryotes (bactéries et champignons) (**Cowan, 1999**).

### I.4.3. Activité antibactérienne

Les flavonoïdes parmi les polyphénols antibactériens, qui bloquent la synthèse des acides nucléiques d'*Escherichia coli*. Ils ont un pouvoir inhibiteur sur les différentes fonctions de la membrane cytoplasmique en réduisant la fluidité de la couche interne et externe. (**Jones et al., 1994**).

#### I.4.4. Activité antifongique

La majorité des polyphénols ont une activité antifongique très puissante. **Orturno (2005)** a démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones de *Citrus parasidi*, et de *Citrus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. Aussi, les flavonoïdes de *Conyza aegyptica L.* ont une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida zeylanoïdes* (**Batawita, 2002**).

## II. Les composées phénoliques des margines

Les composés phénoliques des margines sont très divers. Ils résultent 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 inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée remarquée dans les margines (**Ranalli, 1991**)

### II.1. Monomères aromatiques

**Tableau 03** : les principaux monomères aromatiques (**Balice et Cera ,1984 ; Vazequez et al., 1974 ; Wagner et al., 1984**)

Acides phénoliques	Alcools phénoliques	Autres composés phénoliques
Acide caféique (trans et cis)	4-hydroxyphényl alcool	L-caféyl- glucose
acide p-coumarique	3,4-dihydroxyphényl	tirosol
acide protocatéchuique,	éthanol	hydroxytirosol
acide vanillique		apéginine
Acide 4-hydroxyphénylacétique		lutéoline
acide protocatéchuique		oleuropéine
acide syringique		
acide p-hydroxybenzoïques		
Acide p-hydroxyphénylacétique		
acide vétratrique		
Triméthoxybenzoïque		
acide syringique		
acide caféique		

## II.2. Les polymères phénoliques

Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement les anthocyanes et les tanins dont la concentration peut atteindre 12 g/l. Les tanins sont des polyphénols dont les structures sont complexes, conventionnellement classés en tanins hydrolysables et tanins condensés.

Concernant la lignine, aucun auteur n'a cité la présence de ce polymère dans les margines. **(Hamdi, 1991)**

## II.3. Activités biologiques des composés phénoliques des margines

L'extraction des composés phénoliques biologiquement actifs à partir des margines (biophénols) constitue une alternative viable pour valoriser cet effluent problématique **(Obied et al., 2009)**. En effet, les biophénols des margines exercent des activités à fort potentiel biologique à savoir des activités anti-inflammatoire, antioxydantes, antiagrégants et antimicrobiennes **(De Marco et al., 2007)**.

### II.3.1. Effets contre le vieillissement

Dans ce cadre, il a été démontré que l'hydroxytyrosol améliore la fonction mitochondriale grâce à l'activation des complexes de chaîne respiratoire mitochondriale et l'augmentation de la biogénèse mitochondriale en induisant l'expression du facteur PGC-1 (peroxisome proliferator activator receptor coactivator -1) ; facteur de régulation co-transcriptionnelle du métabolisme énergétique cellulaire qui est inclus dans la biogénèse mitochondriale **(Raederstoff et al., 2010)**.

### II.3.2. Effets contre SIDA

L'euloropéine et l'hydroxytyrosol sont des agents utiles pour inhiber la fusion et l'intégration du VIH dans les cellules humaines et ralentit la multiplication virale **(Lee-Huang et al., 2003)**.

### II.3.3. Effets contre l'athérosclérose

L'hydroxytyrosol joue un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose en empêchant la peroxydation des lipides et inhibe l'activité de HMG COA réductase (hydroxy-méthylglutaryl-coenzyme A réductase) ; enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol qui constitue un facteur de risque de l'athérosclérose **(Benlemlih et Ghanam, 2012)**.

#### II.3.4. Effets anticancéreux

L'hydroxytyrosol et les autres polyphénols d'olive exercent des effets anticancéreux par l'activation des voies de signalisation moléculaire, conduisant à l'induction de la mort ou à l'arrêt de la croissance de plusieurs lignées de cellules tumorales in vitro (**Bouallagui et al., 2011**)

#### II.3.5. Effets antioxydants

Les composés phénoliques peuvent agir comme des antioxydants de différentes manières. L'activité antioxydant la plus importante est liée à la capacité antiradicalaire, en brisant la chaîne des réactions déclenchées par les radicaux libres (**Benlemlih et Ghanam, 2012**).

L'activité antioxydante d'hydroxytyrosol et de l'oleuropéine a été étudiée dans des nombreux modèles expérimentaux avec utilisation de métaux de transition ; l'oxydation des LDL induite chimiquement ; la formation des ROS, par exemple le radicale superoxyde, le radicale trichlorométhylperoxylique et l'acide hypochloreux. En estimant l'activité antioxydant de ces composés phénoliques sur la base de leur capacité à inhiber la formation des peroxydes, il a été démontré que l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine ont une plus grande activité antiradicalaire (**Peynet et al., 2005**).

*Matériel*  
*et*  
*Méthodes*

## Objectif

Notre travail a pour objectif de faire une étude phytochimique des margines issues de l'extraction d'huile d'olives dans la région de Baghai Wilaya de Khenchela.

## 1. Matériel

### 1.1. Echantillonnage

Les margines ayant fait l'objet de notre étude, proviennent d'une huilerie moderne nommée (Al hadja Yamina) située dans la wilaya de Khenchela (la commune de Baghai). L'échantillonnage a été effectué durant la campagne oléicole 2017-2018. Les échantillons ont été prélevés dans des flacons en verre de 1 litre, fermés hermétiquement sans laisser de bulles d'air dans le flacon. Ensuite, conservés dans un frigo à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Les analyses de notre étude ont été réalisées au niveau du Campus des Laboratoires Pédagogiques, Université de Khenchela, sauf les analyses chromatographiques ont été faites au niveau du laboratoire central de l'Institut des Régions Arides (IRA) à Médenine – Tunisie-.

**Tableau 04** : Les caractéristiques des margines étudiées  
(Huilerie de l'Al hadja Yamina, 2017)

<b>Région</b>	<b>Khenchela</b>
<b>Superficie</b>	5 000 ha
<b>Production d'olives</b>	35 000 q / an
<b>Commune</b>	Baghai
<b>Date</b>	Décembre 2017
<b>Variété</b>	<i>Chemlal</i>
<b>Système</b>	Continu



**Photographie 01** : Fruits d'olives de la variété *Chemlal* (Merah, 2016)

## 1.2. Réactifs chimiques et instruments

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits : acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ), HCl, acide acétique, NaOH,  $NH_4OH$ , KI,  $I_2$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $AlCl_3$ , acétate d'éthyle, acide gallique, chloroforme, hexane, méthanol proviennent tous de Sigma- Aldrich.

Parmi l'appareillage utilisé: Rotavapeur (**HAHNVAPOR**), Spectrophotomètre (**UNICO**), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (**VILBER COURMAT**), Bain Marie (**MEMMERT**), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (**MEMMERT**), Agitateur magnétique (**HOTPLAT STIRRER**), Vortex (**VELP**) et Balance analytique (**ADVENTURER**), Balance (**KERN**), conductimètre (**CONSIRT**), PH mètre (**HANNA INSTRUMENTS**), Centrifugeuse (**SIGMA**) Digesteur d'azote (**VELP**), Four à moufle « 30-3000C° » (**NABERTHERM**), CPG de type «GCMS-QP2010 Ultr», HPLC de type (HPLC-MS).

## 2. Méthodes

### 2.1. Caractérisation physicochimique des margines

La caractérisation physico-chimique a été basée sur l'étude des paramètres suivants : la conductivité, la salinité, le pH, l'humidité, la matière sèche, solides totaux suspendu, matière organique et minérale, teneur en sucres totaux, teneur en azote.

#### 2.1.1. Mesure de pH, conductivité électrique, et salinité

A l'aide d'un multi-paramètre du paillasse, on détermine la conductivité électrique (CE), la salinité, et le pH des échantillons en plongeant l'électrode de mesure dans un bécher contenant 30 ml de margines fraîches et on note la valeur (Photographie 02). La

conductivité est exprimée en mS /cm en prenant compte de la température de mesure (Rodier *et al.*, 2009).



**Photographie 02 :** La détermination de pH et de la Conductivité électrique (CE)

### 2.1.2. Détermination de l'humidité et de la matière sèche

Les teneurs en matière sèche (MS) et en eau (H) sont déterminées par l'évaporation de 10 ml des margines dans un creuset en porcelaine (Photographie 03) à 105°C pendant 24 heures (Hamdi, 1991). Les mesures sont calculées par les formules suivantes :

$$MS (g/l) = ((M - M0) / V) \times 100$$

$$H (\%) = ((M1 - M) / (M1 - M0)) \times 100$$

**M0** : masse du creuset vide en g.

**M1** : masse du creuset et de margines avant séchage en g.

**M** : masse du creuset et de margines après séchage en g.

**V** : volume de la prise d'essai en ml.



**Photographie 03 :** Détermination de la matière sèche.

### 2.1.3. Solide total en suspension

Les solides totaux suspendu (STS ) sont obtenue par centrifugation des margines fraiches à 4000g durant 15 min le résidu solide est séché une nuit à 105C° (Photographie 04) (Assas *et al.*, 2000)



**Photographie 04** : Détermination des solides totaux suspendus

### 2.1.4. Teneur en azote total

Le dosage de l'azote a été effectué par la méthode de kjeldahl (standard méthode of examination of water and wastewater, 1992) avec quelques modifications. Introduire 5 ml de margine avec du catalyseur ( $\text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$ ) et un peu du sélénium dans un matras. Ajouter 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et 10 ml d'eau oxygénée 30 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) comme anti-moussant. Placer quelques billes de verre comme antichoc. Chauffer à une température de 100C° quelques temps pour éviter le débordement de la mousse et continuer à chauffer jusqu'à sa disparition et la carbonisation du contenu. Ensuite augmenter la température de minéralisation à 400C° jusqu'à l'apparition d'une coloration verte claire et limpide, pour suivre le chauffage pendant 30 min puis laisser refroidir.

La distillation est faite à l'aide de la soude (32 ) et de l'eau distillée dans un appareil de distillation automatique .L'ammoniac distillé a été piégé dans un erlenmeyer contenant 20 ml d'acide borique 4 puis titré rapidement à l'aide de l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (N50) jusqu'au pH initial de l'acide borique (Photographie 05).

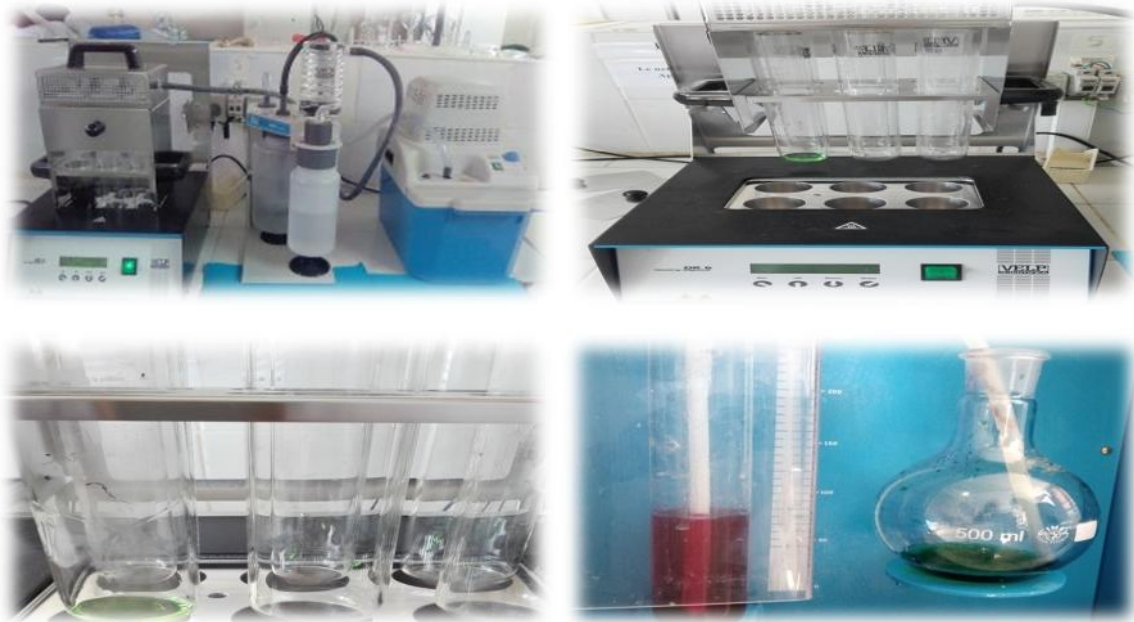
Le taux d'azote a été calculé selon la formule suivante :

$$N2(g) = (V1 \times 0.014 \times 100 \times N) / V_0$$

**N** : la normalité de la solution d'acide sulfurique.

**V<sub>0</sub>** : volume de l'échantillon en ml (5ml).

**V<sub>1</sub>** : volume en ml de la solution d'acide sulfurique utilisée pour le titrage.



**Photographie 05** : La détermination de la matière azotée

### **2.1.5. Détermination de la matière organique et minérale**

Les cendres (matières minérales) sont déterminées par incinération d'un gramme d'échantillon sec dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures (AOAC, 1990). La matière organique correspond à la différence entre la prise d'essai et les cendres qui en résultent (Photographie 06).



**Photographie 06** : Détermination des cendres dans un four à moufle

### 2.1.6. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés par spectrophotométrie, selon la méthode de **Dubois et al. (1956)**. 1 ml de margines est mélangé à 1 ml d'une solution phénolique (5%) et 3ml d'acide sulfurique concentré (97%). Après agitation, les tubes sont conservés à l'obscurité pendant 10 min puis transférés dans un bain marie à 30 °C pendant 30 min. Les sucres réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orange. La densité optique est mesurée à 488 nm. Les valeurs obtenues sont traduites en concentration par référence à un courbe étalon de D-glucose préalablement établie (Figure 07).

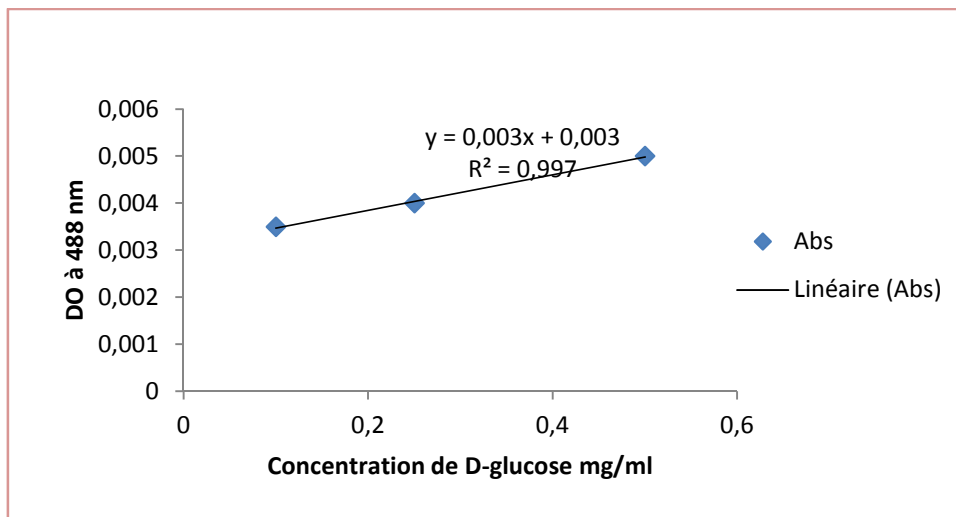


Figure 07 : Droite d'étalonnage de D-glucose

## 2. 2.Etude phytochimique des margines

### 2.2.1. Screening phytochimique

L'un des buts essentiels d'un test phytochimique consiste dans la détection des différentes familles de métabolites secondaires existant les margines par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ainsi que des examens en lumière ultraviolette (**Hagerman et al., 2000**).

Dans notre étude expérimental nous avons utilisé les techniques standards décrites par **Terease et Evans (1989)**; **Harborne (1998)** et **Bruneton (1999)**.

### **2.2.1. 1. Les flavonoïdes**

10g de margine est t'ajouté à 150 ml d' HCl dilué à 1 pendant 24h, filtre et procéder au teste suivant : 10ml du filtrat, le rendu basique par l'ajout du NH<sub>4</sub>OH. Un test positif est révélé par l'ajout d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai.

### **2.2.1.2. Les coumarines**

Introduire 5ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH à 10 , mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

### **2.2.1.3. Alcaloïdes**

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitations avec les réactifs de Mayer et Wagner. 1ml de chaque extrait (1g de margine +50ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 10 . Après agitation pendant 30 min macérer quelques heures puis filtrer et compléter à 50 ml avec l'eau distillée) est divisé en deux volumes égaux. Un volume est traité par 0,5 ml de réactif de Mayer, l'autre par 0,5 ml de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence des alcaloïdes.

### **2.2.1.4. Terpénoïdes**

5ml d'extrait est ajouté à 2ml de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et 3ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des Terpénoïdes.

### **2.2.1.5. Les saponines : Test de la mousse**

Dans un tube à essai, introduire 10ml d'extrait à tester et agité pendant quelque secondes puis laissé au repos pendant 15min. Une hauteur de mousse persistante indique la présence des saponines.

### **2.2.1.6. Les composés réducteurs**

Introduire 1ml d'extrait dans un tube à essai, ajouter 2ml de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B), incuber l'ensemble pendant 8min dans un bain marie bouillants. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

### **2.2.3. Extraction des composés phénoliques**

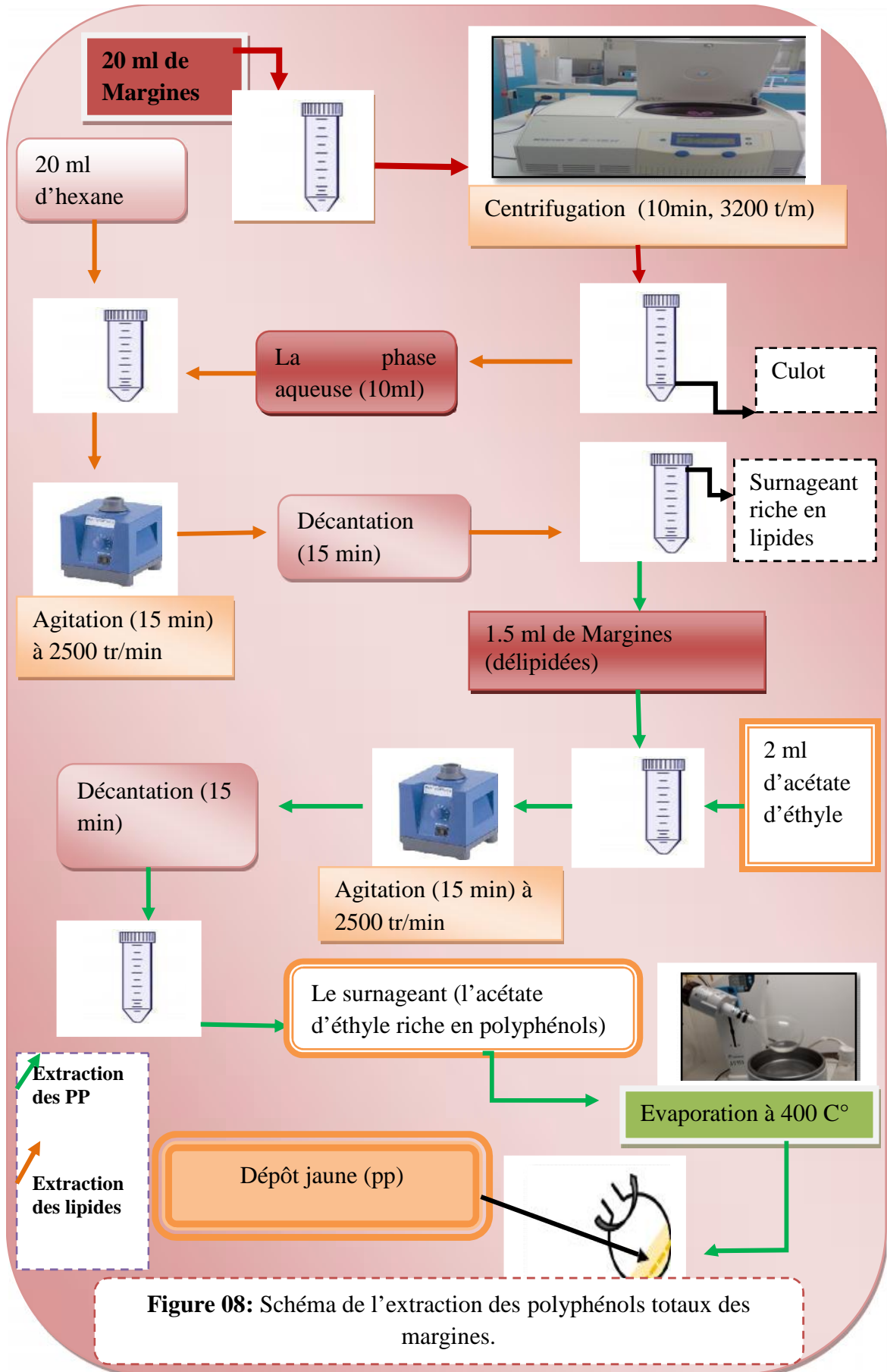
Les composés phénoliques contenus dans les margines sont déterminés en utilisant de l'acétate d'éthyle (Visioli et *al.*, 1999 ; De Marco et *al.*, 2007). Les margines doivent, au préalable, subir un prétraitement par l'hexane pour éliminer les lipides.

#### **2.2.3.1. Délipidation des margines**

20 ml de margines sont centrifugées pendant 10 min à 3200 g. Deux phases sont obtenues : une phase aqueuse et un culot précipité. 10 ml de la partie aqueuse sont ajoutées à 20 ml d'hexane (nécessaire pour se débarrasser de la matière grasse des margines). La solution est mélangée pendant 3 min. Après 15 min, les margines sont recueillies après séparation complète à l'aide d'une ampoule à décanter en deux phases : l'hexane (surnageant) et les margines délipidées (culot) prêtes à une extraction liquide-liquide (Figure 08).

#### **2.2.3.2. Extraction par l'acétate d'éthyle**

2ml de margines délipidées est mélangé à 1,5ml d'acétate d'éthyle, l'ensemble est homogénéisé à l'aide d'un mixer électrique (Ultra-Turax) pendant 3 min à une vitesse de 13.500 tr/min. Après 15 min, le mélange est complètement séparé en deux phases : l'acétate d'éthyle riche en polyphénols (surnageant) et les margines (culot) (figure08).

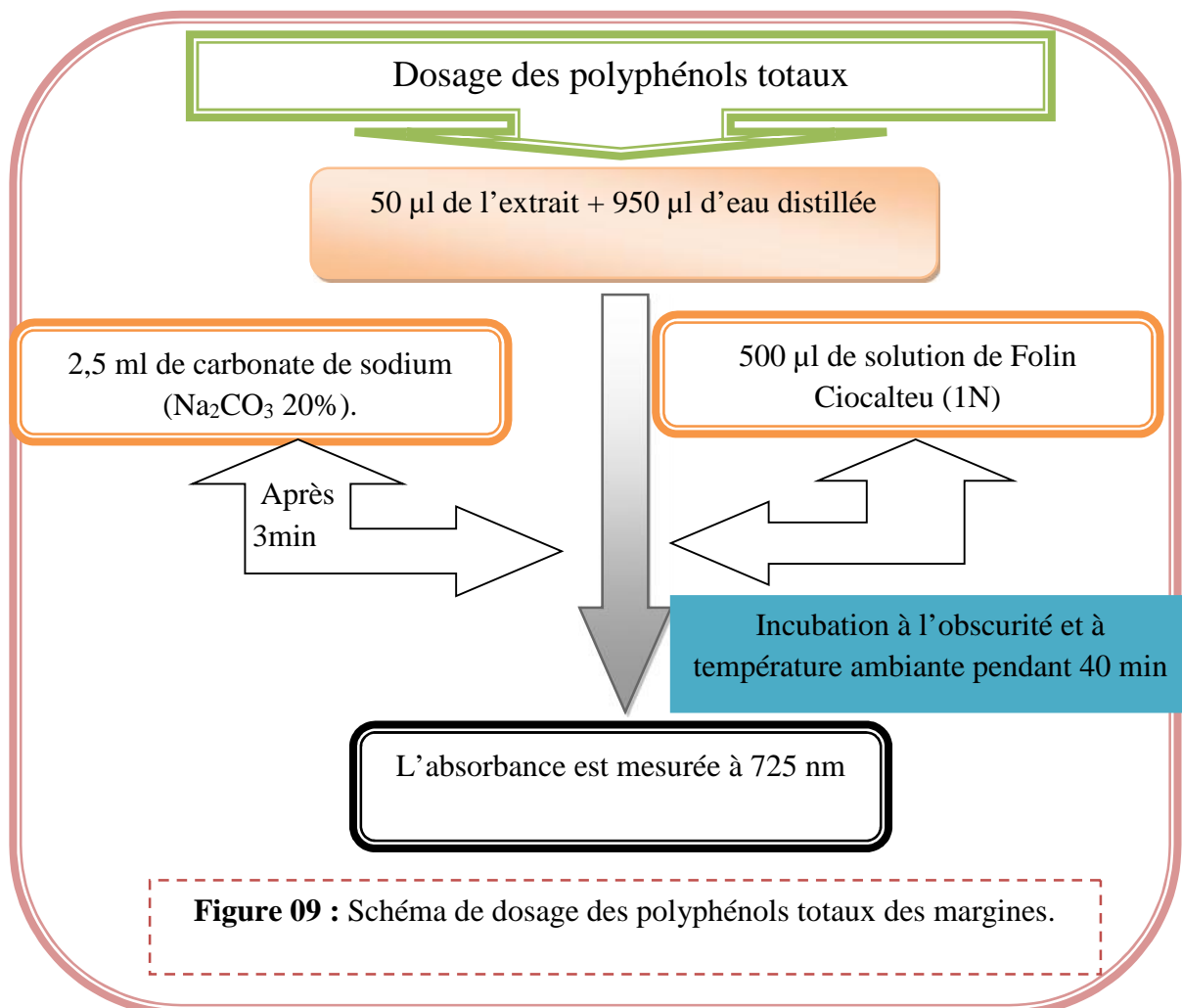


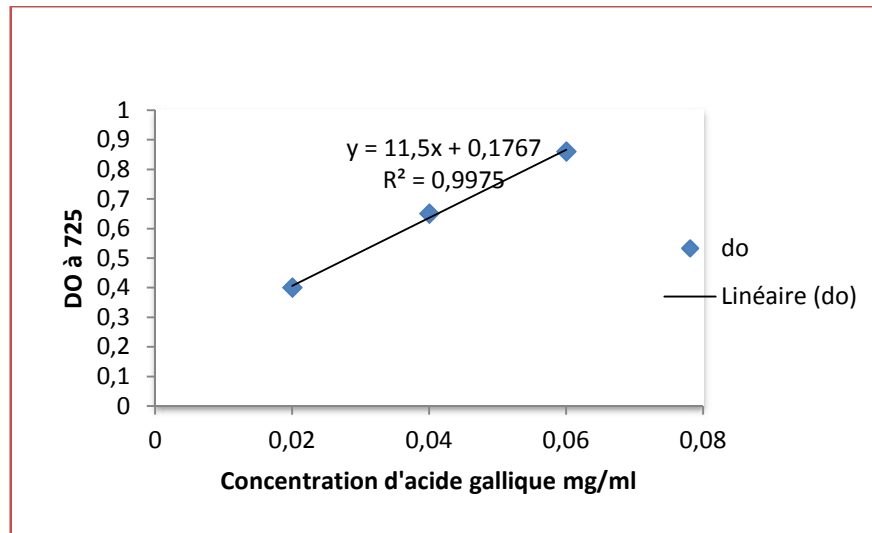
**Figure 08:** Schéma de l'extraction des polyphénols totaux des margines.

### 2.2.3.3. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols sont dosés par la technique colorimétrique de Folin ciocalteu (Makkar *et al.*, 1993). Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et phosphomolibdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>), (Macheix *et al.*, 1990). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 725 nm.

Un aliquote de 50 µl de l'extrait phénolique est mélangé à : 950 µl d'eau distillée, 500 µl de solution de Folin Ciocalteu (1N) et 2,5 ml de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%). L'apparition d'une couleur bleue après incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant 40 min. L'absorbance est mesurée à 725 nm (Figure 09). La gamme d'étalonnage ai été préparé, en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0.02 à 0.06 mg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage (Figure 10).

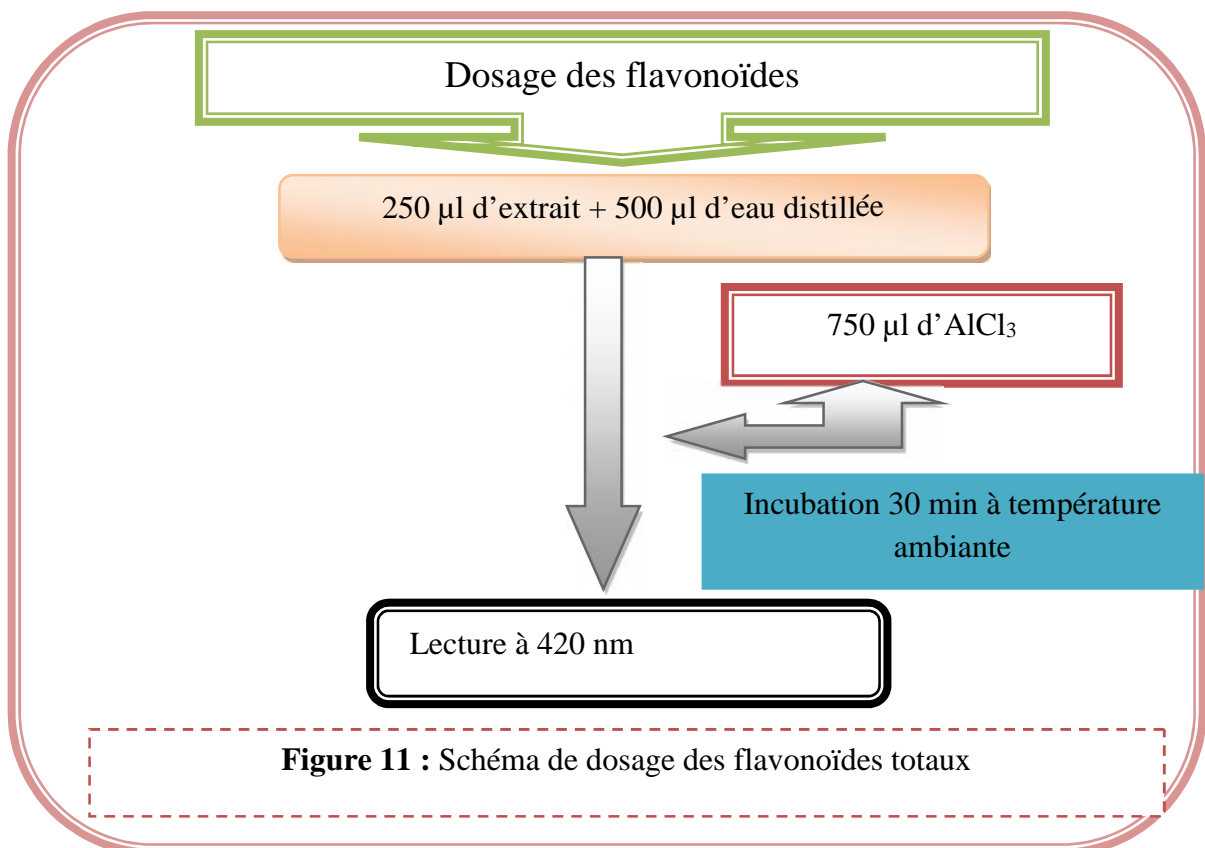




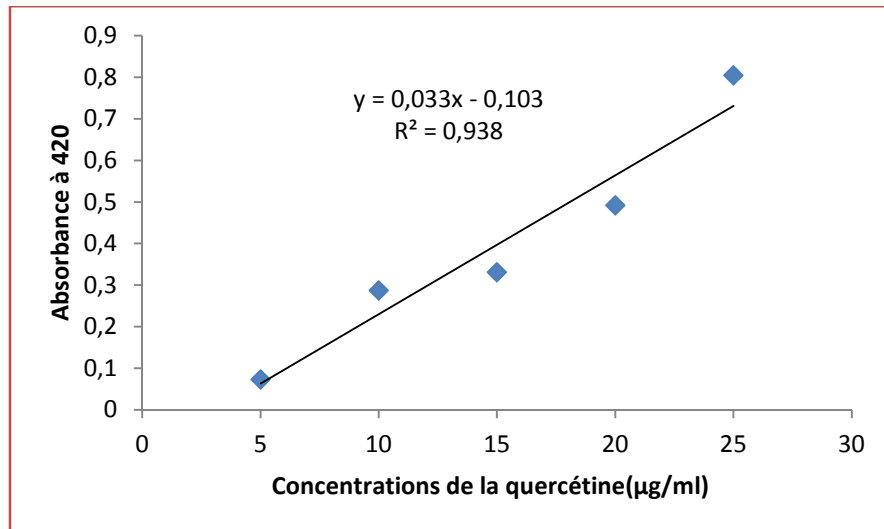
**Figure 10 :** Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

#### 2.2.3.4. Dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de trichlorure d'Aluminium

Les flavonoïdes totaux sont déterminés par le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ , 2%) selon le procédé décrit par **Ayoola et al. (2008)**. Il consiste à mélanger 250  $\mu\text{l}$  d'extrait phénolique dilué dans 500  $\mu\text{l}$  d'eau distillée, l'ensemble est mélangé avec 750  $\mu\text{l}$  d' $\text{AlCl}_3$ . Les densités optiques (DO) sont lues à 420 nm (Figure 11) et les concentrations sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage de quercétine (Figure 12).



**Figure 11 :** Schéma de dosage des flavonoïdes totaux



**Figure 12 :** Droite d'étalonnage de la quercétine

#### 2.2.4. Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse

##### Principe

La chromatographie phase gazeuse est une méthode d'analyse physico-chimique par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Cette technique permet l'analyse de mélanges éventuellement très complexes de nature et de volatilité très diverses.

Le corps gras est estérifié en présence de méthanol, les esters méthyliques d'acides gras sont séparés sur une colonne polaire en fonction de leurs poids moléculaire. La surface correspondant à chacun d'eux est calculée et rapportée à la surface totale des différents acides gras pour obtenir un pourcentage (Mbourmad, 2011)

##### Mode opératoire

La méthylation a été faite selon la méthode décrite par Patumi et al. (2003). La phase hexanique contenant les acides gras méthylés est séparée puis analysée par chromatographie phase gazeuse (CPG), selon les conditions opératoires suivantes :

**Tableau 05** : les conditions opératoires des dosages des acides gras par GC-MS

<b>Conditions opératoires pour les esters méthyliques des margines</b>	
<b>Type de CPG</b>	GCMS-QP2010 Ultra
<b>Mode d'injection</b>	Splitless
<b>Colonne capillaire Longueur diamtre intétieur</b>	30m x 0,25mm
<b>Epaisseur</b>	0,25µm
<b>Gaz vecteur</b>	-
<b>Température de l'injecteur</b>	250 ° C
<b>Température de Four</b>	100.0 ° C
<b>Débit total</b>	13,0 ml / min
<b>Débit de la colonne</b>	4,99 ml / min
<b>Vitesse linéaire</b>	83,1 cm / sec

### 2.2.5. Analyses des phénols et flavonoïdes par HPLC-MS

#### Principe

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange. Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide, grâce à la répartition sélective des solutés, entre la phase mobile et la phase stationnaire (**Gwenola et Jean-Louis, 2002**). Le mélange à analyser est injecté, puis transporté à travers le système chromatographique à une sous de la pression élevée à travers une colonne. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité, il interagit entre les deux phases à des vitesses différentes (**Francis et Annick, 2004**).

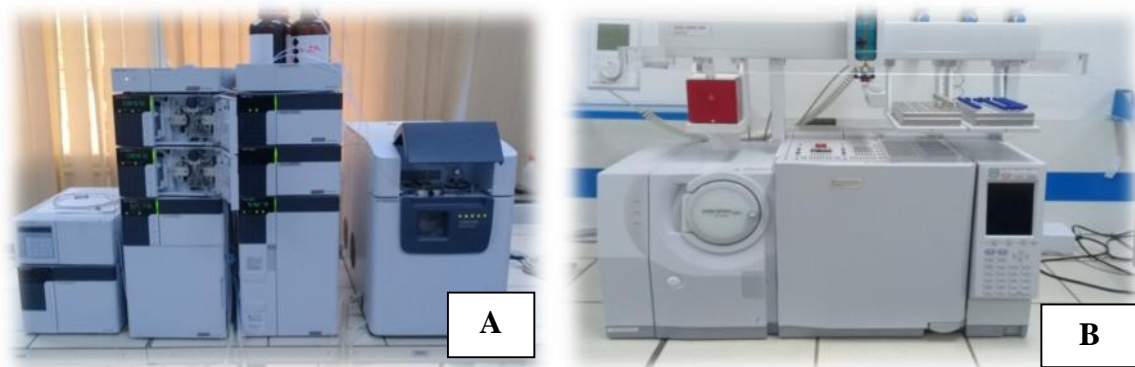
#### Mode opératoire

Margines doivent, au préalable, subir un prétraitement par l'hexane pour éliminer les lipides (Délipidation) et ensuite à une extraction à l'acétate d'éthyle selon les étapes mentionnées précédemment.

L'identification des composés phénoliques des margines par HPLC-MS selon les conditions opératoires suivantes :

**Tableau 06** : les conditions opératoires des analyses des polyphénols par HPLC-MS

<b>Conditions opératoires</b>	
<b>Les pompes utilisées</b>	Pompe A : LC-20ADXR Pompe B : LC-20ADXR
<b>Modèle d'échantillonneur automatique</b>	SIL-20AXR
<b>Modèle de four</b>	CTO-20AC
<b>Température du four</b>	40 C
<b>Nom de la colonne</b>	DiscoVery BIO Wide Pore C18-5
<b>Longueur de la colonne</b>	250 mm
<b>Diamètre intérieur</b>	4,0 mm
<b>Débit total</b>	0,4000 ml / min



**Photographie 07** : Appareillage des chromatographies.

(A) chromatographie phase gazeuse (CPG-MS), (B) chromatographie liquide à haute performance (HPLC-MS).

*Résultats*  
*et*  
*discussions*

## 1. Caractérisation des margines

Les principaux résultats physico-chimiques des margines étudiés sont consignés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 07** : Caractéristiques physico-chimiques des margines étudiées.

Paramètres	Echantillon
Couleur	Vert
pH	4,46
CE (mS/cm)	4,76
Salinité	2,8
MS (g /l)	4 ,9
H (%)	95
STS	0,90
MO(%)	98
MM(%)	2
Teneur en azote (g/l)	0,30
ST (mg/ml)	0,36
PT (mg/ml)	0,055

MS : matière sèche, MO : matière organique, MM : matière minérale, ST : Sucres totaux

H : humidité, STS : solide total en suspension, ST : Sucres totaux, PT : phénols totaux.

### 1.1. Le potentiel hydrique (pH)

Le tableau 04 montre que les margines sont des effluents acides (pH= 4,46), en raison de la présence des acides organiques (acides phénolique, acides gras). En effet, cette valeur est comparable avec ceux de la littérature (pH= 4,2 - 5,9) (Assas *et al.*, 2002), et à celles enregistrées dans plusieurs travaux (Mbourmad, 2002 ; Benyahia et Zein, 2003; Ghomari, 2015). Le degré d'acidité des margines augmente avec la durée de leur stockage, Ceci peut favoriser les réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques, ce qui induit une modification de leur coloration initiale vers un noir très sombre (Eroglu *et al.*, 2008).

### 1.2. La conductivité électrique et la salinité

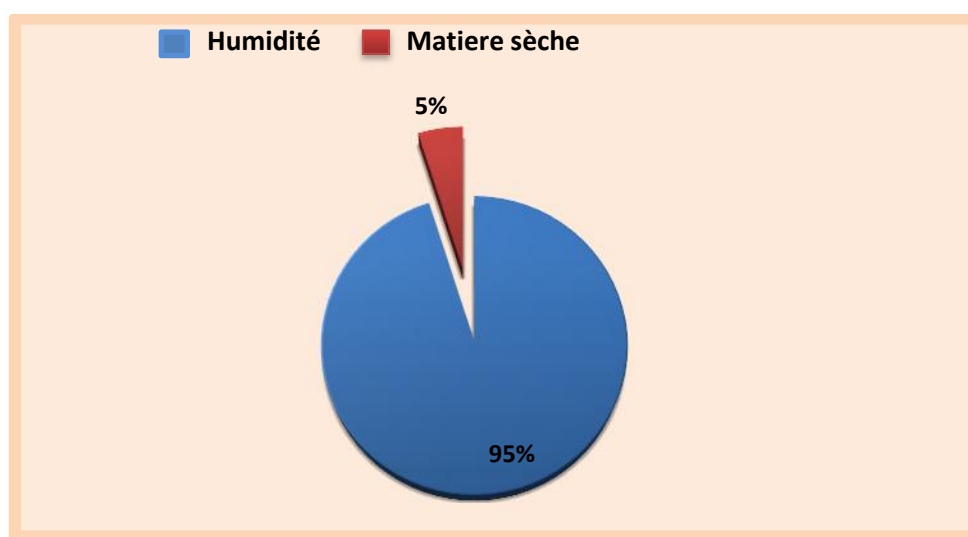
Les margines étudiées ont une conductivité électrique moyenne de l'ordre de (4,76 mS.cm<sup>-1</sup>) et une salinité de (2,8), due principalement à la présence des ions potassium,

chlorures, calcium et magnésium (Benyahia et Zein, 2003). Ces valeurs reflètent la teneur en sels présents dans ces effluents. En effet, en plus de la richesse naturelle en sels minéraux, les olives sont conservées avant leur trituration dans le sel commercial, ce qui confère aux margines cette conductivité électrique (Ghomari, 2015)

Des échantillons de margines provenant de la même région ont donné une conductivité électrique égale à 5,30 mS/cm durant la campagne oléicole 2015-2016 (Salhi et Hamoudi, 2016), et d'autres issus d'un système provenant des huileries traditionnelles (système discontinu) ont présenté une conductivité électrique relativement élevée (14,25 et 18,1 mS/cm) (Salhi et Hamoudi, 2016). Ces résultats confirment l'influence du système d'extraction sur la qualité des margines qui en résultent. Le degré de maturation des olives durant leur trituration affecte également la minéralisation des margines (Benyahia et Zein, 2003 ; Hanafi *et al.*, 2009).

### 1.3. L'humidité et la matière sèche

Les résultats des taux d'humidité et de la matière sèche des margines étudiés sont présentés dans la figure ci-dessous



**Figure 10:** Les teneurs en humidité et en matière sèche des échantillons de margines étudiés.

Au regard des résultats obtenus, les teneurs des échantillons en matière sèche sont de l'ordre de 4,9 g/l. Ces valeurs sont comparables à celles enregistrées dans plusieurs travaux (Linden et Lorient, 1994 ; Salhi et Hamoudi, 2016). Cette matière résulte principalement des différents débris solides de la trituration (grignons, membranes des pulpes d'olives). Les taux d'humidité élevés des margines (95%) peuvent s'expliquer par

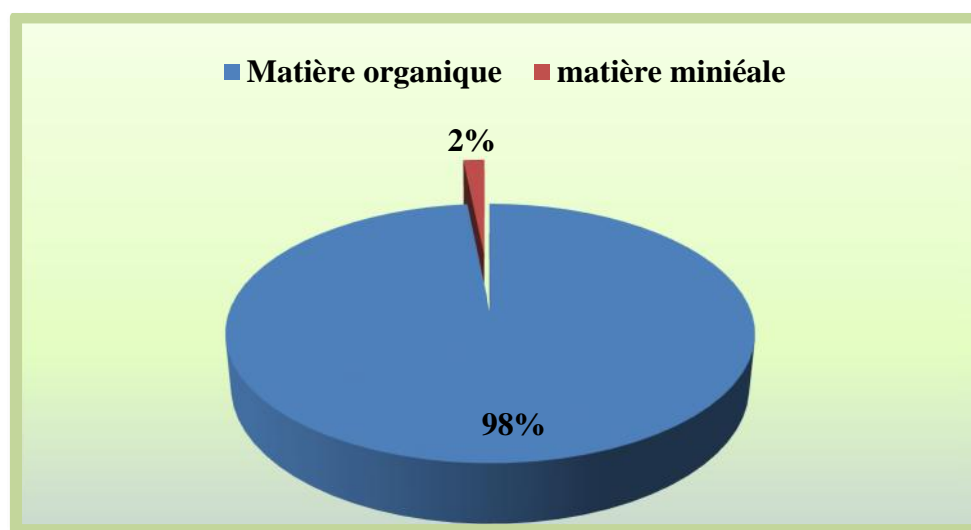
l'eau existant habituellement dans les olives d'une part et d'autre part par l'eau ajoutée au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive (Leunmi, 2012).

### 1.4. Solide total en suspension

Le solide total en suspension est beaucoup plus important dans notre margines (0,90%), cette valeur se situe dans l'intervalle [0,04 et 1,04%], cité par **Dannibale et al. (2003)**, Ce résultat est corroboré à celui observé par **Mbourmad (2002)**.

### 1.5. Matière organique et minérale

Les résultats des matières organique et minérale des margines étudiés sont présentés dans la figure ci-dessous :



**Figure 11** : Les teneurs en matières organique et minérale des échantillons de margines étudiés.

Il s'avère clairement que notre margine indique une teneur plus élevée en matières organiques (98 %). Cette valeur est due à la présence d'une fraction insoluble qui représente les matières en suspension et colloïdales et une fraction soluble qui représente les sucres, les lipides, les acides organiques, et les composés phénoliques (**Hamdi, 1991**). En effet, notre valeur est supérieure à celle rapportée par plusieurs auteurs qui notent des valeurs de 78,57 et 90% (**Aissam, 2003 ; Hachicha et al., 2008**), et comparable à celle notée dans le travail de **Leunmi (2012)** qui donne un taux de (98,01%).

La teneur des margines en matière minérale est de l'ordre de 2%. Elle est relativement faible par rapport à celle citée par **Hachicha et al. (2008)** qui indiquent un taux

relativement élevé (21,42%). Nos valeurs sont proches avec ceux trouvée par **Leunmi (2012)**.

### 1.6. Teneur en azote total

La teneur en azote total des margines est de l'ordre de 0,30 g/l. Elle est relativement faible par rapport à celle citée dans la littérature par **Lopez et Ramos-Cormenzana (1996)** (0,6 g/l), nos valeur est proche avec celles trouvées par **Mbourmad (2011)** et **Salhi et Hamoudi (2016)** (0,364 g/l).

### 1.7. Dosage des sucres totaux

La concentration en sucres totaux (ST) des margines étudiés est de l'ordre de 0,36 mg/ml. La teneur élevée obtenue a révélé une richesse des effluents oléicoles en sucres totaux, ce qui fait d'eux une excellente source énergétique. Nos résultats sont proches à ceux rapportés par **Leunmi (2011)**. Cette teneur élevée en ST obtenue dans notre étude pourrait être expliquée par l'état de fraîcheur de nos margines. En effet, le stockage des margines peut conduire à une diminution de leur teneur en sucres par leur dégradation en acides organiques (**Hamdi, 1992**). De nombreux travaux ont montré que les margines sont très riches en sucres simples (**Niaounakis et Halvdakis, 2004 ; Fezzni et Ben Cheikharticle, 2009**). Les sucres simples les plus fréquents dans les margines sont, en particulier, le raffinose, saccharose, l'arabinose, xylose, glucose, mannose et le fructose.

On conclure que la caractérisation physico-chimique des margines est généralement tributaire des techniques et des systèmes d'extraction de l'huile d'olives ; elle diffère d'un pays à l'autre (**Blika et al., 2009**). En général, les margines contiennent une variété de composés organiques et minéraux, de nature et de concentration très différentes.

## 2. Etude phytochimique

### 2.1. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques réalisés par le screening phytochimique nous ont permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires présents dans l'extrait étudiés par des réactions qualitatives de caractérisation (précipitation, coloration par des réactifs spécifiques, ou par un examen sous la lumière UV). Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 08** : Résultats des tests phytochimique sur les margines

Métabolites Secondaires	Réactions	Remarque	Résultats
<b>flavonoïdes</b>	NH <sub>4</sub> OH	Apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure	+++
<b>Coumarines</b>	Fluorescence UV	Apparition d'une fluorescence intense	++
<b>Terpénoïdes</b>	chloroforme (CHCl <sub>3</sub> ) L'acide sulfurique	Formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase	++
<b>Saponines</b>	Test de mousse	Pas de formation de mousse	-
<b>Composés réducteurs</b>	Liquueur de Fehling	La formation d'un précipité rouge-brique	+++
<b>Alcaloïdes</b>	Mayer Wagner	Apparition d'un précipité blanc Apparition d'un précipité brun	+ +

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : négatif

Le nombre de « + » est fonction de l'intensité de la coloration et / ou précipité.

Le screening phytochimique réalisé nous a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, les coumarines, composés réducteurs avec des quantités importante et en quantités moindres des alcaloïdes et des terpénoïdes. De même nous avons noté l'absence totale des saponines.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans les travaux de **Macheix et al. (2006)**, qui confirment la présence de quelques métabolites secondaires comme les flavonoïdes, et les travaux de **Bruneton (1999)**, qui ont en plus des flavonoïdes, ils ont mis en évidence les alcaloïdes, les composés réducteurs et coumarines.

De même, les résultats effectués par **Ghedira (2008)** confirment aussi l'existence des terpénoïdes. Tous les résultats confèrent à ces effluents de nombreuses activités biologiques tels que les activités antioxydantes, hypotensives, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes, anti inflammatoires, et antiseptiques (**Ghedira, 2008**).

### 2.2. Dosage des composés phénoliques

#### 2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les contenus phénoliques de nos margines ont été déterminés par la méthode de Folin-ciocalteu (**Makkar et al., 1993**). Le dosage par ce réactif fournit des informations directes sur le nombre des groupes hydroxyles et donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait (**Tawaha et al., 2007**).

Le taux de polyphénols a été déterminé par de nombreux chercheurs : des valeurs de 4g/l quantifiées par **Fki et al. (2005)** ; 7g/l trouvées par **Fezzani et Ben cheikh (2007)**, 9g/l par **Yaakoubi et al. (2010)**, 0,215g/l par **Moussaoui, (2007)** 0,89 g/l **Salhi et Hamoudi (2016)**. Ces valeurs sont plus élevées par rapport à celles enregistrées dans notre étude (0,05 mg EAG/ml E).

Au vu de ces données, le profil polyphénoliques des olives peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, le degré de maturation (l'olive vert possède plus de polyphénols que l'olive noire) (**Ryan et al., 1999; Benlarbi, 2004**), et le solvant d'extraction (**Sousa et al., 2008; Conde, et al., 2009**) dont l'acétate d'éthyle a été choisi pour l'extraction liquide-liquide et déclaré comme le solvant le plus fréquemment utilisé pour extraire le maximum des composés phénoliques contenus dans les margines (**Lesage-Meessen et al., 2001; Allouche et al., 2004**).

A l'issue de ces résultats concernant des teneurs en polyphénols, il ressort que les margines sont très riches en polyphénols ce qui fait d'eux une excellente source naturelle de composés bioactifs bénéfiques à la santé humaine.

#### 2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le contenus en flavonoïdes de nos margines ont été déterminés par la méthode de trichlorure d'Aluminium (**Ayoola et al., 2008**). Le taux de flavonoïdes est de l'ordre de [8,24µg EQ /ml E]. Elle est relativement faible par rapport à celle citée par **Abassetal, (2012)** (0.156 à 0.166 g EQ /L) et ceux citée par 0,1079 à 0,0472 g/l. Ceci confirme une

autre fois l'influence de la nature de l'échantillon et le système de trituration sur le profil phénoliques (Ryan *et al.*, 1999; Benlarbi, 2004).

### 3. Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse

La figure et le tableau présentés ci-dessous montrent une empreinte obtenue à partir de l'injection d'esters méthyliques d'un échantillon de margine dans le système chromatographique. Une première analyse visuelle permet de constater que le profil général du chromatogramme est différent. Le pic le plus intense est attribuable à l'acide oléique «Acide 9-octadecenoïque » (C18 : 1) qui constitue (64.726%) de l'aire totale du chromatogramme, suivi par celui de l'acide palmitique « Acide hexadecanoïque » (C16 : 0) qui représente (11.087%), et l'acide linoléique (C18 :2) « Acide 9,12-octadécadiénoïque ,méthyl ester, (E, E)-» et « Acide 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z)-, ester méthylique » (C18 : 2) qui représente respectivement (9.252% et 8.310%) et l'acide stéarique (C18 : 0) qui représente (4.728%),et l'acide 9-octadecenoïque(Z)-, méthyl ester et l'acide palmitoléique (C16 :1) « l'acide 9-hexadecenoïque, méthyl ester, (Z)-»,qui se distinguent respectivement par des pourcentages inférieures à celles rapportées précédemment (1.390 % et 0.506%). Toutes les valeurs des acides gras obtenues sont conformes à celles enregistrées le travail de Benabid (2009).

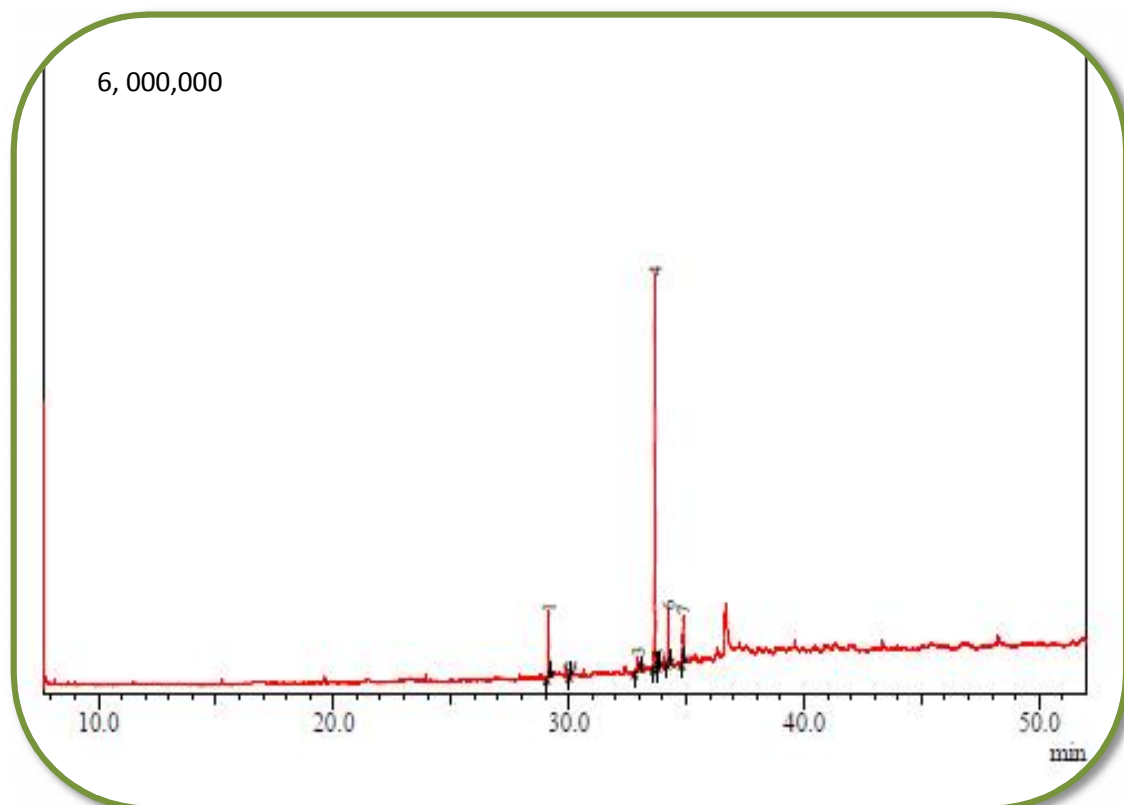


Figure : Type de chromatogramme des acides gras de margine

Tableau 09 : Identification des chromatogrammes des acides gras

Pic	Temps de Rétention	Aire	Aire %	Acides gras
1	29.148	975418	11.087	Acide hexadecanoïque, Ester de méthyle
2	30.057	44512	0.506	Acide 9-hexadecenoïque, méthyl ester, (Z)-
3	32.931	415958	4.728	Stéarate de méthyle
4	33.666	5694444	64.726	Acide 9-octadecenoïque, méthyl ester
5	33.821	122296	1.390	Acide 9-octadecenoïque(Z)-, méthyl ester
6	34.240	813979	9.252	Acide 9,12-octadécadiénoïque, méthyl ester, (E, E)-
7	34.866	731117	8.310	Acide 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z) -, ester méthylique
			100.000	

De plus, nous remarquons que les margines sont plus riches en acides gras monoinsaturés avec des pourcentages allant de 64%. Ces pourcentages sont comparables à ceux enregistrés dans le travail de **Fellahi (2008)** sur les huiles d'olive de la variété Chemlal où il a présenté un taux varié entre 66% -68% de l'acide oléique. Ainsi, on note également une prédominance nette d'acides gras insaturés par rapport aux acides gras saturés (l'acide palmitique et acides stéarique). D'après **Gutierrez et al. (1999)**, au cours de la maturation des olives, l'acide oléique est transformé en acide linoléique par l'enzyme « oléate désaturase », ça peut expliquer l'augmentation du pourcentage de l'acide linoléique par rapport aux autres acides gras polyinsaturés.

La composition en acides gras totaux est très variable et dépend de la variété, du climat et de la région de production, de l'année et la période de récolte ainsi que des techniques d'extraction et des conditions de stockage (**Zarrouk et al., 1996; Ait Yacine et al., 2002**). Comparée à d'autres extraits d'olive, l'huile d'olive est caractérisée par sa richesse en acides gras monoinsaturés et présente de faibles teneurs en acides gras saturés (**Ajana et al., 1998; Salas et al., 2000; Keceli et Gordon, 2001**).

#### 4. Analyses des composés phénoliques par HPLC-MS

L'analyse de la fraction phénolique par LC-MS d'extraits de margines montre une variation très importante en monomères phénoliques. Ceci confirme une autre fois l'influence de la nature de l'échantillon et le système de trituration sur les caractéristiques des margines (Ryan *et al.*, 1999; Benlarbi, 2004). La synthèse des résultats d'identification de ces composés phénoliques est représentée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 10** : Identification des chromatogrammes des composés phénoliques

Pic	Le nome de composant	Temps de Réention	Mz	Concentration	Unité
1	Acide quinique	2.089	191.00	0.0037	Ppm
2	Acide gallique	-	169.00	N.D. (pic)	
3	Acide protocatéchuique	6.344	153.00	2.497	Ppm
4	Catéchine	-	289.00	N.D. (pic)	
5	L'acide chlorogénique	-	353.00	N.D. (pic)	
6	4-O-caffeoylquinique	11.307	353.00	0.008	Ppm
7	Acide caféique	14.284	179.00	0.351	Ppm
8	Acide syringique	15.879	197.00	0.000	Ppm
9	Acide 1,3-di-o-caffeoylquinique	-	515.00	N.D. (pic)	
10	Epicatéchine	-	289.00	N.D. (pic)	
11	Acide p-coumarique	20.737	163.00	0.798	Ppm
12	Acide trans-férulique	22.879	193.00	0.054	Ppm
13	Hyperoside (quercétine-3-o-galactoside)	24.488	463.00	0.002	Ppm
14	Rutine	23.811	609.00	0.007	Ppm

15	Acide o-coumarique	26.066	163.00	0.011	Ppm
16	Lutéoline-7-o-glucoside	24.446	447.00	0.073	Ppm
17	Acide 3,4-di-o-caffeoylquinique	25.051	515.00	3.680	Ppm
18	Quercétine (quercétine-3-o-rhamonoside)	26.404	447.00	0.054	Ppm
19	L'acide rosmarinique	-	359.00	N.D. (pic)	
20	Naringine	25.503	579.00	0.052	Ppm
21	Apigénine-7-o-glucoside	26.233	431.00	0.018	Ppm
22	Acide 4,5-di-o-caffeoylquinique	-	515.00	N.D. (pic)	
23	L'acide salvolinique	-	717.00	N.D. (pic)	
24	Trans cinnamique	-	147.00	N.D. (pic)	
25	Quercétine	31.785	301.00	0.004	Ppm
26	Kaempferol	31.774	285.00	0.195	Ppm
27	Naringenine	33.750	271.00	0.001	Ppm
28	Silymarine	-	481.00	N.D. (pic)	
29	Apigénine	34.385	269.00	0.018	Ppm
30	Lutéoline	34.767	285.00	0.005	Ppm
31	Cirsiliol	35.515	329.00	0.267	Ppm
32	Cirsilineol	38.467	343.00	0.005	Ppm
33	Acacetine	40.055	283.00	0.003	Ppm
34	Fulscan	-	IC	N.D. (pic)	
35	TIC (SIM)	-	TIC	N.D. (pic)	

Dans l'extraits de margines, il a été possible de détecter 35 composés dont 23 ont été identifiés et 12 composés n'était pratiquement pas détecté. Ces composés inclus différents classes de composés phénoliques, à savoir les acides phénoliques (les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques) et familles de flavonoïdes (flavan-3-ol, flavanones, flavonols, flavones) et une absence totales des alcools phénoliques. Les acides phénoliques hydroxycinnamiques identifiés sont essentiellement « l'acide p-coumarique(C16), caféique (C24), chlorogénique, acide trans-férulique (C23), acide quinique », et parmi les acides hydroxybenzoïques « l'acide protocatéchuique » c'est le seul qui a été détecter, les principaux flavonoïdes retrouvés sont « Kaempferol, quercétine, naringenine, apigénine, rutine, lutéoline, acacétine ». L'acide chlorogénique et l'acide protocatéchuique (C17) sont retrouvés en tête de classement avec des concentrations de (3.680 ppm et 2,497 ppm respectivement), suivi par l'acide p-coumarique et l'acide caféique, dont sont concentrations égales à (0,789 ppm et 0.351 ppm respectivement).

L'absence totales des alcools phénoliques dans nos extrait du principalement à les réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques (**Eroglu et al., 2008**).

Nos résultats sont en accord et en désaccord avec d'autres résultats trouvés par plusieurs chercheurs, **Fki et al. (2005a)** à révélées la présence des acides caféiques, acide p-coumarique acide férulique et l'hydroxytyrosol. De même **Marco et al. (2007)** révélées des petites quantités des flavonoïdes (Lutéoline et lutéoline-7-glucosides) et des quantités très importantes d'hydroxytyrosol.

L'analyse de le profile phénolique des margines réalisée par **Belaid et al. (2002)** a montré une variation très importante en composes phénoliques ; l'acide para coumarique l'acide protocatéchuique, l'acide férulique et l'acide caféique et d'autres classes des alcools phénoliques.

En effet, plusieurs facteurs conditionnent l'existence de ces composes dans les margines tel que l'état de maturation des olives, les conditions d'extraction de l'huile d'olive et l'état des margines. Les margines collectées dans des bassins de stockage peuvent subir différentes réactions (d'hydrolyse, d'oxydation et de bio transformation) ce qui modifie continuellement leur composition notamment en composes phénoliques (**Belaid et al., 2002**).

*Conclusion*

L'objectif de cette étude est de faire une étude phytochimique des margines issues de l'extraction d'huile d'olives (de la variété Chemlal) dans la région de Baghai Wilaya de Khenchela.

La caractérisation physico-chimique des échantillons a montré des rejets liquides avec un taux d'humidité élevés [95%], acides [pH = 4,46] et un teneur en solide total en suspension beaucoup plus important (0,90%), très riches en matières organique [MO = 98 %] et en sucres totaux [0,36 mg/ml] et pauvres en élément minéraux [CE = 4,76 mS/cm], et en azote total 0,30 g/l. Une extraction liquide-liquide a été effectuée, en utilisant l'acétate d'éthyle. Les dosages des polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu [0,05mg EAG /ml E] et les flavonoïdes totaux sont déterminés par le trichlorure d'aluminium [8,24µg EQ /ml E].

Le screening phytochimique réalisé nous a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, les coumarines, composés réducteurs avec des quantités importante et en quantités moindres des alcaloïdes et des terpénoïdes. De même nous avons noté l'absence totale des saponines.

L'analyse qualitative des extraits par CG-MS a révélé la présence de nombreux acides gras, parmi lesquels l'acide oléique «Acide 9-octadecenoïque » (C18 : 1) ,l'acide palmitique « Acide hexadecanoïque » (C16 : 0), l'acide linoléique (C18 :2) « Acide 9,12-octadécadiénoïque ,méthyl ester, (E, E)-» , « Acide 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z)-, ester méthylique » (C18 : 2) et des acides stéarique (C18 : 0) .

L'analyse qualitative des extraits par LC-MS de margines montre une variation très importante en monomères phénoliques, parmi lesquels Les acides phénoliques hydroxycinnamiques « l'acide p-coumarique(C16), caféique (C24), chlorogénique, acide trans-férulique (C23), acide quinique », les acides hydroxybenzoïques « l'acide protocatéchuique » et les principaux flavonoïdes retrouvés sont « Kaempferol, quercétine, naringenine, apigénine, rutine, lutéoline, acacétine ».

Tous ces résultats permettent de conclure que ces extraits peuvent être utilisés après leur extrapolation en expérimentation animale et clinique dans la prévention et le traitement des maladies.

Toutefois dans l'intérêt d'apporter un apport complémentaire à cette étude, il serait intéressant d'effectuer d'autres analyses telles que la valorisation médicinale des margines.

*Références  
bibliographiques*

Références bibliographiques



**Abassetal. (2012).** Phenolic profile and antioxydant acitivities of olive mill waswater. Food chemistry, p 132 :406-412.

**Abichou M, Ben-rouina B, Taamallah H, Gargouri K. (2003).** Essais de valorisation des margines par épandage en oliveraies. *Revue Ezzaitouna*, p 9 :1-21.

**Achak M, Ouazzani N, Yaacoubi A, Mandi L. (2008).** Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essais de leur traitement par coagulation – floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. *Revue de Science de L'eau/Journal of Water Science* p 21 :53-78.

**Achat S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques, thèse de doctorat, Université d'Abderrahmane Mira, Bejaia, p 211.

**Ademe B. (2000).** Les coproduits d'origine végétale des industries agroalimentaires. Ademe Edition, p 76.

**Aggoun-Arhab.,M. (2016).** Caractérisation de la composition en microconstituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière. Thèse de doctorat. INATAA. Université Frères Mentouri-Constantine.102 :9-111.

**Aguilera-Carbo A., Augur C., Prado-Barragan L. A., Favela-Torres E., Aguilar C. N. (2008).** Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p 78: 189-199.

**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. Universite sidi mohamed ben abdellah. Fes, p 156.

**Aissam A. (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 (Maroc).

**Ajana H., El Antari A. and Hafidi A. (1998).** Fatty acids and sterols evolution during the ripening of olives from the *Moroccan Picholine* cultivar. *Grasas y Aceites*, p 49 (5-6)

**Alibert J., Ranjeva R. et Boudet M A. (1977).** Organisation subcellulaire des voies de synthèses des composés phénoliques. *Physiol. Veg*, p 15: 279-301.

**Allouche N., Fki I., Sayadi S . (2004).** Toward a high yield recovery of antioxydants and purified hydroxytyrosol from olive mill.Wastewaters. *Journal of Agricultural and food chemistry*, p 52,267-273.

**AOAC, (1990).** In: S. william (Ed.), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemist International*, 15th AOAC International, *Arlintong, Virginia, (USA)*.

**Assas N., Marouani L., Hamidi M. (2000).** Scale down and optimnization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrium Candidum*. *Biprocess Engineering*, p 22,503-507



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

**Bazoti F.N., Gikas E., Skaltsounis A.L., Tzarbopoulos A. (2006).** Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Analytica Chimica Acta*, p 573–574, 258–266.

**Benabid, H. (2016).** Caractérisation de l’huile d’olive Algérienne. Apports des méthodes chimiométriques. Thèse de doctorat. INATAA. Université de Constantine p 84-91.

**Benlarbi, F.(2004).** Caractérisation des lipides et des phénols de quelques groupes d’oliviers d’Algérie.Mémoire de magister.Laboratoire des sciences fondamentales. Université de Laghouat, p 70-86-88.

**Benlemlih M, Ghanam J. (2012).** Polyphénols d’huile d’olive trésors santé. *Edition: France (Paris)*, p 67-111..

**Benyahia N., Zein K. (2003).** Analyse des problèmes de l’industrie de l’huile d’olive et solutions récemment développées. 2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solution. Lausanne, Suisse.

**Blika p.s., Stamatelatou K., Kornaros M., Lyberato G. (2009).** Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global Nest Journal*, p 11 (3) : 364-372.

**Bourmad, S. (2011).** *Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles* (Doctoral dissertation).

**Bruneton J. (1999).** *Pharmacegnosie-phytochimie-Plantes médicinales*, 3eme édition. Technique et documentation, Paris.



**CAR/PP. (2002).** Centre d'activité régionale pour la production propre.

Chemie, Weinheim, p 379 - 397.

**Chimi H. (2006).** Technologie d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. *Bulletin mensuelle d'information et de liaison du PNNTA, Maroc*, p7.

**COI. (2014).** Conseil Oléicole International.

**Collin, S., et Crouzet, J. (2011).** *Polyphénols et procédés : transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Lavoisier.

**Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Dominguez, H. (2009).** Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree.

**Crozier, Einar Jensen, Michael E.J, Lean, Morag S and McDonald. (1997).** Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, p 761:315-21.



**D'Annibale A., Federic F., Fenice M., Semanni G.G., Petruccioli M., VASSILEW n. (2003).** Residues of olive oil extraction process: possible biotechnological approach. *Science and technology*, p 85,1-4.

**De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R. (2007).** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil. *Food chemistry*, p 104 : 858-867.

**Dewick PM. (1995).** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep*, p 12: 579-607.

**DSA. (2014).** la direction des services agricoles.

**Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Animal Chemistry*, p 28: 350-356.



**El Hajjouji H., Fakharedine N., Baddi G.A., Winterton P., Bailly J.R., Revel J.C. et Hafidi M. (2007).** Treatment of olive mill waste water by aerobic biodegradation: an analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource Technology* p 98: 3513-3520.

**El-Abbassi A, Kiai H, Hafidi A.** (2012). Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*, p 132: 406-412..

*F*

**Fakharedine N. El Hajjouji H. Ait Baddi G. Revel J.C. Hafidi M.** (2006). Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during aerobic digestion of olive-mill waste-waters. *Process Biochemistry*, p 41 : 398–404

**Fellahi, B.** (2008). **Etude de la fraction lipidique de cinq variétés d'olive cultivées dans la région de Boumagueur (N'gaous) Batna. Mémoire d'ingénieur d'état .Technologie alimentaire. Université de Batna.**

**Fernandez Diaz M.J.** (1983) Olives. In Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, vol. 5. Verlag.

**Fezzni B., Ben Cheikharticle R.** (2009). Extension of the biodegradation model N0.1 (ADM1) to include phenolic compounds biodegradation process for the simulation of anaerobic co-digestion of olive mill wastes at thermophilic temperature. *Journal of Hazardous Materials*, p 162 :1563-1570.

**Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A., Parrella A., Temussi F.** (2003). Environmental effects caused by olive mill Waste waters : toxicity comparison of low-molecular-weight phenol Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p 51 : 1005–1009.

**Francesco G.L.** (1993). Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae*, p 47, 15-20.

*G*

**Ghedira, K.** (2008). L'olivier. *Phytothérapie*, p 6 (2) : 83–89.

**Ghomari M.,** (2015) Traitement des margines de la région du Fès.mémoire de master. Biotechnologie Microbienne. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

**Gutiérrez, F. Jimenez, B. Ruiz, A. et Albi, MA.** (1999). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *J. Agric. Food. Chem*, p 47 : 121-127.

*H*

**Hadi M.** (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractères pro-oxydants ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Mémoire doctorat. Option Pharmacochimie. Université Louis Pasteur. Strasbourg, p 155 .

**Hagerman AE, Muller-Harvey I, Makkar HPS. (2000).** Quantification of tanins in tree foliage. FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in food and Agriculture. Vienna, p 26.

**Hamdi M. 1992.** Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry Biotechnology*, p 37 : 155.

**Hamdi M., Ellouz P. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes. *Environmental Technology*, p 14, 183-188.

**Hanafi F. Sadif N. Assobhei O. Mountadar M. (2009).** Traitement des margines par électrocoagulation avec des électrodes plates en aluminium. *Revue des sciences de l'eau, Journal of Water Science*, p 22: 473-485.

**Harborne J.B. (1998).** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN:0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).

**Haslam E. (1994).** Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.*, p 11: 41-66.



**Keceli T, Gordon MH. (2001).** The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric*, p 81, 1391–1396.

**Khoufi S., Feki F., Sayadi S. (2007).** Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials*, p 142 : 58-67.

**Kissi M., Mountadar M., Assobhei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P. (2001).** Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl Microbiol Biotechnol*, p 57 : 1-2, 221-



**Lee-Huang S, Zhang L, Huang P L, Chang YT. (2003).** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, p 307:1029-1037.

**Lesage-Meessen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J-C., Lorquin J., Delattre M.(2001).** Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, p 75,501-507.

**Leulmi N. (2011).** La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovine. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine, p 101.

**Linden et Lorient D. (1994).** Pigments et arômes .In : Biochimie agro industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. *Ed : Masson*, p 338-340.

**Lopez M.J., Ramos-Cormenzana A. (1996)** .Xanthan production from olive mill wastewaters.International Biodeterioration and Biodegradation, p 38,263-270.

**Lugasi A, Hovari J, Sagi, K V. and Biro L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, p1-4: 119-125.

*M*

**Macheix J. J., A. Flauriet, J.A. Billot. (1990).** *Fruit phenolics*. CRC Press Inc, Boca Raton Florida, p 378.

**Makkar H.P.S., Blümmel M., Borowy N.K. and Becker K. (1993).** Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal Science Food Agricultur*, p 61 : 161–165.

**Manallah A.(2012).** Activités antioxydante et anticoagulante despolyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L.

**Muzzalupo I ; Vendramin G.G et Chiappetta A. (2014).** Genetic Biodiversity of Italian Olives (*Olea europaea*) Germplasm Analyzed by SSR Markers. *The Scientific World Journal*, p 12.

*N*

**Niaounakis M., Halvdakis C. P. (2004).** Olive mill waste management-Literature Review and patent Survey. Typothito-George Dardanos, Athens, Greece.

*O*

**Obied H, Prenzler P, Robards K. (2008).** Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. *Elsevier B.V. 03-058*. olive-mill waste-waters. *Process Biochemistry*, p 41 : 398–404.

*P*

**Paredes C., Cegarra J., Roig A., Sa´nchez-Monedero M.A., Bernal M.P. (1999).** Characterization of olive-mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology*, p 67: 111–115.

**Patumi M., Tarenzianis S.,Ridolf M.,Fontanazza G. (2003).** Effet of fruit stoning on olive oil quality .*Journal of American Oil Chemists’ Society*, p 80,249-255.

**Peynet J, Beaudeau J L, Legrand A.** Strass oxydant et athérosclérose. In : **Delattre J, Beaudeau J L, Bonnefont D. (2005).** Rousselot, editors. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Tec Doc Lavoiser Ed.

**Proot J. (2002).** Les technologies propres appliquées aux industries agroalimentaires. Aris.T, Bourgogne, 12p. pruning. *Food Chemistry*, p 114 : 806-812.



**Raederstoff D, Wang-Schmidt Y, Wertz K. (2003).** Use of hydroxytyrosol as anti-aging agent. *Pub.No: US. 2010/0130621 A1.*

**Ramos-Cormenzana A., Jirez-Jiménez B. et Garcia-Pareja M.P. (1996).** Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (*alpechin*) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration et Biodegradation*, p 38: 283-290.

**Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sanchez M., Lopez M. J. (1995).** Bioremediation of Alpechin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, p 249-268.

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

**Renzo C., Amirante P. (1988)** Trattamento di osmosi inversa ed ultrafiltrazione. In *Proc. of Research*, p 39: 151-180.

**Rodier J. Legube B. Merlet N. (2009)** .L'analyse de l'eau 9ème Ed., *DUNOD. Paris*, p 1525.

**Ros de Ursinos J.A. Borja R. (1992).** Use and treatment of olive mill wastewater :Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*, p 2 : 101-106.

**Ryan, D., Robards, K., Lavee, S. (1999).** Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, p 34 : 265–274.



**Salas J.J., Sanchez J., Ramli U.S., Manaf A.M., Williams M. and Harwood J.L. (2000).** Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progress in Lipid*

**Salhi .,R , Hamoudi.,A. (2016).** Etude des activités biologiques des polyphénols issus des margines. Mémoire de Master. Biochimie appliquée. Université Abbes Laghrour-Khenchela.

**Salvemini F, (1985).** Composizione chimica e vegeazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercamente le acque di vegetazione delle olive, *Riv, Delle Sostanze Grasse*, p 112, 559-564.

**Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F. (2000).** Detrimental effects of high molecular mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*, p 35.

**Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Bento, A., Pereira, A. (2008).** Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives ‘‘alcaparras’’. *Learning with Technologies*, p 41: 739–745.

*T*

**Terral JF., Arnold-Simard G. (1996).** Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Res*, p 46: 176-85.

**Trease G.E. & Evans W.C. (1989).** A text book of pharmacognosy (13 th Edition ) Bacilluere Tinal Ltd, London.

**Tsagariki E., Harris N., Lazarides., Konstantinos B. P. (2007).** Olive mill waste water treatment. *Springerlink*, p 133-157.

*V*

**Vazquez R.A., Maestro D.R., Graciani C.E. (1974).** Compentes fenolicos de la aceituna. II. Poliphenoles del alpechin. *Grasas y Aceites*, p 25, 341-345.

**Veillet S. (2010).** Enrichissement nutritionnel de l’huile d’olive : Entre Tradition et Innovation. These de Doctorat en Sciences de *l’Université d’Avignon et des Pays de Vaucluse*, p 153 pp.

**Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F. (1999).** Antioxidants and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p 47 : 3397-3401.

*W*

**Wagner H., Bladf S., Zgainski E.M. (1984)** Plant drug analysis. Translated by Scott Th.A. Springer-Verlag.

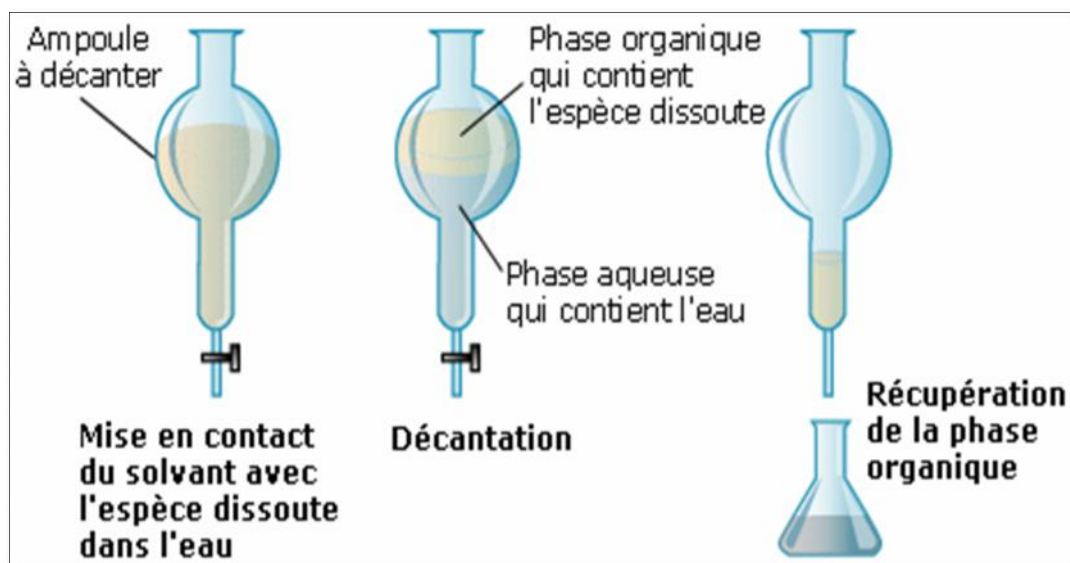
**Wiesman Z. (2009).** Desert olive oil cultivation : Advenced Bio Technology, *Elsevier Science : New York, NY, USA*.

*Z*

**Zarrouk, M. Marzouk, B. Ben Milled, D. et Cherif, A. (1996)** Accumulation de la matière grasse de l’olive et effet du sel sur sa composition. *Olivae*, 61 : 41-46.

*Les annexes*

**Annexe 1 : extraction liquide-liquide (par solvants organique)**



**Annexe 2 : préparations des réactifs Mayer et Wagner**

**Réactif de Mayer :**

Chlorure de mercure ..... 1,36 g

Iodure de potassium..... 5 g

Eau distillée..... qsp 100 ml


**Réactif de Wagner :**

Iodure de potassium..... 2 g

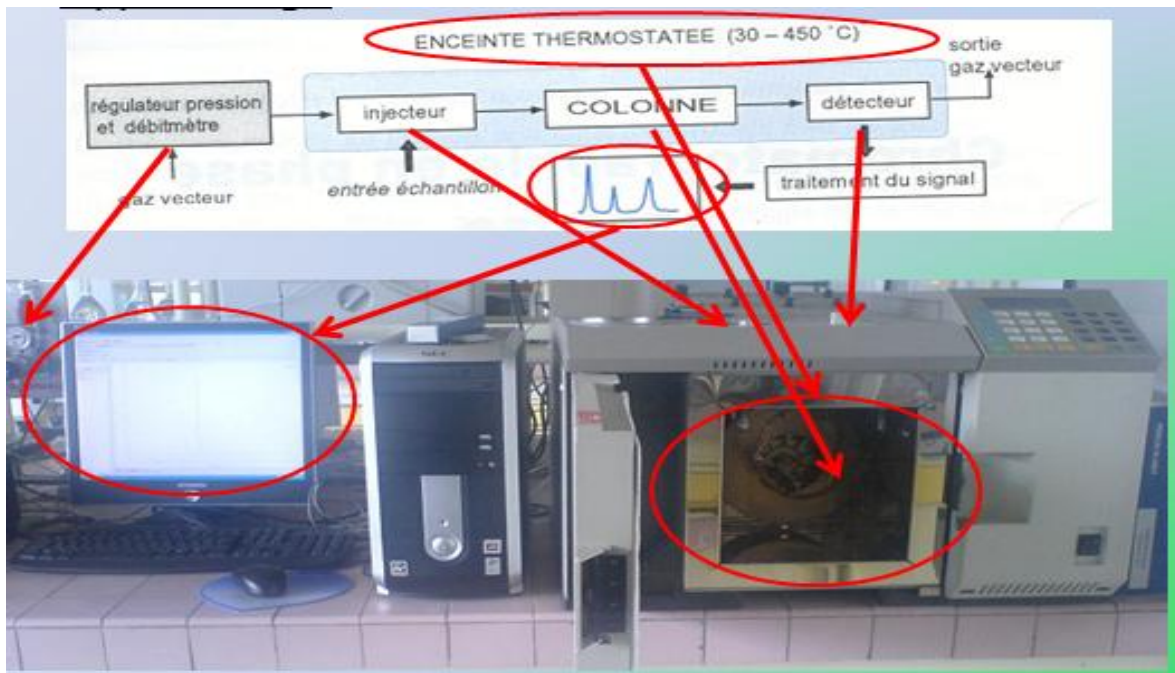
Iode..... 1,27 g

Eau distillée..... qsp 100 ml

**Annexe 3 : Résultats des tests phytochimique sur les margines**

<b>Métabolites Secondaires</b>	<b>Remarque</b>	
<b>flavonoïdes</b>	Apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure	
<b>Coumarines</b>	Apparition d'une fluorescence intense	
<b>Terpénoïdes</b>	formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase	
<b>Saponines</b>	Pas de formation de mousse	
<b>Composés réducteurs</b>	La formation d'un précipité rouge-brique	
<b>Alcaloïdes</b>	Apparition d'un précipité blanc Apparition d'un précipité brun	

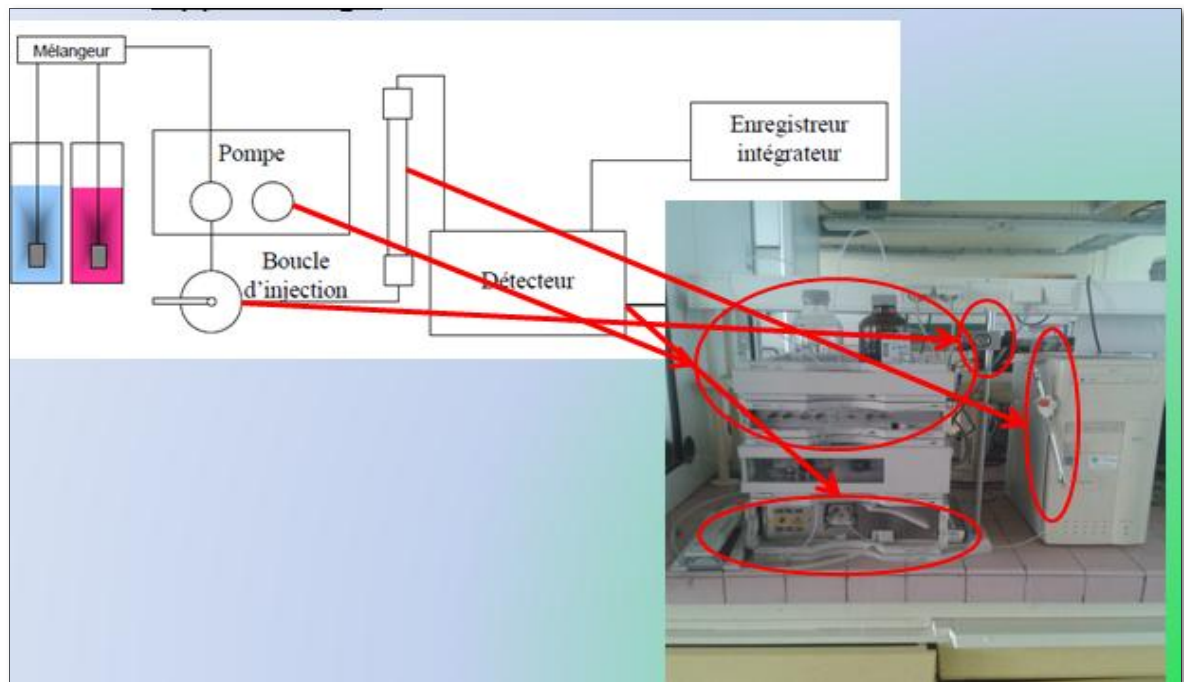
**Annexe 4: Appareillage de CPG**



**Annexe 5 : Spectrométrie de masse**



Annexe 6: Appareillage de HPLC

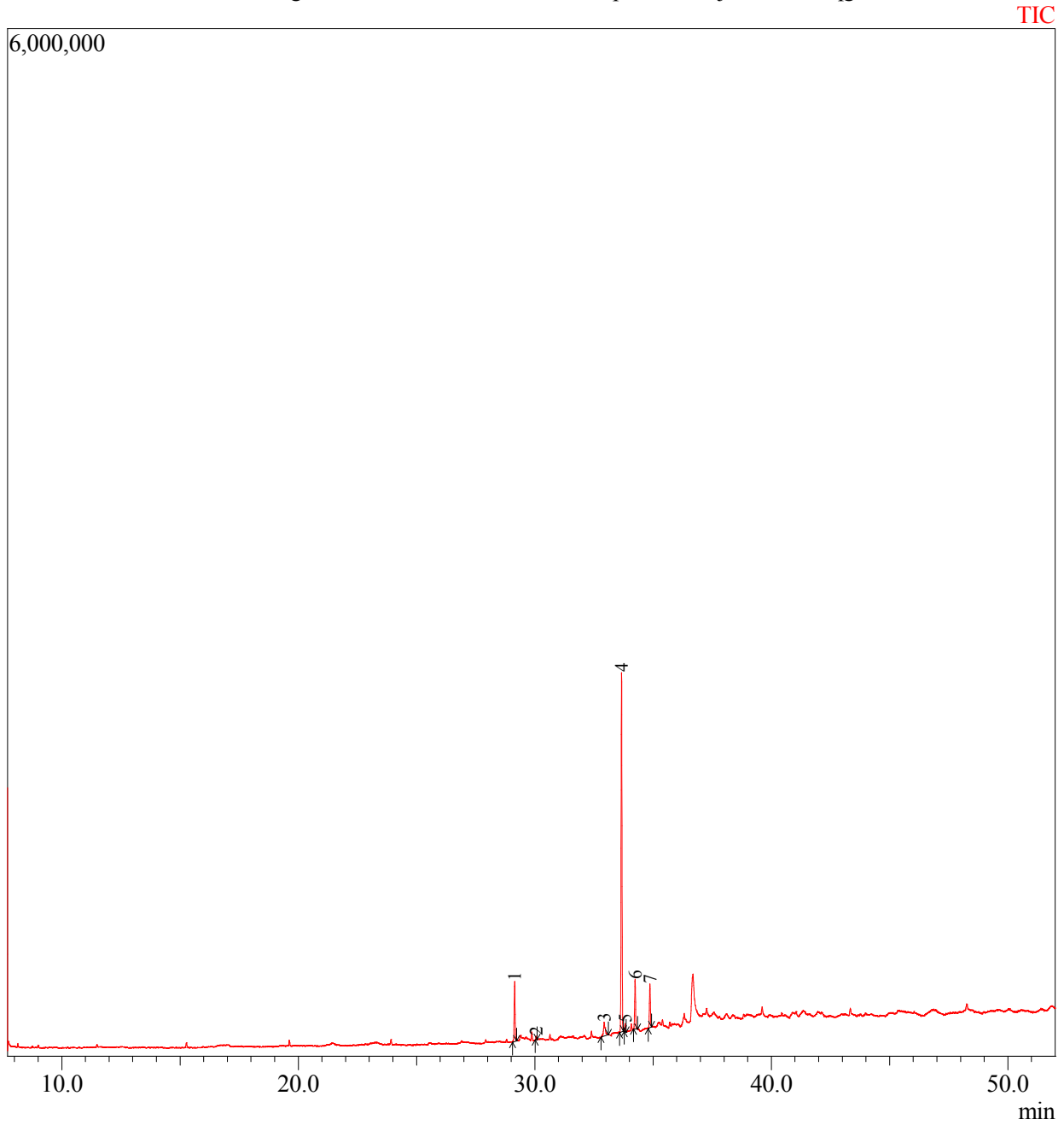


Institut des Régions Arides-Medenine  
Laboratoire Central

Rapport d'analyse

Analyzed : 06/01/2018 01:02:50  
Sample Name : MV  
Sample ID : MV  
Vial : 12  
Injection Volume : 1.00  
Data File : C:\GCMSsolution\Sample\marwa jawadi\MV.qgd  
Method File : C:\GCMSsolution\Sample\marwa jawadi\Fcistrans.qgm

Chromatogram MV C:\GCMSsolution\Sample\marwa jawadi\MV.qgd



## TIC

Peak#	R. Time	Area	Area%	Name
1	29.148	975418	11.087	HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER
2	30.057	44512	0.506	9-HEXADECENOIC ACID, METHYL ESTER, (Z)-
3	32.931	415958	4.728	Methyl stearate
4	33.666	5694444	64.726	9-OCTADECENOIC ACID, METHYL ESTER
5	33.821	122296	1.390	9-OCTADECENOIC ACID (Z)-, METHYL ESTER
6	34.240	813979	9.252	9,12-OCTADECADIENOIC ACID, METHYL ESTER, (E,E)-
7	34.866	731117	8.310	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester
			100.000	

Method

SUPELCO WAX TM10  
FUSED SILICA CAPILLARY COLUMN  
30m x 0.25mm x 0.25µm film thickness

==== Analytical Line 1 =====

[GC-2010]

Column Oven Temp. :100.0 °C  
Injection Temp. :250.00 °C  
Injection Mode :Splitless  
Sampling Time :0.00 min  
Flow Control Mode :Pressure  
Pressure :288.2 kPa  
Total Flow :13.0 mL/min  
Column Flow :4.99 mL/min  
Linear Velocity :83.1 cm/sec  
Purge Flow :3.0 mL/min  
Split Ratio :1.0  
High Pressure Injection :OFF  
Carrier Gas Saver :OFF  
Split Ratio Program  
Time(min) Split Ratio  
0.00 200.0  
1.00 5.0

Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	100.0	2.00
4.00	240.0	15.00

Equilibrium Time :3.0 min

[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]

IonSourceTemp :200.00 °C  
Interface Temp. :220.00 °C  
Solvent Cut Time :7.70 min  
Detector Gain Mode :Relative  
Detector Gain :1.07 kV +0.00 kV  
Threshold :0

[MS Table]

--Group 1 - Event 1--

Start Time :7.70min  
End Time :52.00min  
ACQ Mode :Scan  
Event Time :0.30sec  
Scan Speed :1666  
Start m/z :35.00  
End m/z :500.00

Sample Inlet Unit :GC

C:\GCMSsolution\Library\NIST11s.lib  
C:\GCMSsolution\Library\WILEY8.LIB

# Rapport d'analyse

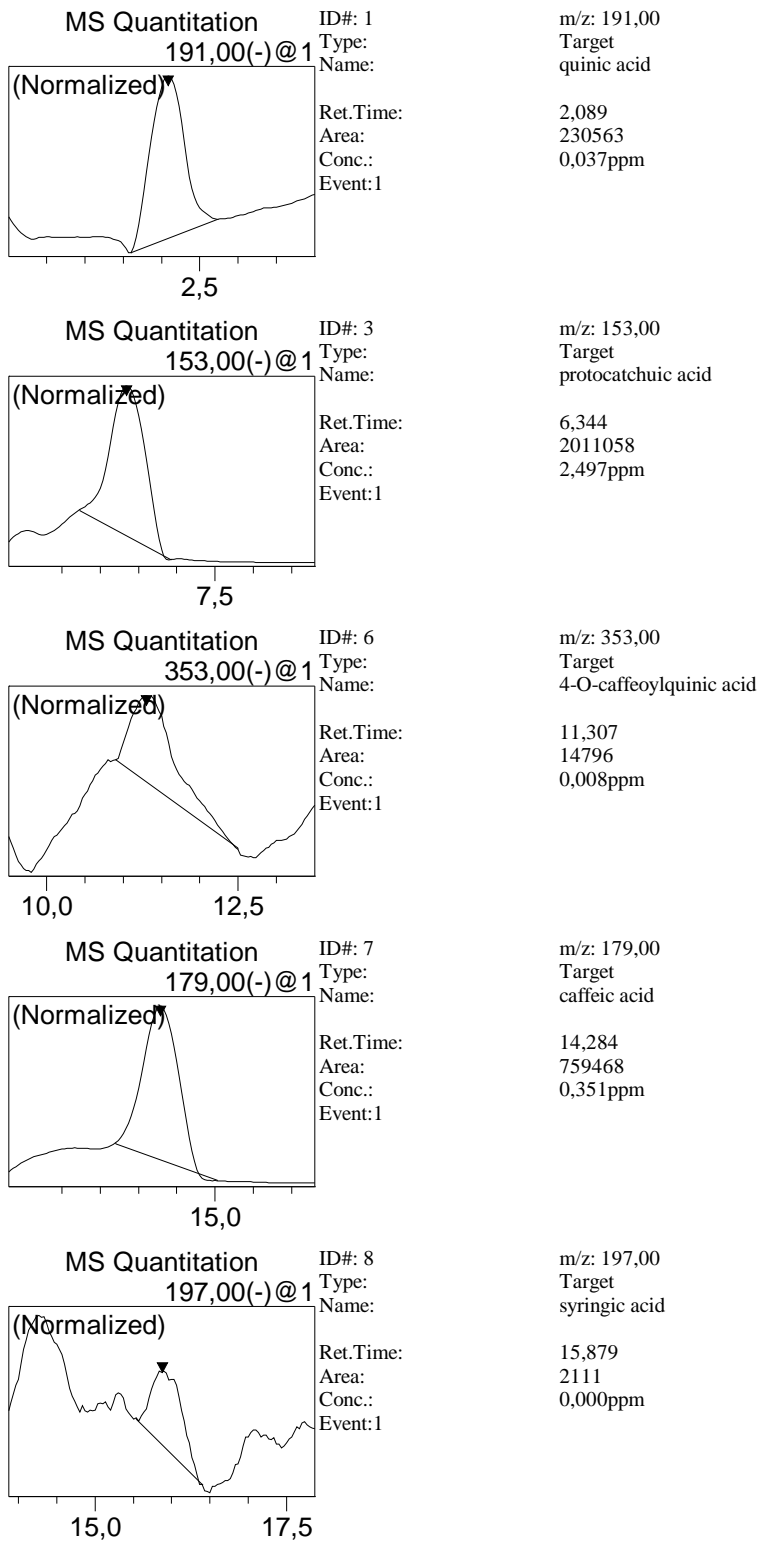
Sample Name : Mor Vert  
 Method Filename : acide phenol-flavenoides caracterisation01.lcm  
 Batch Filename : acid phenol.lcb  
 Date Acquired : 18/01/2018 13:51:02

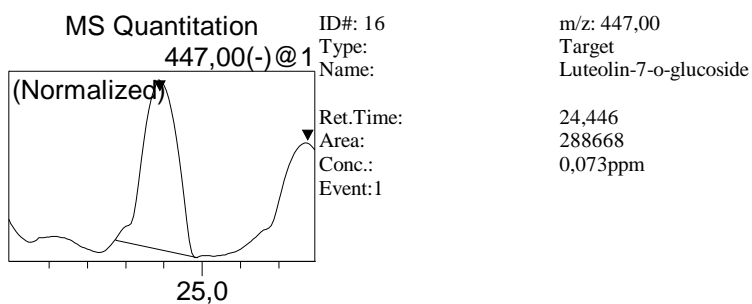
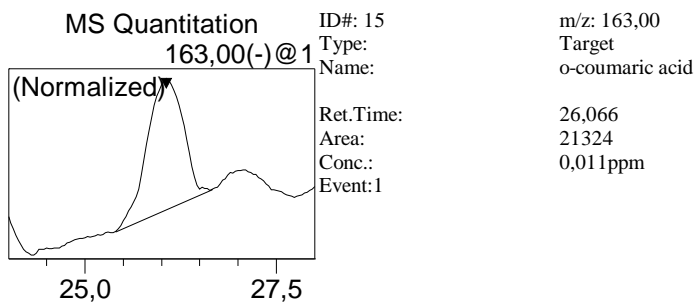
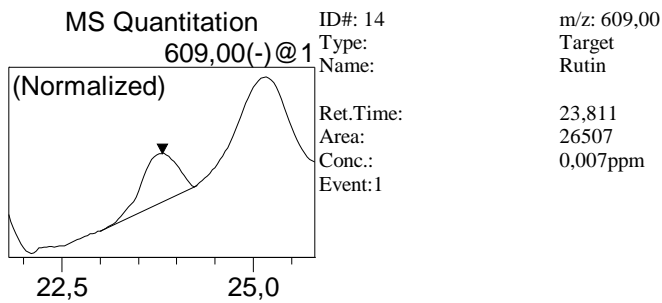
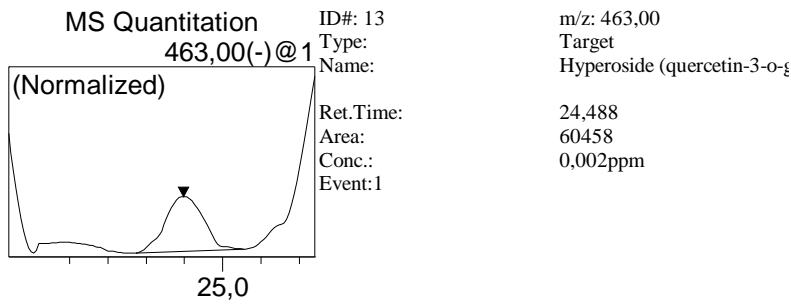
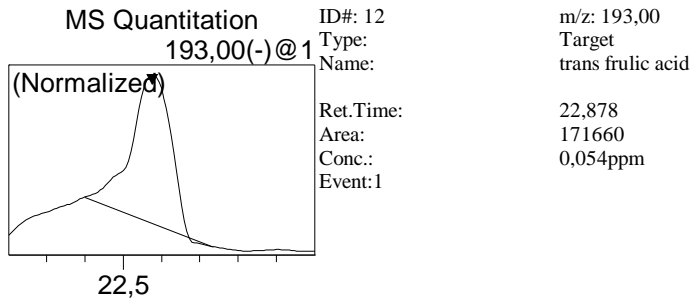
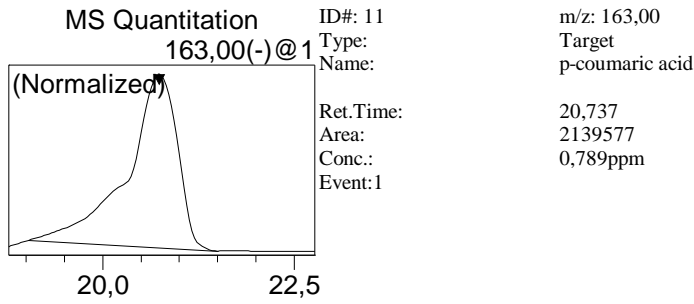
 Résultat  
 Mor Vert

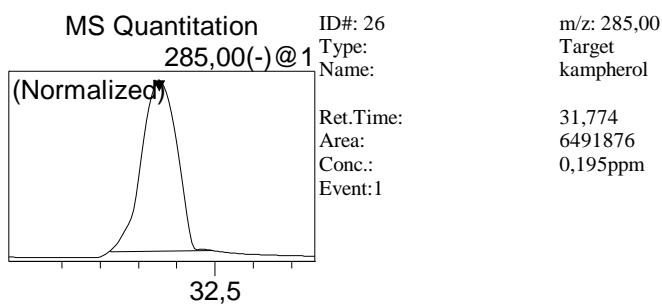
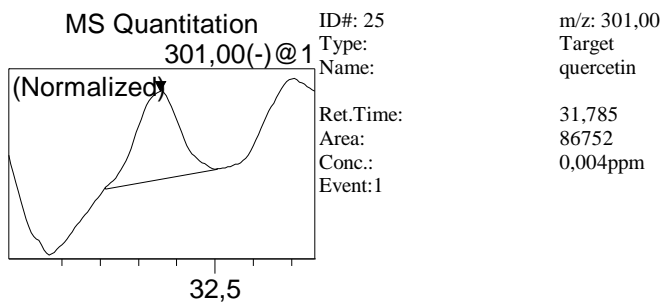
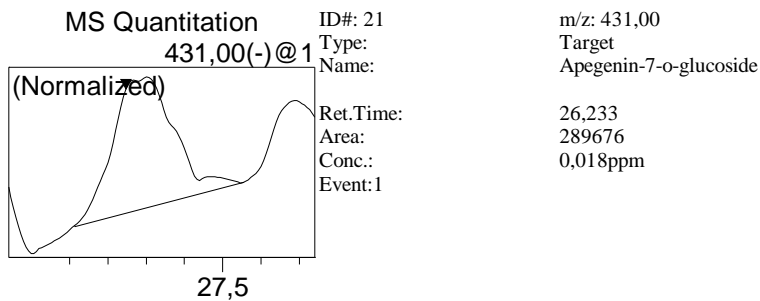
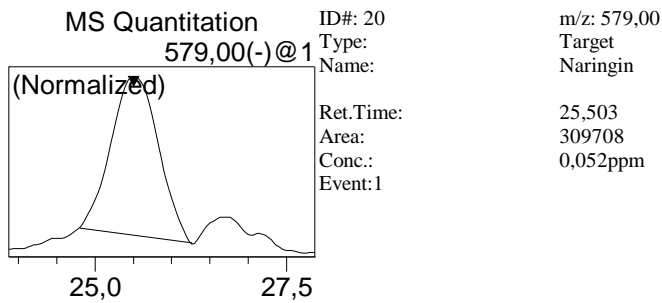
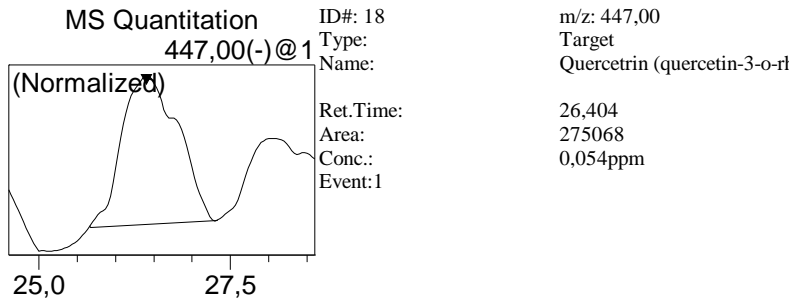
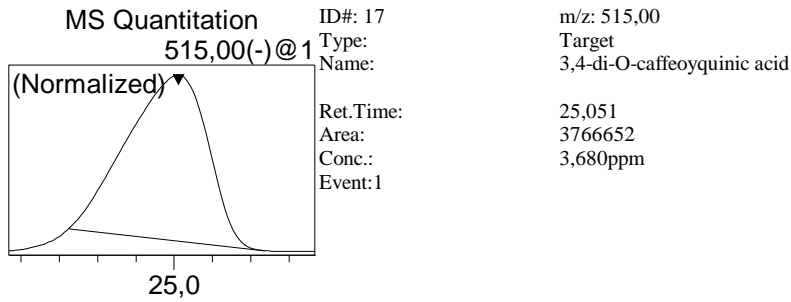
ID#	Name	Ret. Time	m/z	Conc.	Unit
1	quinic acid	2,089	191,00	0,037	ppm
2	Gallic acid	--	169,00	N.D.(Peak)	
3	protocatechuic acid	6,344	153,00	2,497	ppm
4	Catechin (+)	--	289,00	N.D.(Peak)	
5	Chlorogenic acid	--	353,00	N.D.(Peak)	
6	4-O-caffeoylquinic acid	11,307	353,00	0,008	ppm
7	caffeic acid	14,284	179,00	0,351	ppm
8	syringic acid	15,879	197,00	0,000	ppm
9	1,3-di-O-caffeoyquinic acid	--	515,00	N.D.(Peak)	
10	Epicatechin	--	289,00	N.D.(Peak)	
11	p-coumaric acid	20,737	163,00	0,789	ppm
12	trans frulic acid	22,878	193,00	0,054	ppm
13	Hyperoside (quercetin-3-o-galactoside)	24,488	463,00	0,002	ppm
14	Rutin	23,811	609,00	0,007	ppm
15	o-coumaric acid	26,066	163,00	0,011	ppm

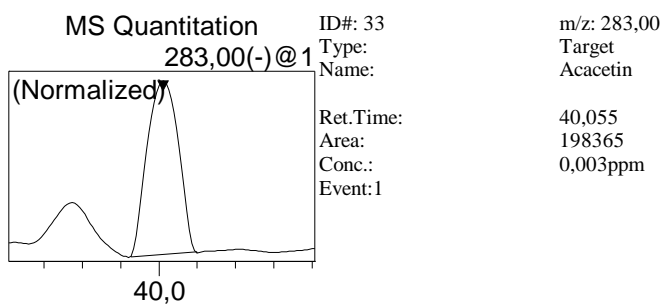
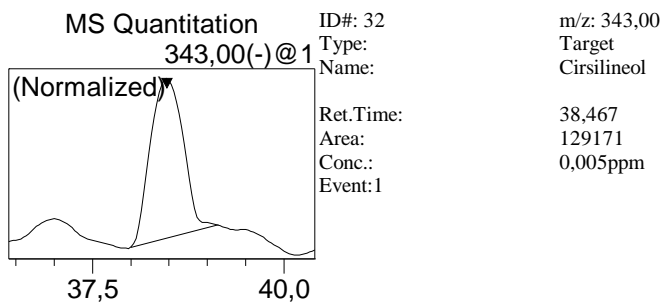
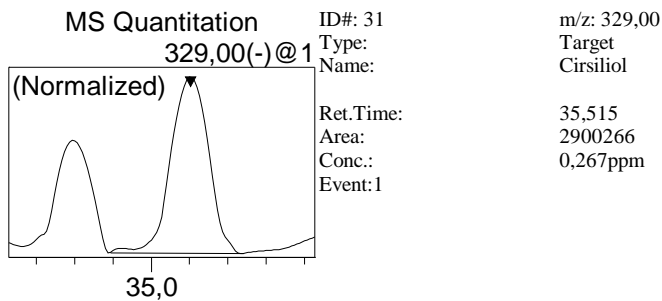
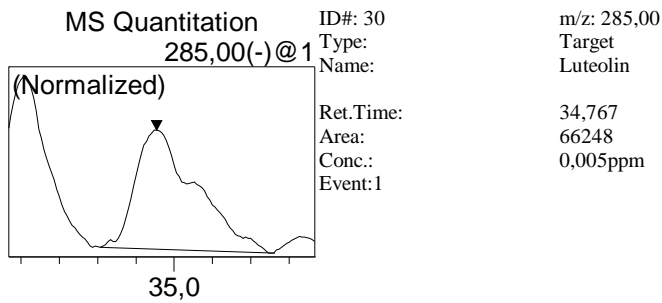
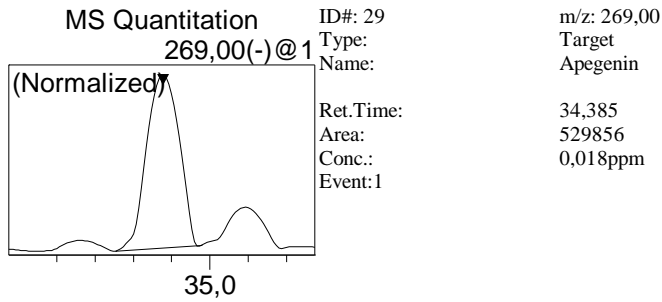
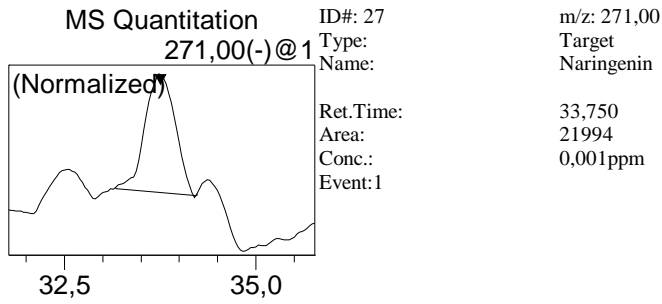
Résultat  
Mor Vert

ID#	Name	Ret. Time	m/z	Conc.	Unit
16	Luteolin-7-o-glucoside	24,446	447,00	0,073	ppm
17	3,4-di-O-caffeoyquinic acid	25,051	515,00	3,680	ppm
18	Quercetrin (quercetin-3-o-rhamonosid	26,404	447,00	0,054	ppm
19	Rosmarinic acid	--	359,00	N.D.(Peak)	
20	Naringin	25,503	579,00	0,052	ppm
21	Apegenin-7-o-glucoside	26,233	431,00	0,018	ppm
22	4,5-di-O-caffeoyquinic acid	--	515,00	N.D.(Peak)	
23	Salviolinic acid	--	717,00	N.D.(Peak)	
24	trans cinnamic	--	147,00	N.D.(Peak)	
25	quercetin	31,785	301,00	0,004	ppm
26	kampherol	31,774	285,00	0,195	ppm
27	Naringenin	33,750	271,00	0,001	ppm
28	Silymarin	--	481,00	N.D.(Peak)	
29	Apegenin	34,385	269,00	0,018	ppm
30	Luteolin	34,767	285,00	0,005	ppm
31	Cirsiliol	35,515	329,00	0,267	ppm
32	Cirsilineol	38,467	343,00	0,005	ppm
33	Acacetin	40,055	283,00	0,003	ppm
34	Fulscan	--	TIC	N.D.(Peak)	
35	TIC (SIM)	--	TIC	N.D.(Peak)	

MS Quantitative Graph  
Mor Vert.lcd







## Method

## &lt;&lt;Pump&gt;&gt;

Mode : Binary gradient  
 Pump A : LC-20ADXR  
 Pump B : LC-20ADXR  
 Total Flow : 0,4000 mL/min  
 B Conc. : 10,0 %  
 B Curve : 0  
 PressMax : 350 bar  
 PressMin : 0 bar

## &lt;&lt;Autosampler&gt;&gt;

Autosampler Model : SIL-20AXR

## &lt;&lt;Oven&gt;&gt;

Oven Model : CTO-20AC  
 Oven Temperature : 40 C

## &lt;&lt;LC Time Program&gt;&gt;

Time	Module	Command	Value	Comr
0,01	Pumps	Pump B Conc.	10	
14,00	Pumps	Pump B Conc.	20	
27,00	Pumps	Pump B Conc.	55	
37,00	Pumps	Pump B Conc.	100	
45,00	Pumps	Pump B Conc.	100	
45,01	Pumps	Pump B Conc.	10	
50,00	Pumps	Pump B Conc.	10	
50,00	Controller	Stop		

## &lt;&lt;Column Information&gt;&gt;

Column Name : DiscoVery BIO Wide Pore C18-5  
 Column ID : 131928-04  
 Column Length : 250 mm  
 Inner Diameter : 4,0 mm  
 Max Number of Injections : 100000  
 Expiration Date : 22/02/2020  
 Max Usable Temp. : 75,0 C  
 Activation Date : 20/12/2016

## &lt;&lt;MS Program&gt;&gt;

## &lt;&lt;Interface&gt;&gt;

Interface :ESI  
 DL Temperature :280 C  
 Nebulizing Gas Flow :1,50 L/min  
 Heat Block :450 C  
 Drying Gas :On  
 15,00 L/min

**Master Académique**

**Option : biochimie appliquée**

**Présenté par :**

<sup>lle</sup>  
**M<sup>lle</sup> GHODBANE Nadia**

**&**

<sup>lle</sup>  
**M<sup>lle</sup> CHERMIME Samya**

**Thème :**

## ***Étude phytochimique des margines issus de l'extraction à froid de l'huile d'olive***

Les industries oléicoles, en plus de leur production principale qui est l'huile d'olive, génèrent des quantités énormes d'effluents nommés Margines dont le déversement dans la nature entraîne une pollution accrue de l'environnement et un gaspillage d'une source potentielle de produits à divers usages.

L'objectif de cette étude est de faire une étude phytochimique des margines issues de l'extraction d'huile d'olives (de la variété Chemlal) dans la région de Baghai Wilaya de Khenchela.

La caractérisation physico-chimique des échantillons a montré des rejets liquides avec un taux d'humidité élevés [95%], acides [pH = 4,46] et un teneur en solide total en suspension beaucoup plus important (0,90%), très riches en matières organique [MO = 98 %] et en sucres totaux [0,36 mg/ml] et pauvres en élément minéraux [CE = 4,76 mS/cm], et en azote total 0,30 g/l. Une extraction liquide-liquide a été effectuée, en utilisant l'acétate d'éthyle. Les dosages des polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu [0,05mg EAG /ml E] et les flavonoïdes totaux sont déterminés par le trichlorure d'aluminium [8,24µg EQ /ml E].

Le screening phytochimique réalisé nous a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, les coumarines, composés réducteurs avec des quantités importante et en quantités faibles des alcaloïdes et des terpénoïdes. De même nous avons noté l'absence totale des saponines.

L'analyse qualitative des extraits par CPG-MS et HPLC-MS a révélé la richesse des margines par de nombreux acides gras et des composés phénoliques.

**Mots clés :** margine, extraction, screening phytochimique, polyphénols, acide gras, chromatographie

**Jury d'évaluation :**

<b>Présidente :</b>	<b>Dr. HAMLI Sofia</b>	<b>(MCB)</b>	<b>Univ. Khenchela</b>
<b>Promotrice :</b>	<b>Dr. Kadi Kenza</b>	<b>(MCA)</b>	<b>Univ. Khenchela</b>
<b>Examinatrice :</b>	<b>Dr. DJEMIL Randa</b>	<b>(MCB)</b>	<b>Univ. Khenchela</b>

**Lieu de travail :**

*Laboratoire de l'université Abbes Laghrou-Khenchela.*

*Laboratoire central de l'Institut des Régions Arides (IRA) à Médenine –Tunisie-.*

**Année Universitaire 2017-2018**