



Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par

BRIK Amira

BOUALAGUE Maissoun

ZEROUK Hadil

Thème

**Cararctérisation physico-chimique et étude *in vitro* des
activités biologiques des polyphénols extraits des margines**

Devant le jury

Président : Dr. THABET Rachid	MCB	Université de Khenchela
Promotrice : Dr. DOUAOUYA Lilia	MCB	Université de Khenchela
Examineur : Dr. MAAMAR Hichem	MCB	Université de Khenchela

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme DOUAOUYA Lilia , on lui remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire

Nous remercions Dr. THABET Rachid d'avoir accepté de juger notre travail en tant que président.

Un grand merci à Dr. MAAMAR Hichem pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous adressons notre profond remerciement aussi à l'équipe du laboratoire pédagogique de Biochimie de l'institut de Biologie à l'université de Khenchela surtout les ingénieurs Mr. Abdenour , Mme. Bahia et Mme. Souaad pour l'aide qu'ils nous ont apporté et les efforts déployés pour faciliter notre travail.

Nos remerciements s'adressent également à tout nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.



Dédicace

Je souhaite que les conflits disparaissent de la surface de la terre et que règnent la paix, la solidarité et l'entraide afin que la faim et les maladies soient combattues efficacement.

Je souhaite que les valeurs morales puissent l'emporter sur le matérialisme afin que l'égoïsme et le repli sur soi ne soient plus d'actualité.

Je dédie cet humble travail avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie :

*A mon cher **père** : La lumière de mes yeux, mon premier encadrant depuis ma naissance.*

*A ma très chère **mère** : la lune de mes nuits, ma chandelle dans l'obscurité, celle qui a attendue avec patience les fruits de sa bonne éducation.*

*A ma sœur "**Samra**" qui m'a accompagnée avec sérénité et amour.*

*A mes chers frères : **Alladin, Abd'Ennour, et Zoubir**, qui m'ont soutenus tout au long de ma vie.*

*A mon beau-frère **Abdessalem Laateur** pour son encouragement.*

*A mes amies, **Rihen, Kawther, Rihem, Nesrine et Chaima***

A ma famille pour leur soutien moral

A mes camarades de classe

*Que Dieu le tout puissant vous préserve
tous et vous procure.*

Amira



Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour

*À l'homme de ma vie **papa** ma force, qui m'a supporté et ma dirigé vers la gloire .*

*À la plus belle femme au monde **maman**, qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, qui m'a planais un chemin de succès avec ses conseils.*

*À ma chère sœur **Israa** et mon cher frère **Charaf eddine** qui n'ont pas cessée d'encourager et soutenir.*

*À mon adorable petite sœur **Sabaa** qui sait toujours comment procurer la joie et la sourire pour toute la famille, sans oublier le petit chat **Liyan**.*

*A tous la famille les cousins, les voisins, mes amours et mes chers amis **Meryem, Khouloud, Rayan** et que j'ai connu jusqu'à maintenant.*

*Merci à tous que dieu protège
vous et offre la chance et le bonheur.*

Maisoun



Dédicace

Je tiens en premier lieu à remercier **ALLAH** de m'avoir donné la force, le courage, la chance et la santé de mener à bien ce travail.

À mes chers **parents**, à qui je dois ce qui je suis

Pour votre amour, votre soutien, votre compréhension, votre patience et votre tendresse sans limite, vous m'avez transmis de belles valeurs, vous m'avez soutenu le long de mes études et vous avez sacrifié pour ma réussite, que Dieu vous garde en bon santé et vous accorde une longue vie.

À mon cher frère **MOHAMMED AMINE**, mon meilleur frère qui est toujours là pour moi. Pour ton encouragement, soutien infini et ton aide incessante, je souhaite un meilleur avenir.

À mes petits adorables frères : **Douaa et Youcef**

À mes **grand-mères, mes tantes, mes oncles, mon seul oncle maternel** pour les bons moments partagés, pour tout le soutien et l'amour que vous m'avez donné.

À ma meilleur amie et sœur du cœur **Imane**, La vie sans vous est ennuyante, Pour ton encouragement ton soutient et les bons moments qu'on a vécus ensemble, j'espère que notre amitié durera éternellement.

À mes adorables amies : **Roufaïda et Asma**.

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs sur qui je peux compter.

À tous mes amis (es), lesquelles ont partagée des bons moments de bonheur.

Hadil

Table des matières

Titre	Pages
Remerciements	
Résumé	I
Abstract	II
ملخص	III
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations	VI
Introduction	01
Synthèse bibliographique	03
Chapitre I : Généralités sur Oléiculture	04
I. Généralités sur Oléiculture	05
1. L'olivier	05
1.1. Origine et histoire	05
1.2. L'arbre	05
1.3. Botanique	06
1.4. Le fruit	06
2. La production oléicole	07
2.1. La production oléicole mondiale	07
2.2. La production et le secteur oléicole Algérienne	08
2.3. Système d'extraction d'huile d'olive	08
2.4. Les principaux sous-produits de l'oléiculture	09
Chapitre II : Les margines	10
II . Les margines	11
1. Origine	11
2. Caractérisation physico-chimique des margines	12
2.1. Fraction minérale	13
2.2. Fraction organique	13
2.2.1. Les glucides	13
2.2.2. Les composés azotés	14
2.2.3. Les vitamines	14
2.2.4. Les acides organiques	14
2.2.5. Les huiles	14
2.2.6. Les composés phénoliques	14
3. Impact des margines sur l'environnement et traitement	16
3.1. Impact des margines sur l'environnement	16
3.1.1. Pollution du sol	16
3.1.2. Pollution de l'air	16
3.1.3. Pollution des eaux	17
3.2. Traitement des margines et valorisation des margines	17
3.2.1. Traitement des margines	17
3.2.1.1. Traitement chimique	17
3.2.1.2. Traitement biologique	18
3.2.1.3. Traitement physique	19
3.2.2. Valorisation des margines	20

Chapitre III : Les composés phénoliques	21
III .Les composés phénoliques	22
1.Généralités	22
2. Définition	22
3. Classification des composés phénoliques	22
4. Propriétés biologiques des polyphénols	24
5. Procédés d'extraction des composés phénoliques	24
6. Effets biologiques des polyphénols	25
7. Valorisation des composés phénoliques des margines	25
Chapitre IV: Les activités biologiques étudiées	27
IV. Les activités biologiques étudiées	28
1.Activité antioxydante	28
1.1. Activité anti radicalaire contré le DPPH	28
1.2. Activité antiradicalaire contre l'ABTS*	28
1.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	29
2. Activité anti-inflammatoire	29
2.1. Inflammation	29
2.2. Les anti-inflammatoires (AI)	29
2.2.1. Les anti-inflammatoires d'origines médicamenteuses	29
2.2.2. Les anti-inflammatoires d'origine végétale	30
2.3. Activité antihémolytique	30
2.3.1. Généralités	30
2.3.2.1. Processus d'hémolyse	30
2.3.2.1. Hémolyse physiologique	30
2.3.2.2. Hyperhémolyse	31
2.2.2. Les types des anti-hémolytiques	31
2.2.2.1. Anti-hémolytiques classiques	31
3. Activité anticoagulante	31
3.1. Généralités sur la coagulation	31
3.2. Mécanismes de la coagulation	32
3.2.1. Formation de la prothrombinase	32
3.2.1.1. Formation de la thrombine	32
3.2.1.2. Formation de la fibrine	32
Partie Expérimentale	34
Chapitre I : Matériels et méthodes	35
I. Matériel et méthodes	36
1. Matériel	36
1.1. Collecte des margines	36
1.2 .Echantillon du sang	36
1.3. Médicaments	36
1.4. Réactifs chimiques	36
1.5. Appareillage	37
2. Méthodes	37
2.1. Extraction des polyphénols des margines	37
2.1.1. Traitement des margines	37
2.1.2. Extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle	38
2.1.3. Extraction liquide-liquide à l'acétone	39

2.1.4. Extraction liquide-liquide au butanol	39
2.2. Caractéristiques physico-chimiques des margines	39
2.2.1. Mesure du pH	39
2.2.2. Solide total en suspension	40
2.2.3. Teneur en eau	40
2.2.4. Teneur en solide total (matière sèche)	40
2.2.5. Teneur en azote	40
2.2.6. Teneur en matière minérale	41
2.2.7. La matière organique	41
2.2.8. Dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu	41
2.2.8.1. Le principe	41
2.2.8.2. Expression des résultats	42
2.3. Identification des empreintes polyphénolique par CCM	42
2.3.1 .Principe	42
2.4. Evaluation in vitro des activités biologiques des polyphénols des margines	43
2.4.1.Évaluation de l'activité antioxydante (Test scavenger du DPPH)	43
2.4.1.1. Principe	43
2.4.1.2 Méthode	43
2.4.1.3. Expression des résultats	44
2.4.2. Etude de l'activité Anti-inflammatoire	44
2.4.2.1. Méthode de dénaturation de SAB	44
2.4.2.2. Evaluation de l'effet anti-hémolytique (méthode de stabilisation des membranes GR)	45
2.4.3. Evaluation de l'activité anti-coagulante	46
2.4.3.1. Préparation de pool plasmatique (standard) déplaqué	46
2.4.3.2. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie exogène	46
2.4.3.3. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène	47
2.5. Etude statistique	48
Chapitre II : Résultats et discussion	49
1. Caractérisation physico-chimique des margines	50
1.1. Mesure de pH: (potentiel hydrique)	50
1.2. L'humidité et la matière sèche	50
1.3. Solide total en suspension	51
1.4. Teneur en azote	51
1.5. Matière organique et minimale	52
1.6. Teneur en polyphénols totaux	53
2. Identification des polyphénols par CCM	55
2.1. CCM de l'extrait acétate d'éthyle (EtOAc)	55
2.2. CCM de l'extrait butanolique (n-BuOH)	57
2.3. CCM de l'extrait acétonique (Ac)	58
3. Etude des activités biologiques	60
3.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante	60
3.2. Etude de l'activité anti-inflammatoire	61
3.2.1. Méthode de dénaturation des protéines (SAB)	61
3.2.2. Evaluation de l'effet anti-hémolytique	61
3.3. Evaluation de l'activité anticoagulante	63

3.3.1. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène	63
3.3.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène	63
Conclusion et perspectives	65
Références bibliographiques	67
Annexes	85

Résumé

La production de l'huile d'olive génère des quantités énormes d'effluents nommés "Margines", qui ont peu de valeur économique en Algérie et un polluant puissant déversé dans la nature sans aucun traitement préalable mais qui pourrait être considéré comme une source potentielle de produits naturels de haute valeur additive, en raison de leur teneur en composés phénoliques et d'autres antioxydants naturels. Cette étude a pour objectif de mise en évidence des activités biologiques des polyphénols issus de ces margines (variété *chemlal*) récoltée à Khenchela. La caractérisation physico-chimique des échantillons a montré des rejets acides (pH =4,64), de couleur marron avec un taux d'humidité élevé (H= 95,45%), un teneur en solide total en suspension beaucoup plus important (STS =0,55%), riches en matières organique (MO =14 %), pauvre en matière minérale (MM=2 %), et en teneur d'azote avec 0,42g/l et en matière sèche avec 8,55g/l. Une extraction liquide-liquide a été effectuée, en utilisant l'acétate d'éthyle (EtOAc), l'acétone (Ac) et le n-butanol (n-BuOH). Le dosage des polyphénols totaux a montré une richesse des extraits EtOAc et Ac avec 80 et 70 µgEAG/mg d'extrait respectivement, et 10 µg EAG/mg pour l'extrait *n-BuOH*. L'analyse qualitative des extraits par la CCM a révélé une diversité des composés phénoliques. La capacité antioxydante résultante a montré que tous les extraits inhibent l'oxydation DPPH avec des pourcentages entre 51.82 et 90% à des très faibles concentrations, l'action anti-inflammatoire a été prouvée in vitro en inhibant la dénaturation des protéines et en augmentant la stabilité de la membrane des HRBC (Human Red Blood Cells) dont l'extrait acétonique a été le plus efficace. Les temps de Quik et Céphaline Kaolin ont été utilisés pour analyser les voies de coagulation extrinsèque et intrinsèque afin de déterminer l'activité anticoagulante. L'extrait Ac a eu le plus grand impact sur l'allongement des deux tests chronométriques.

Mots clés : Margines, polyphénols, physicochimique, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante, activité anticoagulante.

Abstract

The production of olive oil generates huge quantities of effluents called "margins", which have little economic value in Algeria and are a powerful pollutant discharged into nature without any prior treatment but which could be considered as a potential source of natural products of high additive value because of their content of phenolic compounds and other natural antioxidants. This study aims to highlight the biological activities of polyphenols from these margins (chemlalvariety) harvested in Khenchela. The physico-chemical characterization of the samples showed acidic rejects (pH = 4.64), brown color with a high moisture content (H = 95.45%), a content of total suspended solids much more important (STS = 0.55%), rich in organic matter (MO = 14%), poor in mineral matter (MM = 2%), and in nitrogen content with 0.42g/l and in dry matter with 8.55g/l. Liquid-liquid extraction was performed, using ethyl acetate (EtOAc), acetone (Ac), and n-butanol (n-BuOH). The total polyphenol determination revealed that the EtOAc and Ac extracts were rich with 80 and 70 µg EAG/mg of extract, respectively, and 10 µg EAG/mg for the n-BuOH extract. The qualitative analysis of the extracts by TLC revealed a diversity of phenolic compounds. The resulting antioxidant capacity showed that all extracts inhibited DPPH oxidation with percentages between 51.82 and 90% at very low concentrations. The anti-inflammatory action was proven in vitro by inhibiting protein denaturation and increasing the membrane stability of HRBCs (Human Red Blood Cells), of which the acetone extract was the most effective. Activated partial thromboplastin and prothrombin times were used to analyze extrinsic and intrinsic coagulation pathways in order to determine their anticoagulant activity. The Ac extract had the greatest impact on PT and aPTT lengthening.

Key-words: Margins, polyphenols, physicochemical, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, anticoagulant activity.

ملخص

يولد إنتاج زيت الزيتون كميات هائلة من النفايات السائلة، والتي لها قيمة اقتصادية قليلة في الجزائر وملوث قوي يتم تصريفه في الطبيعة دون أي علاج مسبق ولكن يمكن اعتباره مصدرًا محتملاً للمنتجات الطبيعية ذات القيمة المضافة العالية، بسبب محتواها من المركبات الفينولية وغيرها من مضادات الأكسدة الطبيعية. الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء على الأنشطة البيولوجية للبوليفينول المشتقة من هذه النفايات السائلة (نوع شمال) التي يتم حصادها في خنشلة. أظهر التوصيف الفيزيائي الكيميائي للعينات بني اللون مع درجة حموضة (pH = 4.64)، مع محتوى رطوبة مرتفع

(H = 95.45%) ، إجمالي محتوى صلب (STS = 0.55%)، غني بالمواد العضوية (MO = 14%) ، منخفض في المواد المعدنية (MM=2%) ثم تم إجراء استخراج المركبات الفينولية باستخدام أسيتات الإيثيل (EtOAc) والأسيتون

(Ac) والبيوتانول (n-BuOH) كما أظهر تحديد البوليفينول الكلي ثراء المستخلصات EtOAc و Ac ب ugEAG/mg 80 و 70 على التوالي، و 10 ug EAG/mg لمستخلص n-BuOH كشف التحليل النوعي للمستخلصات بواسطة CCM عن تنوع المركبات الفينولية. أظهرت القدرة الناتجة على مضادات الأكسدة أن جميع المستخلصات تمنع أكسدة DPPH بنسب تتراوح بين 51.82 و 90% بتركيزات منخفضة جدًا، وقد ثبت أن العمل المضاد للالتهابات في المختبر عن طريق تثبيط تشريح البروتينات وزيادة استقرار غشاء HRBC (خلايا الدم الحمراء البشرية) في مستخلص الأسيتون (Ac) أكثر فعالية. تم استخدام أوقات (TP) و (TCK) لتحليل مسارات التآثر الخارجية والداخلية لتحديد النشاط المضاد للتآثر. كان لمستخلص AC أكبر تأثير على إطالة الاختبارين الكرونومترين.

،

الكلمات المفتاحية: النفايات السائلة البوليفينول، الفيزيائية الكيميائية، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للتآثر.

Liste des tableaux

N°	Titre	Pages
01	Composition chimique d'olive selon	07
02	Les principaux composés phénoliques des margines	15
03	Principales classes des composés phénoliques	23
04	Caractéristiques physico-chimiques des margines étudiées.	50
05	Résultats du rendement des extraits obtenus.	54
06	Résultats CCM de l' <i>EtAcO</i>	56
07	Résultats CCM de l' <i>n-BuOH</i>	57
08	Résultats CCM de l'Ac	59

Liste des figures

N°	Titre	Pages
01	Les principaux processus d'extraction d'huile d'olive	12
02	Photo montrant l'acidification des margines	38
03	Photo du Rota vapeur utilisé pour sécher l'extrait phénolique brut	38
04	Forme libre réduite du DPPH	43
05	Les teneurs en humidité et en matière sèche d'échantillon de margines étudiés	51
06	Les teneurs en matières organique et minérale	52
07	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures)	53
08	Teneurs des extraits en polyphénols totaux	53
09	Photos des extraits obtenus (<i>n-BuOH</i> ; <i>EtOAc</i> ; <i>Ac</i>)	55
10	Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait <i>EtOAc</i> par chromatographie sur gel silice (révélation à 365nm)	55
11	Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait <i>EtOAc</i> par chromatographie sur gel silice (révélation à UV (254nm))	56
12	Photos des Chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait <i>n-BuOH</i> par CCM sur gel de silice à 365nm	57
13	Photos des Chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait <i>n-BuOH</i> par CCM sur gel de silice à 254nm	57
14	Photos des Chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait <i>Ac</i> par CCM sur gel de silice à 365nm	58
15	Photos des Chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait <i>Ac</i> par CCM sur gel de silice à 254 nm	59
16	Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits	60
17	Effet des extraits <i>EtOAc</i> , <i>Ac</i> et <i>n-BuOH</i> et du diclofénac sur la dénaturation de SAB	61
18	Effet antihémolytique des fractions des extraits des margines en comparaison avec un contrôle positif (aspirine).	62
19	résultats du voie exogène TP des extraits des margines	63
20	Résultats du voie endogène des extraits des polyphénols des margines	64

Liste des Abréviations

Abs	Absorbance
Ac	Extrait d'acétone
ADN	Acide désoxyribo-nucléique
AlCl3	Chlorure d'aluminium
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BSA	Albumine sérique bovine
CaCl2	Chlorure de calcium
CCM	Chromatographique sur Couche Mince
CH4	Méthane
CK	Créatine kinase
Cl-	Ions du chlore
CN	Contrôle négative
CO2	Dioxydes de carbone
COX	Cyclo-oxygénase
CP	Contrôle positif
CuSO4 +	Sulfate de cuivre
DBO	Demande biologique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
DMSO	Diméthyl Sulfoxi
DPPH	Diphényl Picrylhydrazyl (C18H12N5O6)
EtOAc	L'extrait d'acétate d'éthyle
FeCl3	Trichlorure de fer
GR	Globule Rouge.
H	Humidité
H2SO4	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HCO3-	Bicarbonate
HO	Huile d'olive
IC 50	Concentration inhibitrice médiane
K2SO4	Sulfate de potassium
Kcl	Chlorure de potassium
KH2PO4	Phosphate de potassium monobasique
LDL	Low Density Lipoproteins
LEL	Extraction liquid liquide
MADR	Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
MM	Matière minérale
MO	Matière organique
MS	Matière sèche
Na2SO4	Sulfate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
n-BuOH	L'extrait butanolique
NH4OH	Ammoniaque
PBS	Tampon Phosphate Saline
PGE2	La prostaglandine E2

Liste des abréviations

PGI2	Prostacycline
pH	potentiel Hydrique.
Rf	Rapport frontal
SFE	Extraction supercritique
SPE	Extraction phase-solide
STS	Solide total en suspension
TCK	Temps de Céphaline Kaolin
TP	Taux de Prothrombine
TQ	Temps de Quick
UASB	Upflow anaerobic sludge bed reactors
% PI	Pourcentage d’Inhibition

Introduction

Introduction

L'olivier (*Olea europaea* L.) est l'un des arbres fruitiers les plus importants des pays méditerranéens et qui est chargé de symboles : paix, victoire, force et espoir. Les produits de cet arbre, l'huile d'olive et les olives de table, sont des composants importants du régime méditerranéen (Ait-Chabane *et al.*, 2019).

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, 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).

Comme toutes les industries agro-alimentaires, l'opération d'extraction d'huile d'olive nécessite des grandes quantités d'eau. Par conséquent, cette industrie engendre des quantités importantes de déchets solides (grignons d'olive) et liquides (des margines) 3 estimés à environ 3 millions de m³ /an (Zenjari *et al.*, 2006). Selon le procédé utilisé, la quantité de margine produite peut atteindre des valeurs supérieures à 1 litre/kg d'olive (Martinez-Garcia *et al.*, 2006).

les margines sont considérées comme l'un des effluents les plus nocifs produits par les industries agro-alimentaires (Cardinali *et al.*, 2010). Ces effluents ont une forte charge saline et sont très acides, riches en matières organiques et en polyphénols peu biodégradables.

Les margines rejetées dans la nature par épandage sur les sols peuvent aussi poser des problèmes environnementaux. Par ce mode d'élimination des effluents, les eaux souterraines peuvent être polluées, ce qui affecte la qualité de l'eau potable. L'épandage des margines, très riches en éléments azotés, peut causer une pollution par les nitrates des nappes situées dans la zone ou à proximité de la zone d'épandage (Nefzaoui, 1991). Ces considérations ont conduit plusieurs chercheurs à l'échelle nationale et internationale à choisir la voie du traitement et de la valorisation des margines pour limiter leur pollution (Leger *et al.*, 2000).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude dont l'objectif essentiel consiste à explorer les caractéristiques physico-chimiques et l'identification qualitative par chromatographie sur couche mince des extraits polyphénoliques issus des margines (variété *chemlal*) récoltée à Khenchela ainsi que l'évaluation *in vitro* de ses activités biologiques.

Ce manuscrit s'articule autour de deux parties: outre l'introduction et la conclusion générale, la première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle, sont abordés des généralités sur l'oléiculture, les margines, les composés phénoliques et les activités biologiques étudiées. La deuxième partie est expérimentale divisée en deux chapitres ; le premier présente le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction, la caractérisation physicochimique, l'identification par CCM et l'évaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire et anti-coagulant des polyphénols extraits des margines, le deuxième chapitre expose les résultats obtenus et la discussion.

*Partie I: Synthèse
bibliographique*

Chapitre I

I : Généralités sur l'oléiculture

1. L'olivier

1.1. Origine et histoire

L'olive était l'un des premiers arbres fruitiers cultivés par l'homme, l'origine de l'olivier a été le sujet de plusieurs débats (**Loukas et Krimbas, 1983**). Bien que des fossiles datant de la période tertiaire (il y a 1 million d'années) aient prouvé l'existence d'un ancêtre de l'olivier en Italie (**Boskou, 1996**), il paraît certain que l'olivier existait depuis 5000 ans dans la région qui correspond à l'ancienne Perse et Mésopotamie, puis sa culture s'est étendue dans le "croissant fertile", aire englobant l'Égypte, la Syrie, la Palestine et la Phénicie (**Di-Giovacchino et al., 2002**).

L'histoire de l'olivier se confond avec celle des civilisations qui ont vu le jour autour du bassin Méditerranéen (**Rayan et Robards, 1998**). C'est ainsi que l'on a retrouvé des fossiles de feuilles d'olivier dans les gisements du Pliocène de Mongardino (Italie), des restes fossilisés dans les couches du paléolithique supérieur en Afrique du Nord, des morceaux d'oléastres et des noyaux dans les excavations de l'Enéolithique en Espagne (**Bitonti et al., 2000**).

Selon (**COI Conseil Oléicole International**) ; Les Romains ont permis ensuite une grande extension des oliveraies et un essor des échanges d'huile d'olive.

En Algérie, la culture de l'olivier remonte à la plus haute antiquité. En effet, l'huile d'olive faisait l'objet d'un commerce intense entre Algérie et Rome, durant l'époque romaine et constituait l'une des bases essentielles des activités économiques des populations rurales (**Alloum, 1987**).

1.2. L'arbre

L'olivier est un arbre à tronc droit souvent fissuré à écorce grise et aux petites feuilles opposées vertes argentées auquel le climat méditerranéen convient parfaitement (hiver doux, automne et printemps pluvieux, été chaud, sec et une grande luminosité). Il est représenté par deux espèces, sous une forme sauvage oléastre (*Olea europaea*, variété *Sylvestris*) et sous une forme cultivée, olivier (*Olea europaea*, variété *Sativa*) (**Argenson et al., 1999**).

L'olivier cultivé est un arbre ayant des feuilles vertes tout le long de l'année. Ses dimensions et sa forme varient avec les conditions climatiques, l'exposition, la fertilité du sol et la variété, il pousse dans le climat tempéré et il est également réputé pour sa grande rusticité lui permettant de s'adapter facilement aux sols rocheux, ingrats, caillouteux et arides. Une autre particularité de l'olivier est le grand développement de son port qui peut atteindre 15 à 20 m

de hauteur avec un tronc de 1,5 à 2 m de diamètre.

L'olivier bénéficie d'une longue durée de vie, il peut même être considéré comme immortel car si le tronc disparaît, des rejets reconstituent spontanément l'arbre. Il se multiplie très facilement par voie végétative ou à partir de boutures (Amoretti et Comet, 1985).

1.3. Botanique

L'olivier est le nom commun d'environ 35 espèces d'arbustes et d'arbres du genre *Olea*. Le nom est particulièrement utilisé pour l'espèce *Olea europaea*. L'origine botanique de cet arbre et le début de sa culture ont été un sujet de litige.

Parmi les espèces connues du genre *Olea*, *O. Chrysophylla*, trouvée en Asie et en Afrique, est considérée comme l'ancêtre de l'olivier. Cependant, une autre théorie existe et selon laquelle l'ancêtre est l'olivier méditerranéen sauvage, *O. oleastre*.

D'autres considèrent *O. oléastre* comme intermédiaire dans le développement de l'olivier sauvage *O. chrysophylla* à *O. europaea* (Loukas et Krimbas, 1983 ; Blazquez, 1996).

-La classification botanique de l'olivier selon (Guignard et Dupont, 2004) est la suivante :

- + Embranchement : *Spermaphytes*
- + Sous embranchement : *Angiospermes*
- + Classe : *Dicotylédones*
- + Sous classe : *Astéridées*
- + Ordre : *Lamiales*
- + Famille : *Oléacées*
- + Genre : *Oléa*
- + Espèce : *Oléa européa*

1.4. Le fruit

L'olive, est une drupe charnue ayant une forme plus au moins Ovale, à peau lisse. Elle est constituée de l'extérieur vers l'intérieur de trois parties : L'épicarpe, le mésocarpe et l'endocarpe (Fedeli, 1997).

+ **L'épicarpe** : L'épicarpe, composé de l'épiderme et de la cuticule, représente 1 à 3 % du poids du fruit. Il est constitué en plus grande partie d'acides gras accompagnés d'alcools et de leurs Esters, des composés aromatiques et des chlorophylles. Sa couleur varie du vert au début de Maturation au vert à jaunâtre, rose violacé, violet et noir à pleine maturité. Ces variations de couleur sont liées à la composition en pigments dans le fruit (Cortesi *et al.*, 2000 ; Bianchi, 2003).

+ **Le mésocarpe** : dénommé également la pulpe, représente 70 à 80 % du poids du fruit.

Il renferme dans une matrice essentiellement protéique une solution aqueuse, dont les solutés sont fondamentalement des sucres, accompagnés d'une série d'acides organiques, de phénols simples et complexes, libres ou liés aux sucres, des composants d'arômes liposolubles. Le mésocarpe renferme la plus grande partie d'huile (96 à 98 %) qui se trouve sous forme libre dans des vacuoles et sous forme liée à l'intérieur du cytoplasme (Cortesi *et al.*, 2000; Bianchi, 2003; El Antari *et al.*, 2003).

✚ **L'endocarpe** : Très caractéristique de la variété, l'endocarpe (noyau) représente 18 à 22 % du poids du fruit. Il est composé de deux sous systèmes : le premier constitué par la partie la plus externe de la graine, le second constitué par la matrice protéique, contenant la composante lipidique et la composante hydrophile (Cortesi *et al.*, 2000 ; Bianchi, 2003).

Tableau .01 : Composition chimique d'olive selon (Maillard, 1975)

Partie	Eau (%)	Lipides (%)	Protides (%)	Glucides (%)	Cendres (%)
Pulpe (épicarpe +mésocarpe)	24,2	56,40	6,8	9,9	2,66
Coque du noyau	4,2	5,25	15,6	70,3	4,16
Amandon	6,2	12,26	13,8	13,8	2,16

2. La production oléicole

2.1. La production oléicole mondiale

La consommation d'huile d'olive a presque doublé entre 1990/91 et 2020/21. Les données provisoires de la campagne 2020/21 indiquent une baisse de 4,4%, portant la consommation à 3 125 000 t. L'estimation pour la campagne 2021/22 situe la consommation à plus de 3,2 millions de tonnes. Selon les données officielles et les estimations du Secrétariat exécutif du (COI, 2021), la consommation mondiale pourrait atteindre 3 214 500 t en 2021/22, soit une augmentation de 2,9% par rapport à la campagne 2020/21. Bien que les données soient encore provisoires, la consommation mondiale de campagne 2020/21 aurait atteint 3 125 000 t, soit une baisse de 4,4%, 143 500 t de moins que la campagne précédente.

2.2. La production et le secteur oléicole Algérienne

L'olivier est l'un des arbres fruitiers méditerranéen qui occupe une place importante dans l'économie agricole, dont, la superficie dédiée au secteur oléicole, qui se répartie dans plusieurs régions : Tizi-Ouzou, Béjaia, Bouira, Boumerdas. La plupart des oliveraies sont situées dans des zones de montagne, sur des terrains accidentés et marginaux, peu fertiles. Le reste des oliveraies sont situées dans les plaines occidentales du pays. Avec plus de 500.000 hectares de terres agricoles réservées aux oliviers, l'Algérie est l'un des principaux pays producteurs d'huile d'olive dans le monde.

Selon les données officielles de **(MADR)**Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural .

Le verger oléicole en Algérie s'étend sur 431 634 Ha avec 60 632 901 oliviers. Durant ces 20 dernières années les surfaces cultivées en oliviers ont connu une grande croissance passant de 168 080 ha en 2000 à 294 200 ha en 2010 et à 431 634 ha en 2019. Soit une augmentation de 75% par rapport à 2010 et de 156,8% par rapport à 2000 Cette dernière a entraîné l'augmentation des rendements en huile d'olive, notamment avec la création des nouvelles zones productrices au sud et aux régions septiques du pays. Cependant, le nombre d'oliviers a connu également une grande évolution, il été de 16 702 610 arbres en 2000, il passe à 36 335 782 arbres en 2010 pour atteindre les 60 632 901arbres en 2019. Soit une hausse égale à 117,5% par rapport à 2010et 263 % par rapport à 2019.

En 2020, sa production a baissé à 89.500 tonnes. Les prévisions de la production nationale pour l'année 2021 sont, par ailleurs, assez pessimistes. En cause, les conditions climatiques défavorables, et surtout, les gigantesques feux de forêts qui ont ravagé cet été le nord du pays.Selon les estimations du Conseil oléicole international, bien qu'avec des données provisoires, la production mondiale de campagne 2020/21 atteindrait en Algérie de 90.000 t (-28,7%). **(COI, 2021)**.

2.3. Système d'extraction d'huile d'olive

La production d'huile d'olive a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. Les méthodes d'extraction ont évolué mais le processus d'extraction d'huile d'olive reste toujours le même. Il inclut quatre opérations principales : le nettoyage, le broyage, le malaxage et la séparation des phases liquides **(Chimi, 1997)**.

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**) ; cette opération est appelée broyage et malaxage. Cependant le broyage ne suffit pas pour briser la totalité des vacuoles, et afin de libérer le maximum d'huile, un malaxage est appliqué à la pâte.

Le broyage et le malaxage permettent d'obtenir une pâte qui contient de la matière solide (débris de noyau, épiderme, parois cellulaires, ...) et des liquide (huiles et eaux de végétations, c'est-à-dire l'eau contenue dans les cellules végétales de l'olive).

L'étape suivante consiste à séparer la partie solide (appelé grignon) de la partie liquide. Cette opération s'appelle : séparation de phases.

La dernière étape de l'extraction de l'huile d'olive consiste à séparer l'huile de végétation désignée sous terme « margines », il s'agit de la décantation. Il faut donc séparer l'huile de la margine (**Karray, 2008**).

A l'heure actuelle, trois techniques d'extractions sont mises en œuvre (**Morillo et al., 2009**):

- ✚ Procédés discontinus ou systèmes à presses.
- ✚ Procédés continus ou systèmes à centrifugation a trois phases.
- ✚ Procédés continus ou systèmes à centrifugation a deux phases.

2.4. Les principaux sous-produits de l'oléiculture

Les sous-produits de l'olivier sont donc nombreux, de compositions différentes et d'utilisations très variées suivant les différents pays :

Les grignons d'olive sont des sous-produits solides essentiellement ligna-cellulosiques contenant la pulpe d'olive et du bois mais aussi des matières grasses, des sucres, des aminoacides, des polyphénols et des sels minéraux (**Tomati et Goli, 2006**).

Les marginessont des résidus liquides des eaux usées qui sont générées lors d'extraction de l'huile d'olive vierge (**Yaakoubi et al., 2009**).Ces effluents sont composés de 40 à 50% de l'eau végétal qui provient du fruit (olive) et le reste de l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration (**Nefzaoui, 1988**).

Chapitre II

II. Les margines

1. Origine

Les margines ou eaux de végétation sont des effluents liquides générés par la fabrication de l'huile d'olives. Généralement, 40 à 50 % de ces eaux proviennent du fruit (eau de végétation), le reste de l'eau ajoutée pendant la trituration. Ces effluents présentent une source de nutriments (sels minéraux : potassium, sodium, magnésium, etc.) et de matière organique (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines, etc.) bénéfique pour l'amélioration de la fertilité des sols et de la productivité des cultures. Cet effluent liquide, caractérisé par une intense couleur brun-violet ou brun-rouge à noir et une odeur de l'huile d'olive (**Yakoubi et Aghanchich, 2021**)

La composition typique de ces effluents végétaux est constituée de 83 à 94% d'eau, de 4 à 16% de composés organiques et de 0,4 à 2,5% de sels minéraux.

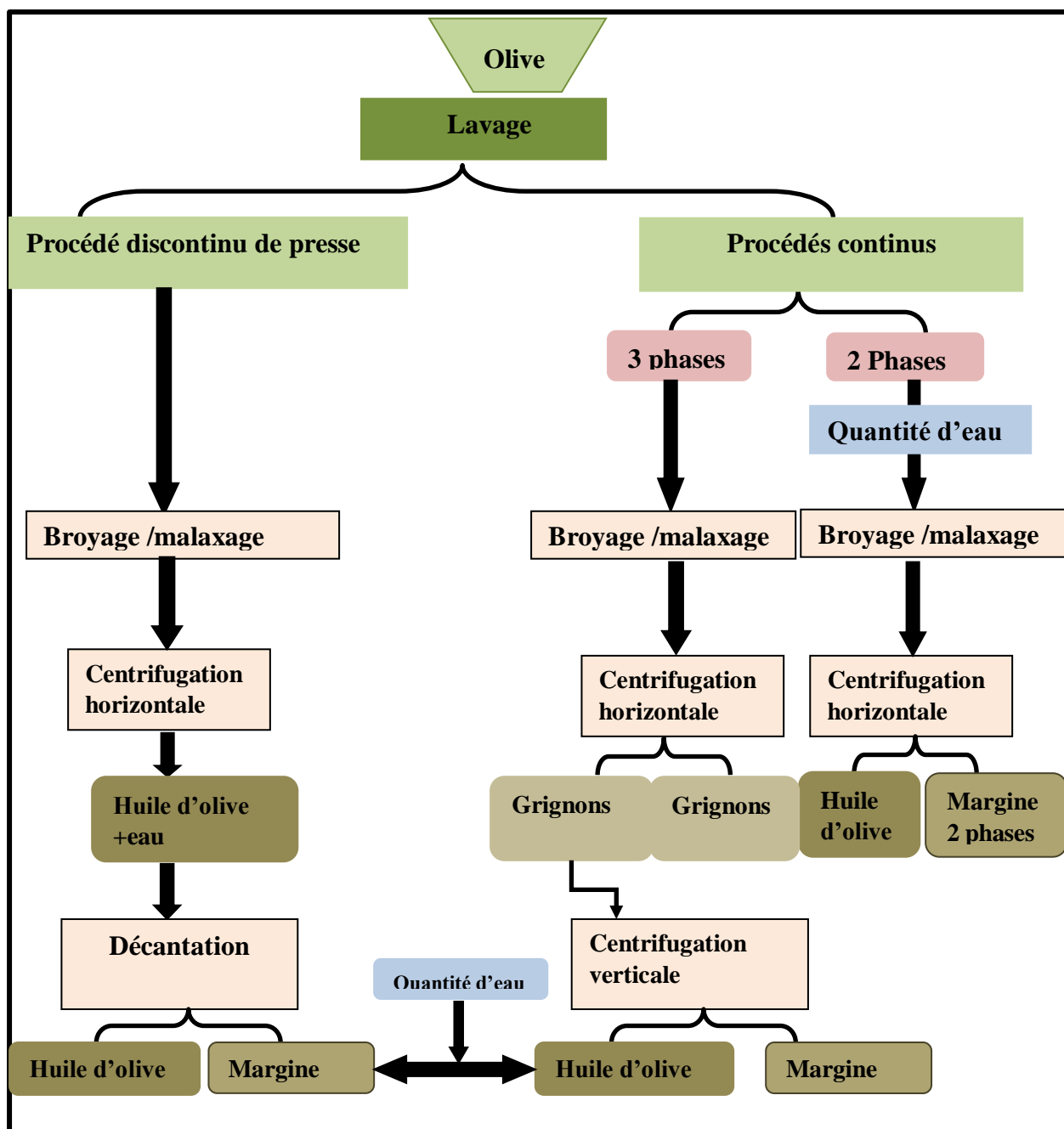


Figure.01 : Les principaux processus d'extraction d'huile d'olive (Aggoun, 2016)

2. Caractérisation physico-chimique des margines

Ces déchets liquides, Constitués de 83 à 96% d'eau, sucre, substances azotés, acides organiques, polyphénols, polyalcools, pectines, mucilages, tanins et substances inorganiques. (Zghari *et al.*, 2018).

La caractérisation physico-chimique des margines est généralement tributaire des techniques et

des systèmes retenus pour l'extraction d'huiles d'olives et diffère d'un pays à l'autre. En général, les margines présentent une composition chimique très complexe et hétérogène. De ce fait, le rejet de ces effluents dans les rivières et les égouts sans aucun traitement préalable pose de sérieux problèmes pour le système aquatique (**Sayadi et al., 2000**). Leur effet nocif dérive en grande partie de leur contenu en composés phénoliques qui peuvent inhiber la croissance des microorganismes, spécialement les bactéries (**Capasso et al., 1995**), ce qui diminue la décomposition biologique naturelle. Ces considérations nous ont conduits à penser à traiter ces effluents avant leurs rejets dans la nature et même leurs valorisations par la production des phénols et leur bioconversion en additifs agroalimentaire.

2.1. Fraction minérale

Les margines contiennent des quantités significatives de sels minéraux (**Ranalli, 1991**). Dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates). Les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%) (**Fiestas Ros d'Ursinos et Borja, 1992**).

2.2. Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques : une fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives qui représente la matière en suspension et colloïdale et une fraction soluble dans la phase aqueuse qui contient les sucres, les lipides, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques et les composés phénoliques (**Obied et al., 2005**).

2.2.1. Les glucides

Ils jouent un rôle important dans la texture des olives où ils représentent environ 0,6 % du poids de la pulpe fraîche (**Capasso et al., 2002**). Les sucres représentent entre 4,1 et 4,8 % du poids total des margines pouvant se répartir comme suit : arabinose (62-71%), galactose (17-25%), rhamnose (2-3%), xylose (12%), glucose (1%) (**Dermeche et al., 2013**).

2.2.2. Les composés azotés

La fraction azotée est représentée principalement par les protéines avec une concentration variant entre 1,2 et 2,4%. Tous les acides aminés contenus dans les margines ont été identifiés. Les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, laproline et la glycine. (Tsioulpaset *al.*, 2002).

2.2.3. Les vitamines

Plusieurs vitamines ont été identifiées. Les plus fréquentes sont les vitamines du groupe D et la vitamine PP avec une concentration de 124 mg.kg⁻¹ de margines (Salvemini, 1985). Cette teneur peut être exploitée à l'échelle industrielle.

2.2.4. 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 utilise, elle varie entre 0,02 et 1%. (Salvemini, 1985).

2.2.5. Les huiles

La concentration d'huile résiduelle contenue dans les margines est très variable selon le Procédé d'extraction utilisé. Elle varie entre 0,02 et 1% (v/v) (Fiestas Ros d'Ursinos et Borja, 1992). L'acide oléique est l'acide gras le plus abondant avec un pourcentage de 65% par rapport à la totalité d'huile (Ranalli, 1991).

2.2.6. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, (Bruneton, 2009). La structure de ces composés varie, des molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules hautement polymérisées (tanins condensés) (Hopkins, 2003).

Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines (Ranalli, 1991). Dans les margines, peuvent contenir plus de 30 composés phénoliques (Tuck *et al.*, 2002 ; Paraskeva *et al.*, 2007).

La teneur en composés phénoliques dans les margines dépend du système d'extraction de l'huile d'olive (Annaki *et al.*, 1999). En général, la teneur en composés phénoliques varie entre

2 et 6 g/l (Tsioulpas, 2020). Et elle peut même dépasser les 9g/l (Kissi, 2001). Plus de 50 composés phénoliques et plusieurs alcools ont été identifiés (Casa et al., 2003). La composition des margines en composés phénoliques diffère aussi selon la procédure d'extraction et la variété d'olive traitée (Ramos, 1986). Il s'agit de monomères aromatiques et de composés phénoliques à haut poids moléculaire (Lafka, 2010). Les acides et les alcools phénoliques sont le groupe le plus vaste et le plus répandu dans les margines. Le catécholmélaninique est un flavotanin, il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines (Aissam, 2003).

Tableau.02 : Les principaux composés phénoliques des margines

Les différents types des polyphénols			
Monomères aromatique		Composés phénoliques a haut poids moléculaires principalement les Tanins	
Acides phénolique	Alcools phénoliques	Tanins hydrolysables	Tanins condensés (Flavotanins)
-acide caféique -acide p-coumarique -acide protocatéchuique -acide vinylique -acide 4-hydroxyphénylacétique -Acide syringique	4-Hydroxyphényléthanol -3,4-dihydroxyphényléthanol -Syringaldéhyde	-Ester d'acides phénoliques -Ester d'acides phénoliques et sucres -Glucosides	Le catécholmélaninique

3. Impact des margines sur l'environnement et traitement

3.1. Impact des margines sur l'environnement

Les margines non traitées constituent un problème écologique majeur pour les pays producteurs d'huile d'olive en raison de leur charge organique toxique élevée, de leur faible pH, de leur DCO élevée (jusqu'à 110 g/L) et de leur demande biologique en oxygène élevée (DBO jusqu'à 110 g/L). (jusqu'à 110 g/L) et d'une demande biologique en oxygène élevée (DBO jusqu'à 170 g/L) (Stasinakis et al., 2008). Les margines peuvent entraîner de graves dommages

environnementaux, allant de la coloration des eaux naturelles et la toxicité pour la vie aquatique à la pollution des eaux de surface et souterraines, l'altération de la qualité du sol, la phytotoxicité et les nuisances olfactives. Les grands volumes des margines produits et la longue période de production de l'huile d'olive aggravent ces dommages environnementaux entre novembre et mars dans les pays oléicoles méditerranéens où les margines de l'oléiculture sont déversées sans traitement dans l'environnement.

3.1.1. Pollution du sol

L'épandage directe des margines sur le sol est l'origine de nuisances diverses, leur pH acide, leur salinité élevée ainsi que leur abondance en composés phénoliques provoquent la destruction de la microflore du sol et induisent des effets toxiques aux cultures végétales (**Fiestas Ros, 1981**). Ceci entraîne la stérilisation du sol et le déséquilibre de la symbiose entre la microflore du sol et les plantes (**Morisot et Tournier, 1986**).

3.1.2. Pollution de l'air

Si les margines sont stockées dans des réservoirs ouverts et/ou déversées sur le sol ou dans des eaux naturelles, elles peuvent subir une fermentation et émettre des polluants, ils peuvent subir une fermentation et émettre du méthane et d'autres gaz piquants comme le sulfure d'hydrogène, créant ainsi une forte pollution (**Niaounakis et Halvadakis, 2004**) olfactive. Sachant que la région méditerranéenne représente 95 % de la production mondiale des margines. Dans touristiques et archéologiques, la pollution atmosphérique a parfois des impacts négatifs sur les activités économiques.

Les prétraitements pour éliminer les odeurs peuvent inclure le chaulage, qui réduit considérablement la charge organique et précipite les organique et précipite les solides contenus dans les margines (**Angelakis, 2006**)

3.1.3. Pollution des eaux

Souvent rejetés dans des récepteurs naturels sans aucun traitement préalable, les margines nuisent fortement à la qualité des eaux de surfaces. La coloration des eaux naturelles due aux tannins est l'un des effets les plus visibles de la pollution. Les margines déversées dans l'eau réduisent sa disponibilité en oxygène. Ce phénomène est accentué par la forte concentration des sucres réducteurs, qui peuvent stimuler la respiration microbienne, ce qui induit un déséquilibre de la totalité de l'écosystème (**Kapellakis et al., 2006**). A forte teneur en phosphore, les margines peuvent mener à l'eutrophisation (**McNamara et al., 2008**). Les lipides forment un

film sur la surface des eaux, ce qui empêche la pénétration de la lumière du soleil et l'oxygène, inhibant ainsi la croissance des plantes. Les effets environnementaux négatifs comprennent aussi la décomposition et, par conséquent, l'hypoxie, qui induisent des réductions dans d'autres populations animales (poissons). L'épandage des effluents d'huileries d'olive, très riches en éléments azotés, sur les sols peut également poser des problèmes environnementaux. En effet, les nitrates peuvent polluer les nappes situées dans ou à proximité de la zone d'épandage et souiller la qualité de l'eau potable (**Benyahia et Zein, 2003 ; Fki et al., 2005**).

3.2. Traitement des margines et valorisation des margines

3.2.1. Traitement des margines

Le traitement des margines constitue un problème complexe; 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 (**Leulmi, 2011**).

3.2.1.1. Traitement chimique :

Oxydation humide :

On procède à l'oxydation des substances organiques en phase liquide, en se servant de l'oxygène ou d'un autre oxydant chimique tel que (ozone ou peroxyde d'oxygène). Le procédé se fait à hautes pressions (10 à 220 Bars) et à des températures relativement élevées (120-330°C), le procédé d'oxydation fournit du CO₂ et H₂O ; mais ce procédé nécessite aussi un traitement aérobie. Malgré son efficacité, ce traitement n'a pu être réalisé à l'échelle industrielle son coût d'investissement reste trop élevé (**Boudoukhana, 2008**).

3.2.1.2. Traitement biologique

Les techniques de traitement biologique des margines basées sur les processus aérobie et anaérobie à l'aide des microorganismes (bactéries, champignons, levures) pour oxyder et dégrader la matière organique polluante en métabolites simples (CO₂, CH₄ et les composés aliphatiques). Cependant, l'effet antioxydant des polyphénols reste le facteur limitant pour ces procédés (**Fountoulakis et al., 2002**).

La transformation aérobie

Plusieurs auteurs ont montré la possibilité de traiter les margines microbiologiquement et de produire des biopolymères tels le xanthane (**Lopez et Ramos-Cormenzana, 1996**), le pullulane

et les polyhydroxyalcanoates (**Gonzalez-Lopez et al., 1995**). Ces traitements se focalisent sur la dégradation des composés phénoliques, qui sont le facteur principal responsable de la phytotoxicité des margines. Plusieurs microorganismes ont été testés : des champignons : *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* et des levures : *Yarrowia Lipolytica*, etc. (**Tomati et al., 1991 ; Ramos-Cormenzana et al., 1996; Scioli et Vollaro, 1997, Ben-Sassi, 2007**). L'utilisation des margines en tant que substrat pour la croissance d'*Azotobacter vinelandii* et l'application d'effluents traités à des sols cultivés comme fertilisant a été proposé par (**Ehaliotis et al., 1999 ; Piperidou et al., 2000**). Toutes ces méthodes intéressantes d'un point de vue scientifique n'ont pas connu d'application à grande échelle.

✚ La digestion anaérobie

Outre le traitement des effluents, l'intérêt principal de la digestion anaérobie est la production de l'énergie (biogaz) et l'utilisation subséquente des effluents à des fins d'irrigation (**Marques, 2001**). La limitation majeure de ce traitement est l'inhibition des bactéries méthanogènes par les composés phénoliques et les acides organiques présents dans les margines (**Hamdi, 1996**). Les filtres anaérobies ou les digesteurs UASB (upflow anaerobic sludge bed reactors) seraient appropriés pour traiter les margines, après une étape de prétraitement éliminant certains composés indésirables dont les composés phénoliques. (**Azbar et al., 2004**).

4.2.1.3. Traitement physique

✚ **Procédé des membranes** : Les procédés à membranes comme l'ultra filtration et l'osmose inverse, s'emploient souvent dans le traitement de certains courants liquides résiduaux, ceci permettant d'éliminer les polluants de l'eau en générant un courant liquide et un courant concentré (**Boudoukhana, 2008**).

✚ **Procédé de bio filtration** : Ces procédés s'emploient fréquemment pour éliminer les solides des eaux résiduaux. Les solides contenus dans l'eau sont retenus en formant un tourteau qui augmente la résistance au passage du déchet, augmentant en même temps l'efficacité de la filtration et aussi le coût opérationnel. Dans les filtres conventionnels, les composés dissous passent avec le déchet aqueux et restent à l'état brut. Cependant, les procédés de bio filtration sont une exception, dans ce cas le filtre, le filtre sert en plus de nutriment pour les bactéries, donnant lieu à un procédé de dégradation biologique des substances organiques dissoutes. Les installations de bio filtration éliminent 100% les solides et entre 70-80% des composés organiques dissous. Procédé pilote (université de TOULOUSE): le procédé de bio filtration exige que l'on puisse fournir d'une manière ou d'une autre la quantité d'oxygène nécessaire pour

réaliser le procédé aérobie, le lavage du filtre fournit un concentrât qui est parfaitement utilisable dans les champs de culture.

Les principaux avantages : rétention des solides, élimination d'une grande partie des composés organiques dissous. Les principaux inconvénients : engorgement du filtre et le pouvoir polluant élevé du concentrât (tourteau) résultant, coût d'investissement trop élevé, une variation ou alternative à la bio filtration est l'adsorption (**Boudoukhana ,2008**).

✚ **L'adsorption** : L'adsorption consiste en la concentration du polluant organique dans un support solide avec une grande superficie spécifique, généralement du charbon actif (500—1500 m²/g). Dans le traitement des margines, le principal objectif de l'adsorption est celui de biodégrader les composés organiques ayant des effets bactéricides, inhibiteurs ou colorants (tanins -phénols-- -) ; Les principaux avantages de l'adsorption tiennent à la faible pollution que génère ce type de traitement sur le sol, dans l'air ou l'eau et à la nécessité réduite du personnel qualifié. Les principaux inconvénients sont l'impossibilité de réutilisation du charbon actif, qui, toutefois, du fait de son pouvoir calorifique élevé, peut être employé dans des procédés de combustion, et la nécessité de faire un prétraitement (**Boudoukhana, 2008**).

3.2.2. Valorisations 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**). Cette valorisation a pour objectif l'élimination des composés phénoliques d'une part et l'utilisation des margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie et de l'agriculture d'autre part (**Levis-Menzi et al., 1992**).

Il y'a plusieurs méthodes différentes de valorisation des margines :

- ✚ Production de biogaz
- ✚ Compostage des margines
- ✚ Production des protéines d'organismes unicellulaires (POU)
- ✚ Production d'enzymes
- ✚ Epannage.
- ✚ Utilisation en alimentation animale

Malgré les multiples procédés testés pour le traitement et la valorisation des margines, seulement quelques-uns sont appliqués à l'échelle industrielle en raison du coût élevé des installations. En plus, les résultats obtenus 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 (**Halal,2003**)

Chapitre III

III. Les composés phénoliques

1. Généralités

Les composés phénoliques, sont synthétisés par les plantes en réponse au stress de l'environnement, particulièrement provoqué par un climat chaud et l'exposition prolongée des cultures aux rayonnements solaires qui est une caractéristique du bassin méditerranéen. Ce sont les produits du métabolisme secondaire des plantes, ils fournissent des fonctions essentielles dans la reproduction et la croissance des plantes, agissant dans les mécanismes de défense contre les pathogènes, parasites et les prédateurs, de même ils contribuent à la coloration des plantes. En plus de leurs rôles dans les plantes, les polyphénols suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies chroniques (Liu, 2007) et des maladies liées au vieillissement : Infarctus du myocarde, cancers, maladies neurodégénératives (Hannebelle *et al.*, 2004).

Les polyphénols regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants (Bamforth, 2000). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Dalton, comme les tannins (Hagerman *et al.*, 1998 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

2. Définition

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux ; ils appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix *et al.*, 2005). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

3. Classification des composés phénoliques

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de

noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient. On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes (**Boros, 2010**). En plus de cette diversité, les phénols sont présents naturellement sous forme conjuguée : avec des sucres, des acides organiques, entre eux. Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes.

- ✚ Les phénols simples (C₆) : un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C₆-C₁).
- ✚ Les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆): 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.
- ✚ Les tanins hydrolysables et non-hydrolysables.
- ✚ Les stilbènes (C₆-C₂-C₆).
- ✚ Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane.
- ✚ Autres phytoestrogènes
- ✚ Les saponines (triterpénoïdes)
- ✚ Les phytostérols et les phytostanols (**Paraskevi et Moutsatsou, 2007**).

Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates, qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates (**Dacosta, 2003**). On peut résumer les différentes classes des composés phénoliques dans le tableau 03:

Tableau.03 : Principales classes des composés phénoliques ((**Macheix et al., 2005**))

Squelette carboné	Classe
C ₆	Phénols simples
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques
	Coumarines
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes
	* Flavonols
	* Anthocyanes
	* Flavanols
	* Flavanones
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes

$(C_6-C_3)_n$	Lignines
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés

4. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergiques, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001). Ils permettent de prévenir et de traiter les maladies cardiovasculaires, les cancers, le diabète, les maladies neurodégénératives, l'inflammation et le vieillissement. et jouent aussi un rôle important dans le renforcement du système immunitaire et la protection de certains tissus et organes contre les dommages oxydatifs : cerveau, foie, globules sanguins, muscles et artères (Benlemlih et Ghanam, 2012).

5. Procédés d'extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols s'effectue généralement au moyen des solvants appropriés tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, le NN-diméthylformamide, l'éther diéthylique (Turkmen *et al.*, 2007; Leonardis *et al.*, 2008) soit à partir d'un solide (ex: matière première végétale) dont l'objectif est de libérer les polyphénols présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion, ou à partir d'un liquide tel que le plasma, les urines, les eaux usées, les margines. Ces dernières subissent une délipidation préalable, pour éliminer la totalité des lipides et faciliter l'extraction. L'efficacité de l'extraction au solvant est influencée par la nature du solvant, le pH du milieu d'extraction qui détermine le degré de solubilité des substances solubles, la température (25-55°C), le nombre d'extraction et le volume du solvant utilisé ainsi que la taille et la forme des particules. Les différents types d'extraction des composés phénoliques à partir des margines et de l'huile d'olive sont

- ✚ Extraction liquide-liquide (LEL) au solvant, généralement l'acétate d'éthyle.
- ✚ Extraction phase-solide (SPE): c'est une technique pour fractionner/purifier encore pour pré-concentrer des composés présents dans des matrices liquides. Elle se fait généralement par élution avec un solvant approprié sur cartouche C (Bendini *et al.*, 2003), sur l'amberlite (échangeuse d'ions), et sur résine adsorbante (Yangui *et al.*, 2009).

✚ Extraction supercritique (SFE) : le CO₂ supercritique est très utilisé comme solvant d'extraction (Floch *et al.*, 1998).

✚ Technique de filtration membranaire: MicroF, UF et NanoF utilisées pour fractionner et concentrer les composés phénoliques.

6. Effets biologiques des polyphénols

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique (Crozier *et al.*, 2010). De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires, Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose. En 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. Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères (Manachet *et al.*, 2005). Ils sont regroupés dans la catégorie de veinotoniques et des vasculo-protecteurs (Ghosh *et al.*, 2009). Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des antiagrégants plaquettaires ou hypotenseurs sans résultats probants (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée positivement avec la teneur en composés phénoliques (Bahorun, 1997). Ces composés montrent des activités antioxydantes (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006; Xiuzhen *et al.*, 2010), anticarcinogènes, antiinflammatoires, antiathérogènes, antithrombotiques, analgésiques, antibactériennes, antiviraux (Babar-Ali *et al.*, 2007), anti allergènes, vasodilatateurs (Falleh *et al.*, 2008 ; Hodgson., 2010).

7. Valorisation des composés phénoliques

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

✚ En agro-alimentaire

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

et antioxydant.

En cosmétologie

Macheix (2005) a montré que l'intérêt des composés phénoliques en cosmétologie est lié aux propriétés antioxydantes, leur capacité de chélater les métaux, pouvoir anti- inflammatoire, effet antimicrobien et l'intervention sur l'activité de nombreuses enzymes. Ils permettent de lutter contre le vieillissement cutané en tant que molécule anti-radicalaire et en tant que protecteur des protéines de la peau comme l'élastine et le collagène.

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

En phytothérapie

Les éventuels bénéfices que pourraient apporter à la santé humaine les composés phénoliques intéressent particulièrement le domaine de la phytothérapie, puisque l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes. Des effets protecteurs de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis-à-vis de différentes pathologies (maladies cardiovasculaires, cancers, diabète...) ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental. De nombreuses études se sont penchées sur l'analyse du mode d'action des polyphénols dans la prévention de ces pathologies, qui met en cause les propriétés réductrices des composés phénoliques (**Ghedira K, 2005**).

Chapitre IV

IV. Les activités biologiques étudiées

1. Activité antioxydante

Les composés phénoliques sont parmi les antioxydants les plus puissants, ceci grâce à leur capacité importante de piéger les radicaux libres et les espèces oxygénés réactives et également de réduire et de chélater les ions de transition. L'activité antioxydante est considérée comme la capacité à piéger les radicaux libres, par rapport d'un atome d'hydrogène ou d'un électron et la stabilisation des espèces formées. Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante dans le système biologique in vitro mais il reste très compliqué in vivo. Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron. Parmi ces techniques, nous citons:

- ✚ La méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle),
- ✚ La méthode TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox),
- ✚ La méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants),
- ✚ La méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène),
- ✚ La méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) (Sebti, 2018).

1.2. Activité anti-radicalaire contre le DPPH

Le DPPH (ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un composé cristallin violet que l'on peut conserver plusieurs mois à l'abri de la lumière (Garcia *et al.*, 2012)

Est un radical stable permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits. Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle. La réduction du DPPH° est facilement mesurée par spectrophotométrie à 515 nm (λ_{max} DPPH°). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant (Milardović *et al.*, 2006).

1.2 Activité antiradicalaire contre l'ABTS*

Il est basé sur la capacité du composé à réduire le cation radicalaire ABTS +•, le composé à tester est ajouté au radical pré-formé, l'absorbance résiduelle du radical ABTS+• est mesurée à 734 nm. L'activité des composés est alors exprimée par la capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC). Ce radical est utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant de fluides biologiques, de mélanges complexes ou de composés purs. Il est capable de réagir avec des antioxydants Classiques de type phénols et thiols, mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron (Re *et al.*, 1999) .

1.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Capacités réductrices ferriques d'antioxydants, cette méthode d'évaluation du potentiel antioxydant repose sur une mesure colorimétrique du transfert d'électrons d'un antioxydant vers un accepteur d'électron, elle est consisté à réduire les ions ferrique Fe^{3+} [(Fe(III)-TPTZ] de couleur jaune aux ions ferreux Fe^{2+} [(Fe(II)-TPTZ] de couleur vert-bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron (**Benzie et Strain, 1996**).

2. Activité anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire des trois extraits a été démontré *in vitro* en utilisant la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (Sérum Albumin Bovin) et la méthode anti-hémolytique, qui teste la stabilité de la membrane des globules rouges humains.

2.1. Inflammation

L'inflammation est un processus de défense immunitaire de l'organisme en réponse à une agression d'origine exogène (brûlure, infection, allergie, traumatisme) ou endogène (cellules cancéreuses ou pathologies auto-immunes), dont le but d'éliminer l'agent pathogène, réparer les lésions tissulaires et favoriser le retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (**Barton, 2008**).

2.2. Les anti-inflammatoires (AI)

2.2.1. Les anti-inflammatoires d'origines médicamenteuses

a. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : Ce sont des médicaments dépourvus de noyau stéroïde, ayant une action anti inflammatoire, antalgique et antipyrétique. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont comme principal mode d'action l'inhibition de la synthèse des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation, par inhibition d'une enzyme : la cyclo-oxygénase (COX) (**Risseret al., 2009**).

b. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) : Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou corticoïdes sont des produits pharmaceutiques qui traitent les inflammations. L'anti-inflammatoire stéroïdien constitue une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol (**Faure, 2009**). Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la trans-activation (processus qui conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes) et la trans-répression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de réprimer quel système immunitaire (**Ferradji, 2011**).

2.2.2. Les anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre des composés phyto-chimiques trouvés dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phyto-chimiques ont des propriétés anti inflammatoires, beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclo-oxygénase et la lipo- oxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (**Han et al., 2007**).

2.3. Activité antihémodolytique

2.3.1. Généralités

Le sang est un liquide vital visqueux et fluide de pH compris entre 7.35 et 7.45, qui coule dans les artères et les veines, pèse 8% du poids corporel humain et son volume varie de 5 à 6 L chez l'homme et de 4 à 5L chez la femme. Il est composé de cellules représentant les éléments figurés du sang en suspension dans une matrice extracellulaire liquide, le plasma. Ce dernier représente 55% du volume sanguin. Les cellules sanguines occupent 45% du volume sanguin total chez l'adulte. On peut distinguer 3 catégories de cellules variant par leur morphologie et leur fonction ; les thrombocytes (plaquettes), les leucocytes (globules blancs) et les érythrocytes (les globules rouges) (**Béraud, 2014**).

2.3.2. Processus d'hémolyse

2.3.2.1. Hémolyse physiologique

L'accumulation de modifications de la membrane du globule rouge au cours du vieillissement (péroxydation lipidique membranaire, perte de résidus d'acide sialique et formation de néoantigènes de sénescence) sont autant de signaux qui permettent aux macrophages d'identifier les globules rouges à éliminer par phagocytose avec réutilisation des composants (**Beaumont et Canonne-Hergaux, 2005**). L'hémolyse (hémo : sang ; lyse : perturbation) est un phénomène physiologique irréversible qui aboutit à la rupture de la membrane des hématies provoquant la libération des éléments intra-érythrocytaires dans le plasma notamment l'hémoglobine, Ce phénomène est détecté visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans l'échantillon après centrifugation ou en mesurant la densité optique de surnageant (hémoglobine) par spectrophotométrie (**Mezzou et al., 2006**). L'hémolyse est manifestée par une augmentation des taux sériques en hémoglobine associée à une augmentation du lactate déshydrogénase (LDH), de phosphate et de la créatine kinase (CK) (**Ali et al., 2014**), et aussi par une diminution du taux d'haptoglobine et d'hémoglobine glycosylée. L'hémoglobine libérée lors de l'hémolyse est dégradée en bilirubine non conjuguée, ou bien sous forme d'un complexe avec l'haptoglobine qui est éliminée rapidement par le foie (**Marchand et al., 1980**).

2.3.2.2. Hyperhémolyse

L'hyperhémolyse est le dépassement du processus physiologique de lyse des GR qui devient pathologique, ce phénomène est dû à une destruction excessive des hématies ou à un raccourcissement de leur durée de vie. Il peut se dérouler dans les vaisseaux (intravasculaires), l'hémoglobine libérée se lie alors à l'haptoglobine. Comme, il peut se manifester hors des vaisseaux (extravasculaires), notamment au niveau de la rate (**Béraud, 2014**). Un déséquilibre dans les proportions des radicaux libres générés et le répertoire antioxydant inhérent au système explique la diminution de la durée de vie des globules rouges pendant de nombreuses pathologies hyperhémolytiques (**Hebbani et al., 2014**).

2.3.3. Les types des anti-hémolytiques

2.3.3.1. Anti-hémolytiques classiques

L'anémie hémolytique est un sujet relativement complexe qui demande obligatoirement une investigation spécialisée pour déterminer des traitements appropriés, il y a autant de traitements qu'il y a de causes. Un certain nombre de substances synthétiques anti-hémolytiques qui réduisent l'hyper-hémolyse, sont disponibles. Le choix du traitement se porte notamment sur la prescription de fer, de vitamine B12 et d'acide folique. (**Federici et al., 2007 ; Leporrier, 2008**).

3. Activité anticoagulante

3.1. Généralités sur la coagulation

L'hémostase regroupe différents mécanismes qui assurent la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies en cas de rupture de la continuité de la paroi vasculaire et la réparation de la brèche vasculaire. Elle comprend différentes étapes : vasoconstriction, adhésion, agrégation plaquettaire et coagulation (**Kramoroff, 1999**). La coagulation est activée lors d'une brèche vasculaire, pour consolider l'agrégat plaquettaire afin de colmater la brèche et arrêter le saignement du sang (**Lemaoui, 2011**), par l'activation en chaîne de facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs (**Chalal et Chibout, 2017**).

3.2. Mécanismes de la coagulation

La coagulation plasmatique consiste en une cascade enzymatique (**Patrick, 2002**):

3.2.1. Formation de la prothrombinase

Elle résulte de l'association, sur une matrice de phospholipides, du facteur Stuart (Xa), de la proaccélélerine (Va) et de calcium. L'association de ces facteurs peut être déclenchée par deux

mécanismes (Patrick, 2002).

✚ Voie exogène

C'est le contact du plasma et du facteur tissulaire avec le facteur VIIa qui va entraîner l'activation du facteur X. celui-ci va alors former la prothrombinase en s'associant au facteur Va en présence de Ca^{2+} (Patrick, 2002).

✚ Voie endogène

Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII lors de ce contact aux matrices sous-endothéliales, une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kallikréine qui à son tour peut activer le facteur XII. Le facteur XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX. Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes par l'intermédiaire des ions calcium et forme, en présence de son cofacteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X. Cette dernière forme avec son cofacteur, le facteur V (pro-accélérine), les phospholipides plaquettaires et par l'intermédiaire aussi des ions de calcium le complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine (facteur II) en thrombine (Tili, 2015).

3.2.1.1. Formation de la thrombine

Elle résulte de l'action de la prothrombinase sur la prothrombine (Patrick, 2002).

3.2.1.2. Formation de la fibrine

La thrombine formée catalyse la conversion de fibrinogène en monomères de fibrine qui s'associent les uns aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibreux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibreux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (Tili, 2015). L'activité anticoagulante des extraits et de leurs principaux constituants a été évaluée in vitro vis-à-vis des deux voies de la coagulation (la voie endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux déplaquetés et à l'aide de deux tests chronométriques globaux, le test de temps de décaphtaline-kaolin et le test de temps de Quick (Rouba, 2012).

Partie Expérimentale

Chapitre I
Matériels et méthodes

I. Matériel et méthodes

Le travail expérimental, ayant pour objet la caractérisation physicochimique des margines et l'évaluation *in vitro* des activités biologiques des polyphénols issus de ces margines à savoir : l'activité antioxydante, anti-inflammatoire via l'effet antihémolytique et la méthode de dénaturation du Sérum Albumin Bovin (SAB) et l'activité anticoagulante. La partie expérimentale a été effectuée au sein du laboratoire pédagogique de biologie, Université Abbés Laghrour – Khenchela et l'Hôpital Ahmed Ben Bella –Khenchela–Polyclinique Hamou Bouchwareb–Khenchela.

1. Matériel

1.1. Collecte des margines

Les margines utilisées pour l'épandage dans notre travail ont été prélevés à partir du bassin de décantation d'une l'huilerie moderne à trois phases située dans la région de Baghai-Khenchela. L'échantillon des margines utilisés dans cette étude de variété «chemlal» récoltée durant la campagne oléicole 2021 / 2022. Dans bidon de 5L couvrés, les margines ont été conservées à l'obscurité et à une température de 4° C au laboratoire, pour garder leurs caractéristiques physico-chimiques jusqu'au leur utilisation.

1.2. Echantillons du sang

Un seul échantillon de sang a été recueilli à partir d'une personne saine pour L'évaluation de l'activité anti hémolytique et anticoagulante des extraits.

1.3. Médicaments

Deux médicaments ont été utilisés comme contrôle positif pour l'évaluation des activités anti hémolytique et anticoagulante :

- Le médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI pour l'activité anticoagulante
- Le médicament anti hémolytique «Aspirine » de concentration 100 mg pour l'activité anti hémolytique.

1.4. Réactifs chimiques

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits :FeCl₃,HCl, acideacétique,NaOH,NH₄OH,Kcl,NaCl,AlCl₃,Diméthylesulfoxyde (DMSO),chloroforme,toluène, acétone, éthanol, dichloro méthane,Folin-Ciocalteu,trichlorure de fer, Diphénylpicryl-hydrazyl ,carbonate de sodium ,trichlorure d'aluminium ,méthanol ,n-

Butanol , éther de pétrole,acétate d'éthyle,acide sulfurique,ammoniaque,tampon phosphate, acide ascorbique, acide gallique ,acide chlorique,KH₂PO₄,SAB,Wagner et des plaques CCM.

1.5. Appareillages

Parmi l'appareillage utilisé: Rota vapeur (**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**),

2. Méthodes

2.1. Extraction des polyphénols des margines

Le traitement des margines et l'extraction liquide-liquide des phénols ont été faits selon la méthode décrite par (**DeMarco et al., 2007**) avec quelques modifications.

2.1.1. Traitement des margines

Avant de procéder à l'extraction, il est souhaitable de faire une acidification, puis une délipidation des margines à l'aide d'un solvant extracteur.

L'acidification consiste à favoriser la précipitation des protéines, la libération des biophénols liés aux composants de la paroi cellulaire, et l'élévation de la solubilité des composés phénoliques dans les solvants organiques (**Obied et al., 2005**). Elle provoque une hydrolyse du complexe des composés phénoliques, et en conséquence, la libération des monomères phénoliques, et donc une augmentation de la concentration des phénols totaux trouvés dans un extrait de margine acidifiée par rapport à un extrait de margine fraîche (sans acide) (**Marco et al., 2007**).

Selon (**Greco et ses collègues., 1999**) les acides ont le pouvoir de flocculer les espèces à haut poids moléculaire des margines. 484 ml des margines sont acidifiées à pH 2 avec quelques gouttes de l'acide chlorhydrique (6N) et mélangées avec 494 ml d'éther de pétrole, le mélange est mixé vigoureusement dans une ampoule à décanner et centrifugé à 3000 t/min pendant 5 min dans le but d'enlever la fraction lipidique. La phase éther pétrolière est séparée et la délipidation est répétée deux fois successivement.



Figure.02 : Photo montrant l'acidification des margines

2.1.2. Extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle

120 ml des margines préalablement délipidés sont mixées avec 120 ml d'acétate d'éthyle, le mélange est secoué vigoureusement dans une ampoule à décanter (15 min) puis centrifugé à 3200 t/min pendant 10 min dans des conditions réfrigérées (4°C) à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma 3K30/Z, Laboratory centrifuges, Allemagne). Les phases sont séparées et l'extraction est répétée quatre fois successivement. Les phases d'acétate d'éthyle contenant les composés phénoliques sont collectées, combinées, et l'eau dissoute est enlevée avec du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), filtrées, puis le solvant est évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C. L'extrait d'acétate éthyle (EtOAc) obtenu est conservé à -18°C jusqu'à son utilisation ultérieure.



Figure.03: Photo du Rota vapeur utilisé pour sécher l'extrait phénolique brut

L'acétate d'éthyle est fréquemment utilisé pour l'extraction des biophénols des matrices aqueuses telles que les margines (**Della Greca et al., 2004 ; Lesage-Meessen et al., 2001**). **Allouche (2004)** a démontré que l'acétate d'éthyle possède un pouvoir extracteur élevé par rapport à d'autres solvants tels que méthylisobutylcétone, méthyléthylcétone, et l'éther diéthylique, même s'il est assez sélectif à l'égard des composés phénoliques de faible (180 Da) et de moyenne (environ 13 kDa) masse. L'acétate d'éthyle n'extrait pas les molécules de haut poids moléculaire qui restent dans la phase aqueuse (**Visioli et al., 1999**) et il extrait les composés phénoliques hydrosolubles des margines.

2.1.3. Extraction liquide-liquide par l'acétone

214 ml des margines préalablement délipidés sont mélangés avec 150 ml d'acétone mélangée avec 64 ml d'eau distillée, le mélange est secoué vigoureusement dans une ampoule à décanter (15 min) puis centrifugé à 3200 t/min pendant 10 min dans des conditions réfrigérées (4°C) à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma 3K30/Z, Laboratory centrifuges, Allemagne). Les phases sont séparées et l'extraction est répétée trois fois successivement. Les phases d'acétone contenant les composés phénoliques sont collectées, combinées, et l'eau dissoute est enlevée avec du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), filtrées, puis le solvant est évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif à 57 °C. L'extrait acétone (Ac) obtenu est conservé à -18°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

2.1.4. Extraction liquide-liquide par n-butanol

150 ml des margines préalablement délipidés sont mélangés avec 150 ml butanol, le mélange est secoué vigoureusement dans une ampoule à décanter (15 min) puis centrifugé à 3200 t/min pendant 10 min dans des conditions réfrigérées (4°C) à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma 3K30/Z, Laboratory centrifuges, Allemagne). Les phases sont séparées et l'extraction est répétée trois fois successivement. Les phases d'acétone contenant les composés phénoliques sont collectées, combinées, et l'eau dissoute est enlevée avec du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), filtrées, puis le solvant est évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif à 100° C. L'extrait butanolique (n-BuOH) obtenu est conservé à -18°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

2.2. Caractérisation physicochimique des margines

2.2.1 Mesure du pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre type (HANNA instruments modèle 210).

2.2.2. Solide total en suspension

Les solides totaux suspendus (STS %) sont obtenus par centrifugation des margines fraîches à 4000 g durant 15 min, le résidu solide est séché une nuit à 105°C (Assas *et al.*, 2000).

2.2.3. Teneur en eau

L'humidité des échantillons des margines est déterminée par un séchage à l'étuve. Environ 10 g de margine sont pesés, puis séchés à 103°C pendant 24 heures dans une étuve (Gortzi *et al.*, 2008), refroidis ensuite pendant 30 min dans un dessiccateur, puis repesés une deuxième fois. La perte en eau est calculée par la différence de poids des échantillons humides et secs.

2.2.4. Teneur en solide total (matière sèche)

Le solide total (ST %) est défini comme étant le résidu restant après élimination de l'eau d'un aliment dans des conditions expérimentales données .Le taux de la matière sèche est déterminé par la différence de poids entre la margine (100 %) et la teneur en eau (% H₂O).

$$\text{ST}\% = 100\% - \% \text{H}_2\text{O}$$

2.2.5. Teneur en azote

Le dosage de l'azote a été effectué par la méthode de Kjeldahl :

Introduire 5 ml de margine avec 7.5 g du catalyseur (CuSO₄ + K₂SO₄) et un peu du sélénium dans un matras. Ajouter 10 ml de H₂SO₄ et 10 ml d'eau oxygénée 30 % (H₂O₂) comme anti-moussant.Mettre quelques billes de verre comme antichoc.

Chauffer à une température de 100°C 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 400°C jusqu'à l'apparition d'une coloration verte claire et limpide, poursuivre 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 (Gerhardt, vapodest).

L'ammoniac distillé a été piégé dans un erlenmeyer contenant 20 ml d'acide borique 4 % puis titrer rapidement à l'aide de l'acide sulfurique (H₂SO₄) (N/50) jusqu'au pH initial de l'acide borique.Le taux d'azote a été calculé selon la formule suivante :

$$\%N_2(g) = (V_1 \times 0,014 \times 100 \times N)V_0$$

N : la normalité de la solution d'acide sulfurique N/50.

V₀ : volume de l'échantillon en ml (5 ml).

V₁ : volume en ml de la solution d'acide sulfurique utilisée pour le titrage.

2.2.6. Teneur en matière minérale (MM)

L'échantillon sec de margine est calciné dans un four à moufle à 550°C, pendant 3 h. Après refroidissement dans un dessiccateur, les produits de l'incinération sont pesés et constituent la matière minérale (**Pauwels et al., 1992**).

$$C = (M2 - M0) / V \times 1000$$

Avec :

C : teneurs en cendres (g/l), **M0** : masse de la capsule vide (g), **M2** : masse de la capsule avec la matière sèche calcinée (g), **V** : volume de la prise d'essai (ml)

2.2.7. La matière organique (MO)

La teneur de la matière organique est obtenue par déduction entre le poids sec des margines et leurs poids après calcination (matière minérale) (**Pauwels et al., 1992**).

2.2.8. Dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode de (**Wong, 2006**).

2.2.8.1. Le principe

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif Folin) dans une solution alcaline (**Vuorela et al., 2005**). Le réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué dans l'eau distillée. A partir d'une solution méthanolique mère de : C = 1mg/ml pour chaque extrait.

Brièvement 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 10%. Les solutions ont été mélangées et incubés pendant 4 minutes. Après l'incubation 800µl de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (7,5g /l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance des extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

2.2.8.2. Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200 µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG mg).

2.3. Identification des empreintes polyphénolique par CCM

2.3.1 Principe

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en général un mélange des solvants, adapté au type de séparation recherchée, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal -Rf- et coloration) susceptibles d'orienter vers une hypothèse dese de structure (**Zeghad, 2009**).

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silica gel, sur support rigide en aluminium 20/20 cm dont chaque extrait a été déposé à l'aide d'une pipette pasteur à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque, les plaques sont ensuite placées dans les cuves de développement, à environ 0,5 cm de hauteur dans lesquelles se trouve la phase mobile dont quatre systèmes de migration différents .

Système 1 : chloroforme / méthanol/ l'eau distillée (85 :10 :5)

Système 2 : toluène / acide acétique/ méthanol (50 :30 :10)

Système 3 : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau distillé (100 :11 :11 :26)

Système 4 : acétate d'éthyle/ acide acétique glaciale / acide formique/eau distillée (100 :11 :11)

Après développement, les plaques sont séchées, puis visualisées séparément par une révélation physique sous lampe UV à 264 et 365nm. Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant sur la distance parcourue par le solvant et les rapports frontaux des spots sont comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants des deux extraits (**Sefi, 2010**).

Rapport frontal : $R_f = d / D$

d: Distance parcourue par la substance.

D: Distance parcourue par le solvant.

2.4. Evaluation in vitro des activités biologiques des polyphénols des margines

2.4.1. Évaluation de l'activité antioxydante (Test scavenger du DPPH)

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par l'activité du balayage des radicaux libres en employant le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl: DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (**Bastos et al.,2007**).

2.4.1.1. Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2.2 diphényle 1 picryl-hydrazyl) (Figure) de couleur violette se réduit en 2.2 diphényle 1 picryl-hydrazyl de couleur jaune (**Maataoui et al., 2006**). L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (**Lopes-Lutz et al., 2008**).

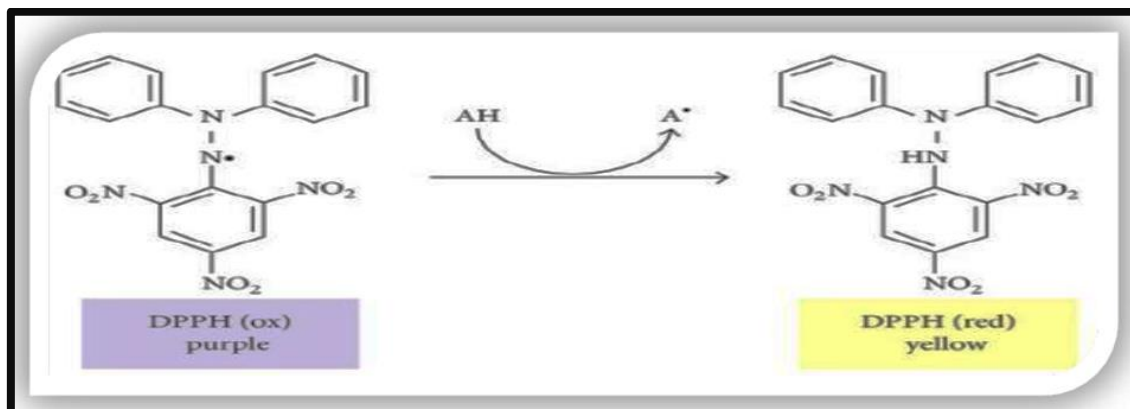


Figure.04: Forme libre réduite du DPPH (Mohammedi, 2006)

2.4.1.2 Méthode

Le DPPH° a été solubilisé dans du méthanol absolu pour avoir une solution de 100µM. A partir d'une solution méthanolique mère de C₁= 4mg/ml de l'extrait, les dilutions suivantes ont été préparées : C₂: 3.2mg/ml, C₃: 2.4mg/ml, C₄: 1.6 mg/ml, C₅: 0.8mg/ml.

Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. 15 µl de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 1.5 ml d'une solution méthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30 minutes, les densités optiques des mélanges réactionnels ont été mesurées par le spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions par le méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique.

2.4.1.3. Expression des résultats

En présence d'un antioxydant, l'intensité d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (**Bastos et al., 2007**) Les résultats sont exprimés en tant que l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante (**Wang et al.,2006**).

$$\text{I\%} = [(\text{Abs Control négatif} - \text{Abs Echantillon}) / \text{Abs Control négatif}] \times 100$$

La valeur IC 50 est définie comme étant la concentration de l'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur), les valeurs IC 50 moyennes ont été calculées par les régressions linéaires de trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration de l'extrait testé et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage (**Mensor et al.,2001**).

2.4.2. Etude de l'activité anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire des trois extraits a été démontré *in vitro* en utilisant la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (SAB) et la méthode anti-hémolytique, qui teste la stabilité de la membrane des globules rouges humains.

2.4.2.1. Méthode de dénaturation de SAB

L'activité anti-arthritique *in vitro* a été étudiée en utilisant le test de stabilité de l'albumine (**Rahman et al., 2012**) en utilisant trois concentrations pour chaque extrait (0.5mg/ml, 1mg/ml et 2 mg/ml). La méthode consiste à préparer quatre solutions.

La solution d'essai (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (SAB) à 0,5 % et 0,05 ml d'extrait.

La solution control test (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de SAB 0,5 % et 0,05 ml d'eau distillé.

La solution contrôle produit (0,5 ml) composé de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml d'extrait.

La solution standard test (0,5 ml) compose de 0,45 ml de la solution aqueuse de SAB à 0,5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodium avec une concentration de 250 µg/ml.

Les échantillons ont été incubées à 37 °C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté pour garder les échantillons à 57°C pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5 ml de la solution phosphate tampon saline (pH 6,3) a été ajouté aux solutions ci-dessous. L'absorbance

a été lue par le spectrophotomètre UV visible à 416 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit:

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 100 - \left[\frac{\text{DO de la solution essai} - \text{DO de la solution contrôle Test}}{\text{DO de la solution contrôle Test}} \right] \times 100$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le Diclofénac de sodium (250 µg/ml).

2.4.2.2. Evaluation de l'effet anti-hémolytique (méthode de stabilisation des membranes GR)

Les différents extraits des margines ont été testés pour leurs effets antihémolytique sur les membranes des GR *in vitro* en utilisant une méthode spectrophotométrique (Yanget *al.*, 2005). Différentes concentrations des extraits (1 mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25 mg/ml) ont été préparés dans le PBS.

➤ Préparation des globules rouges

- 5 ml de sang d'une personne saine ont été recueillis dans des tubes traités à l'EDTA, puis centrifugés pendant 5 min à 1000 tr/min.
- Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé trois fois avec du tampon phosphate Saline (PBS) (0,2 M et pH 7,4) puis remis en suspension dans une solution Saline (4 %).
- L'opération de lavage a consisté en une série de centrifugation à 1000 tr/min pendant 5 min de la suspension du culot dans le PBS.
- Après la dernière centrifugation, 0,4 ml du culot ont été additionné à 9,6 ml de tampon phosphate saline (0,2 M à un pH de 7,4) pour obtenir une solution érythrocytaire d'hématocrite à 4%.

➤ Protocole expérimental

- Mettre dans des tubes 1 ml de la solution érythrocytaire préparée avec 0,5 ml des extraits (dilué avec le PBS) à différentes concentrations initiales;
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 20 min ;
- Ajouter 0,5 ml de la solution de NaCl (2 %) dilué avec le PBS au mélange réactionnel ;
- Centrifuger les tubes à 1000 tr/min pendant 10 min ;
- Récupérer le surnageant ;
- Lire l'absorbance du surnageant (la fuite d'hémoglobine) de chaque tube à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

- L'hémolyse relative a été évaluée en comparaison avec l'hémolyse induit par NaCl en absence des extraits (contrôle négatif).

- Un médicament anti-hémolytique (Aspirine 250 mg) dissout dans le tampon PBS et en absence des extraits a été utilisé comme contrôle positif.

Chaque série d'expérience a été effectuée en triplicata et le % d'inhibition de l'hémolyse par les extraits a été calculé.

➤ **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule suivante

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_c - A_{ext} / A_c) \times 100$$

A_c : absorbance du control négatif.

A_{ext} : absorbance de l'extrait.

2.4.3. Evaluation de l'activité anti-coagulante

L'activité anti-coagulante des extraits a été évalué *in vitro* vis-à-vis la voie exogène et endogène de la coagulation, et ceci sur un pool des plasmas normaux déplaquetés et à l'aide de 2 tests globaux et chronométriques, le temps de Quick (TQ) ou nommé également Taux de Prothrombine (TP), et le Temps de Céphaline Kaolin (TCK).

2.4.3.1. Préparation de pool plasmatique (standard) déplaqueté

Le pool plasmatique déplaqueté est un mélange de plasma déplaqueté des volontaires sains adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux et comparables. Le sang de chaque volontaire a été prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur en solution anti coagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 3 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3000 tr/min pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes.

2.4.3.2. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie exogène

L'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène de la coagulation a été évalué en utilisant un test de coagulation de Quick (TK) ou le temps de prothrombine (TP) qui permet une exploration globale des facteurs de la voie exogène de la coagulation (**Brummel *et al.*,2002**).

➤ **Principe de l'essai**

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la Thromboplastine). Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du

caillot est mesuré. Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'extrait exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

➤ **Protocole expérimentale**

10 µl de chaque extrait (0,5 mg/ml) préparé dans le DMSO ont été additionnés à 90 µl du plasma standard, le mélange a été incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, la Coagulation a été déclenchée par l'addition de 200µl de thromboplastine pré incubé à 37 °C Pendant 15 min. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré visuellement à l'aide

2.4.3.3. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène

Le test du temps de Céphaline Kaolin (TCK) est un test qui permet d'explorer L'activité des facteurs plasmatiques de voie endogène

➤ **Principe de l'essai**

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré. Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que nos extraits exercent un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

➤ **Protocole expérimental**

10 µl de chaque extrait (0,5 mg/ml) préparé dans le DMSO ont été additionnés à 90 µl du plasma pauvre en plaquettes qui est ensuite incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, 100µl d'une solution de céphaline Kaolin ont été additionnés puis le mélange est réincubé à 37 °C pendant 3 min et la coagulation est alors déclenchée par l'addition de 100 µl d'une solution aqueuse de 0,025 M CaCl₂. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré visuellement à l'aide du chronomètre.

Un médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI dissout dans leDMSO a été utilisé comme contrôle positif.

2.5. Etude statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple et les résultats ont été exprimés par Excel en moyenne± l'écart-type.

Chapitre II
Résultats et discussion

1. Caractérisation physicochimique des margines

Les caractéristiques physico-chimiques des margines, utilisées dans notre étude, sont illustrées dans le tableau 04 ci-dessous:

Tableau .04 : Caractéristiques physico-chimiques des margines étudiées.

Paramètres	Echantillon
Couleur	Marron
pH	4,64
MS (g /l)	8,55
H (%)	91,45
STS	0,55
Teneur en azote (g/l)	0,42
MO (%)	14
MM (%)	2

MS : matière sèche, MO : matière organique, MM : matière minérale, H : humidité, STS : solide total en suspension.

1.1. Mesure de pH: (potentiel hydrique)

Les résultats de notre analyse physicochimique montrent que les margines ont un pH acide (4.64), selon la littérature, l'acidité des margines (pH= 4,2-5,9) est une caractéristique commune de cet effluent liquide (Achak *et al.* 2008), en effet, cette valeur est comparable à celle enregistrée dans plusieurs travaux effectués auparavant à Khenchela sur la même variété; (Chermime et Ghodhbane ,2018; Hafsaoui et Merah ,2019; Kadi *et al.*, 2020), ainsi, avec les travaux effectués aux autres wilayas: Guelma, Kabylie, Skikda (Benyahia et Zein, 2003; Baali et Bouacid, 2015; Ghomari, 2015). L'acidité des margines peut s'expliquer par la présence de différents acides phénoliques et acides gras dans leur composition. Un mauvais stockage des olives avant leur trituration, donne des effluents très sombres et acides en favorisant la transformation des alcools phénoliques en acides (Hamdi, 1999).

1.2. L'humidité et la matière sèche

Les teneurs moyennes des margines en matières sèche et humide sont respectivement de l'ordre de 8, 5 g/l et de 91, 45% (Figure 05).

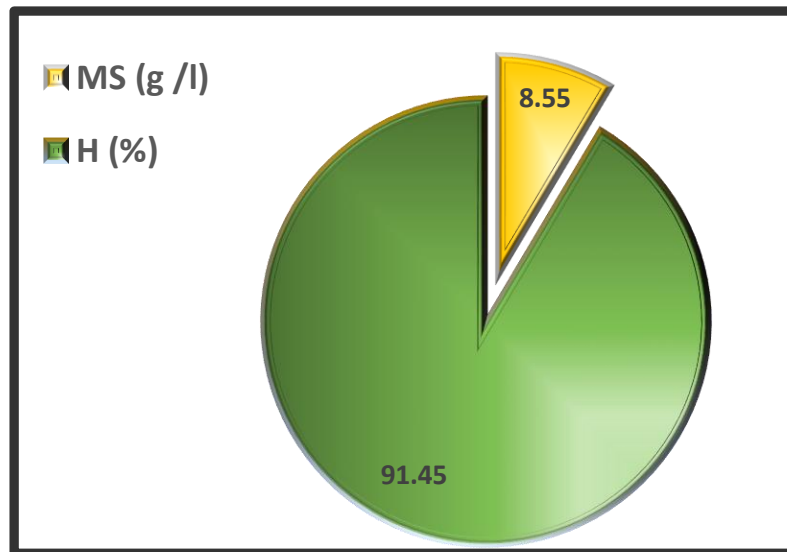


Figure.05: Les teneurs en humidité et en matière sèche d'échantillon de margines étudiés.

D'après les résultats obtenus, les teneurs des échantillons en matière sèche sont de l'ordre de 8,5g/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 valeurs d'humidité élevées des margines (91,45%) sont très importantes et 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 (**Leulmi, 2011**). Nos résultats sont en parfait accord avec ceux trouvés dans plusieurs travaux dont le pourcentage d'humidité des margines variait entre 87 et 95% (**Martinez-Garcia et al., 2002; Mekki et al., 2009; Galanakis et al., 2010; El-Abbassi et al., 2012**).

1.3. Solide total en suspension (STS)

Le solide total en suspension est relativement important dans notre margines avec 0,55%, cette valeur se situe dans l'intervalle [0,04 et 1,04%], cité par **Dannibale (2003)**.

1.4. Teneur en azote:

La teneur en azote total des margines est de l'ordre de 0,42 g/l. Elle est relativement faible par rapport à celle citée dans la littérature (1-3g/l) citée par (**Lopez et Ramos-Cormenzana, 1996**),

or nos valeur est proche avec celle (0,364 g/l) trouvée par (Mbourmad, 2011 ; Salhi et Hamoudi, 2016).

1.5. Matière organique et minérale

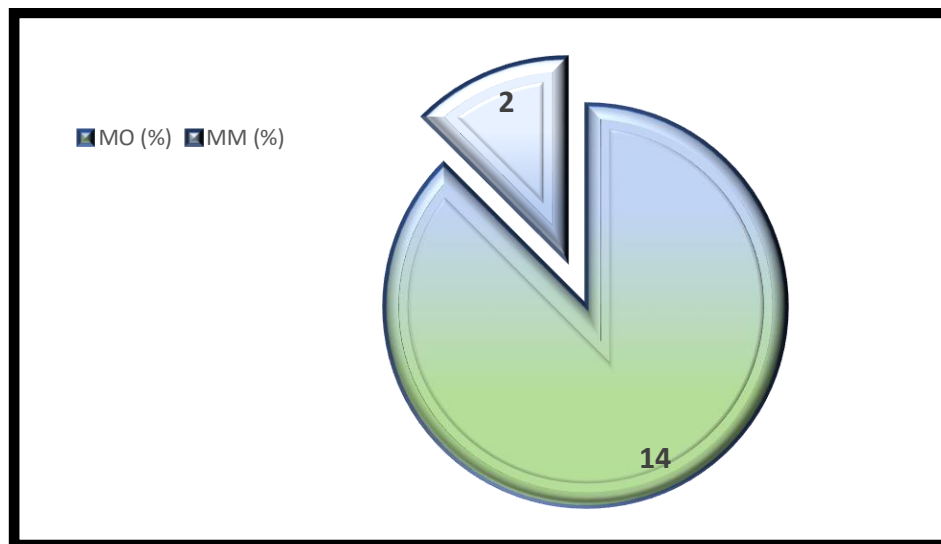


Figure.06 : Les teneurs en matières organique et minérale

Selon la figure 6, il s'avère clairement que notre margines indiquent des teneurs plus élevées en matières organiques (14%). 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, le pourcentage de la matière organique est supérieure à celle rapportée par plusieurs auteurs (Aissam, 2003 ; Höjer, 2012).

La teneur des margines en matière minérale est de l'ordre de 2 qui est relativement faible par rapport à celle (21,42%) citée par Hachicha et ses collaborateurs (2008) et proche à celle trouvée par Leulmi (2012).

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. En général, les margines contiennent une variété de composés organiques et minéraux, de nature et de concentration très différentes (Blika *et al.*, 2009).

1.6. Teneurs en polyphénols totaux

En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique du réactif Folin Ciocalteu, qui se traduit par l'apparition d'une coloration bleue foncée. Le dosage a été effectué selon la méthode de **Gutfinger (1981)** modifiée par **Lafka et ses collègues (2007)**. La lecture de la densité optique à 725 nm permet de déterminer la concentration des polyphénols, en se référant à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une série des dilutions standards de l'acide gallique traitées au réactif Folin-Ciocalteu.

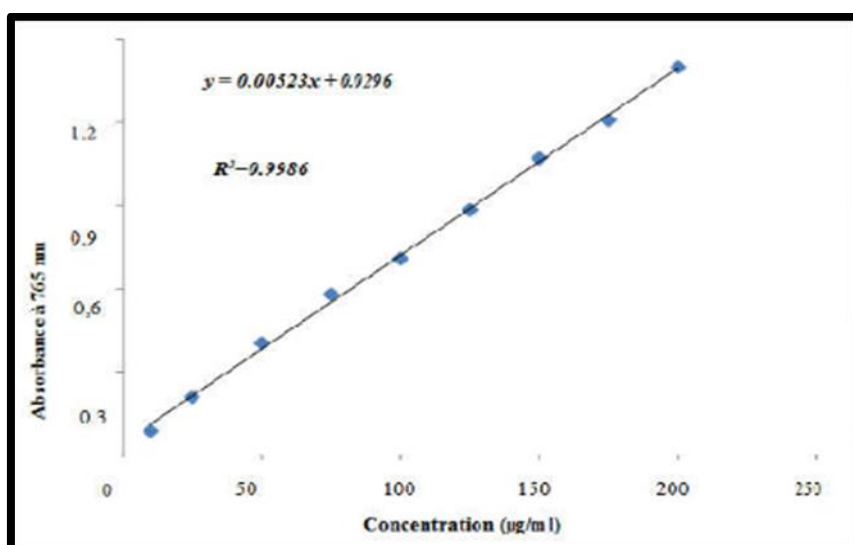


Figure.07: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures)

Un aperçu de la représentation graphique (**figure 07**) nous permet de montrer une richesse des extraits EtOAc et Ac avec 80 et 70 $\mu\text{gEAG/mg}$ d'extrait respectivement, et 10 $\mu\text{g EAG/mg}$ pour l'extrait *n-BuOH*.

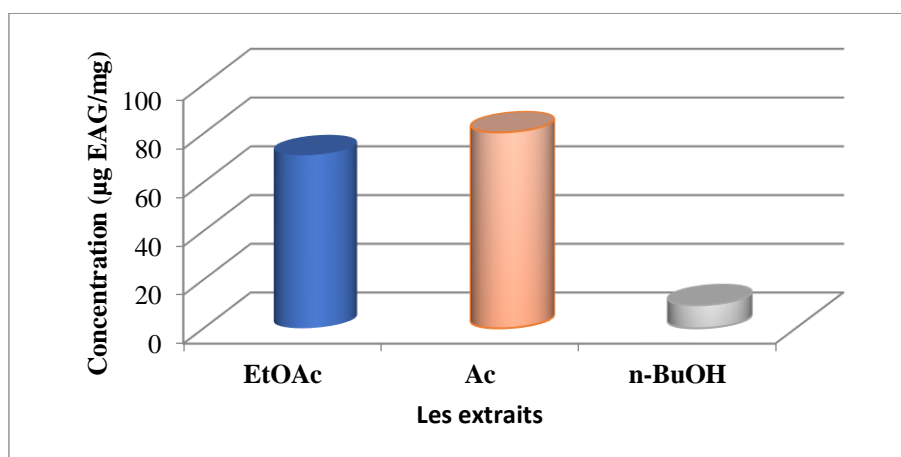


Figure.08 : Teneurs des extraits en polyphénols totaux

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), le solvant d'extraction (Sousa *et al.*, 2008; Conde, *et al.*, 2009) dont l'acétate d'éthyle choisis pour une extraction liquide-liquide, est 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).

✚ Composés phénoliques

Tableau 05 : Résultats de rendement des extraits obtenus.

Extrait	<i>EtOAc</i>	<i>n-BuOH</i>	<i>Ac</i>
Couleur	Jaune foncé	Marron rougeâtre	Marron rougeâtre
Rendement	0.87%	1.85%	11.82%

D'après les résultats présentés dans le Tableau 5, le rendement des extraits *EtOAc*, *n-BuOH* et *Ac* sont respectivement de l'ordre 0.87%, 1.85% et 11.82% .Ces valeurs sont comparables à celles enregistrées dans plusieurs travaux (Larid, 2019), dont le rendement d'extrait *Ac* a été plus élevé par rapport au rendement d'*EtOAc*, *n-BuOH*.

D'ailleurs, l'extraction par l'acétate d'éthyle, c'est un solvant très sélectif pour les molécules de bas (180 Da) et moyen (13KDa) poids moléculaire (Lsage-messen *et al.*, 2001 ; Obeid *et al.*, 2005). De plus, Allouche et ses collaborateurs (2004) ont montré que l'acétate d'éthyle exerce un haut pouvoir d'extraction par rapport aux autres solvants (diéthyl éther, méthyl isobutyl cétone).

Le rendement d'extraction dépend de la polarité du solvant utilisé, qui détermine la quantité, la qualité des composés phénoliques extraits et de la classe des phénols dans le matériel végétal (Sineiro *et al.*, 2008).



Figure. 09 : Photos des extraits obtenus (n-BuOH; EtOAc; Ac)

2. Identification qualitative des polyphénols par CCM

L'identification des composés a été basée sur la comparaison des R_fs et des couleurs observés sous lampes UV des tâches apparues sur CCM. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures et les tableaux ci-dessus

2.1. CCM de l'extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc)

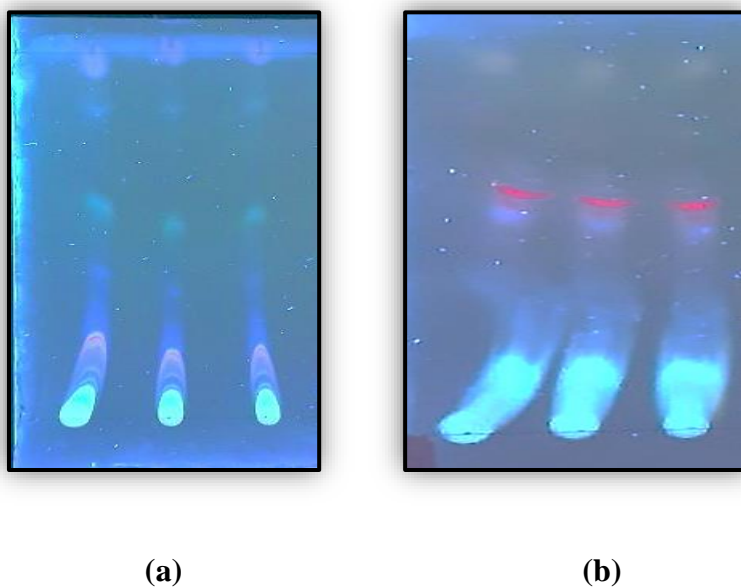


Figure.10 : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait *EtOAc* par chromatographie sur gel silice (révélation à 365nm)

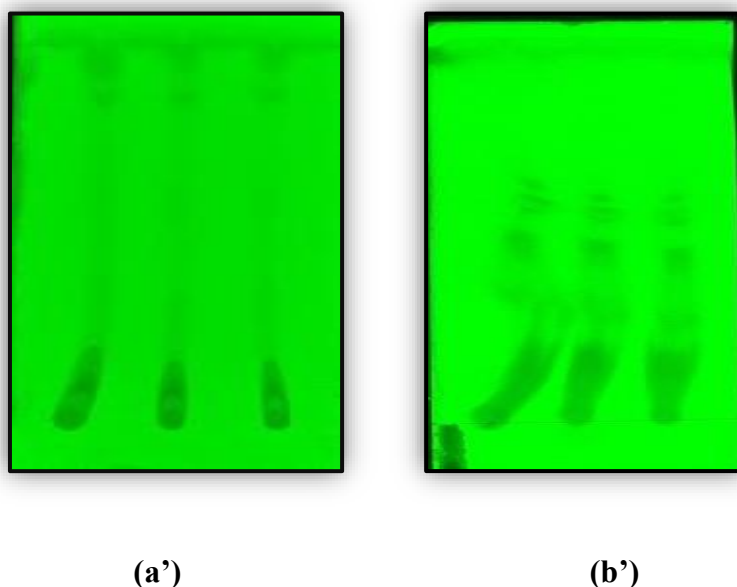


Figure.11: Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait *EtOAc* par chromatographie sur gel silice (révélation à UV (254nm))

Tableau.06: Résultats CCM de l'extrait *EtAcO*

Système	Longueur d'onde (nm)	Nombre de spots	Couleur sous UV	Rf (cm)	Constituants possibles	Figure
Système 1	365	1	Bleu Fluorescent	0.05	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol	a
		2	Rouge	0.20	Composés phénoliques, Anthocyanidine 3-glycosides	
		3	Blue	0.38	Flavonols, Acide phénol	
Système 2	365	1	Bleu Fluorescent	0.19	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol	b
		2	Blue	0.54	Flavonols, Acide phénol	
		3	Rouge	0.58	Composés phénoliques, Anthocyanidine 3-glycosides	

2.2. CCM de l'extrait butanolique (*n-BuOH*)

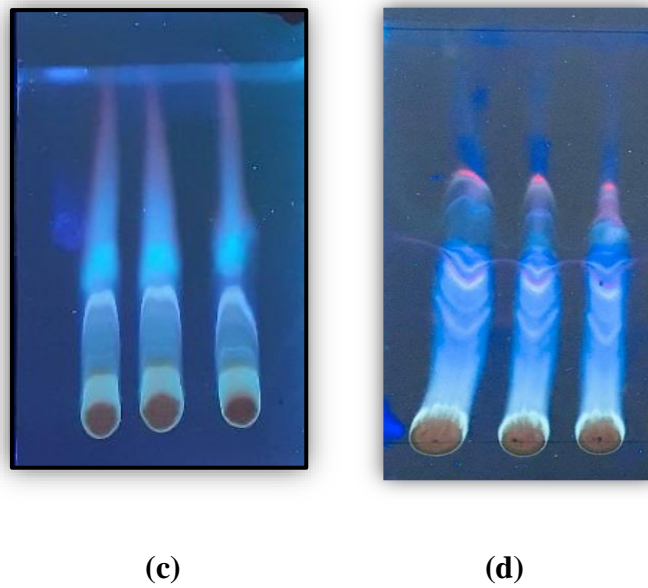


Figure.12: Photos des Chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait n-butanolique par CCM sur gel de silice à 365nm

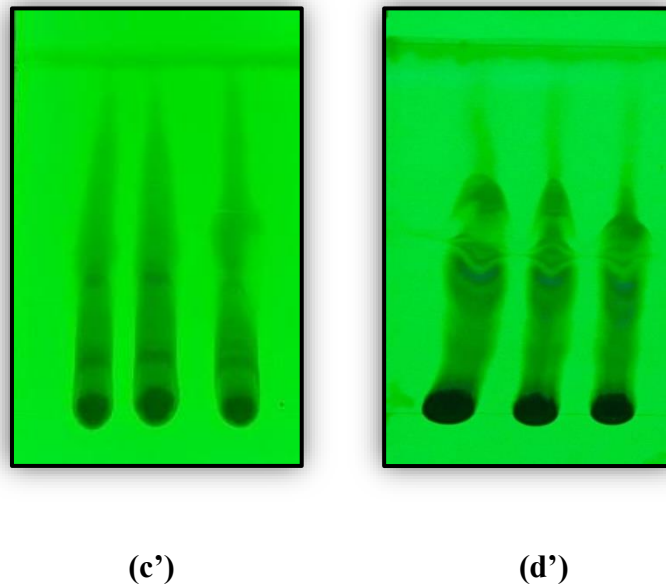
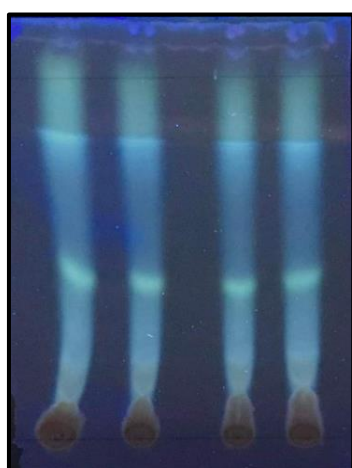


Figure.13 : Photos des Chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait n-butanolique par CCM sur gel de silice à 254nm

Tableau.07: Résultats CCM de l'extrait *n-BuOH*

Système	Longueur d'onde (nm)	Nombre de spots	Couleur sous UV	Rf (cm)	Constituants possibles	Figure
Système 1	365	1	Jaune vert	0.06	Composés phénoliques, Aurone ; Kaempférol	c
		2	Bleu blanc	0.30	Flavanol	
		3	Gris	0.33	Acide phénol, Tanins	
		4	Bleu Fluorescent	0.36	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol	
Système 2	365	1	Jaune	0.08	Coumarines, flavonols	d
		2	Bleu blanc	0.28	Flavanol	
		3	Bleu blanc	0.44	Flavanol	
		4	Rouge	0.65	Composés phénoliques, Anthocyanidine 3-glycosides	

2.3.CCM de l'extrait acétonique (Ac)



(e)



(f)

Figure.14: Photos des Chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait acétonique par CCM sur gel de silice à 365nm

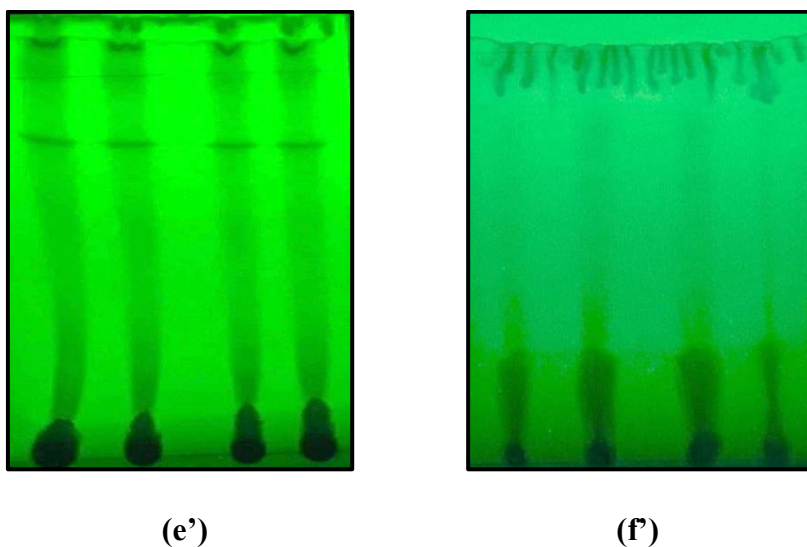


Figure.15 : Photos des Chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait acétonique par CCM sur gel de silice à 254 nm

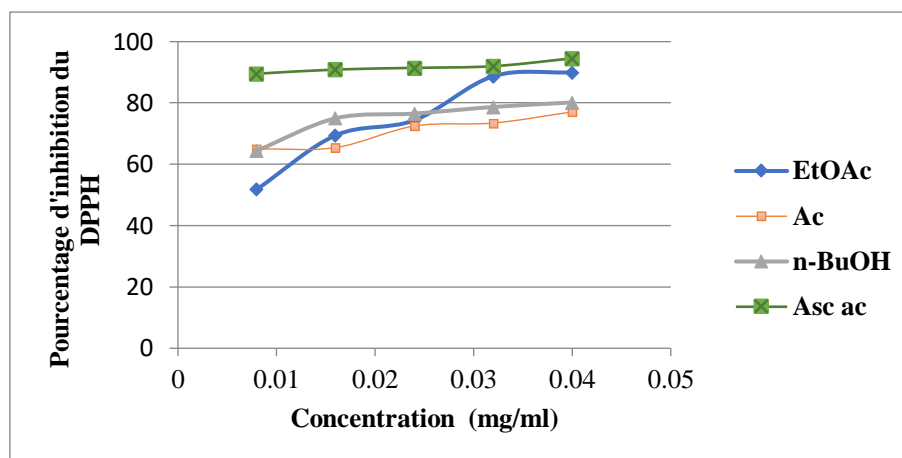
Tableau.08: Résultats CCM de l'extrait Ac

Système	Longueur d'onde (nm)	Nombre de spots	Couleur sous UV	Rf (cm)	Constituants possibles	Figure
Système 3	365	1	Gris	0.22	Tanins, Acide phénol	e
		2	Jaune vert	0.47	Composés phénoliques, Aurone ; Kaempférol	
		3	Bleu Fluorescent	0.83	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol	
Système 4	365	1	Marron	0.32	Flavone méthyle, hydroxy flavanol	f
		2	Jaune vert	0.88	Composés phénoliques, Aurone ; Kaempférol	

3. Etude des activités biologiques

3.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante

L'activité antioxydante des extraits *n-BuOH*, *Ac* et *EtOAc* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. D'après les données présentées dans la **figure 16**, en faisant varier la concentration, que ce soit pour l'acide ascorbique utilisé comme standard ou pour les différents extraits polyphénoliques des margines et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (PI %), nous avons établi le profil d'activité oxydante.



Figures.16: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits

L'activité antioxydante des extraits phénoliques des margines se fait en utilisant le test scavenger du radical stable libre DPPH qui s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (**Yi-Zhong et al .,2006**). Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (**Blois ,1958**).

A la plus faible concentration (8 μ g/ml), l'extrait *EtOAc* a présenté un PI de 51,82% tandis qu'à la plus grande concentration (40 μ g/ml) de même extrait, le PI a atteint 90% qui est comparable à celui de l'acide ascorbique, ce qui montre que les polyphénols issus des margines ont un grand potentiel antioxydant. La puissance anti radicalaires des extraits phénoliques peut être expliquée par la teneur en phénols simples, en acides phénoliques et en particulier les *o*-

diphénols (hydroxytyrosol, acide 3,4-dihydroxyphényl acétique, l'acide caféique...etc.) (Bourmad, 2011).

Makhlouffi (2018) a montré que les tests utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante sont en bonne corrélation. Remarquablement, on constate la même relation entre les valeurs issues des trois tests. En effet, les extraits qui possèdent les meilleurs pouvoirs piégeurs vis-à-vis des radicaux libres (DPPH et ABTS), montrent également les meilleures capacités réductrices du Fe(III) corrélations significatives ($R=0,53$ et $R=0,69$) respectivement. Cela témoigne vraisemblablement de la présence dans nos extraits des molécules antioxydants pouvant intervenir par deux types de mécanisme réactionnel. Il est à signaler que les réactions mises en jeu peuvent différer d'un test à l'autre.

3.2. Etude de l'activité anti-inflammatoire

3.2.1. Méthode de dénaturation des protéines (SAB)

D'après les résultats illustrés dans la **figure17**, les extraits acétonique et d'acétate d'éthyle des margines, à des doses très faibles (0.25, 0.5 et 1 mg/ml) ont une excellente protection contre la dénaturation thermique des protéines, meilleure à celle du médicament anti-inflammatoire de référence (diclofénac sodique) à la même concentration dont l'effet inhibiteur obtenu est dose-dépendant.

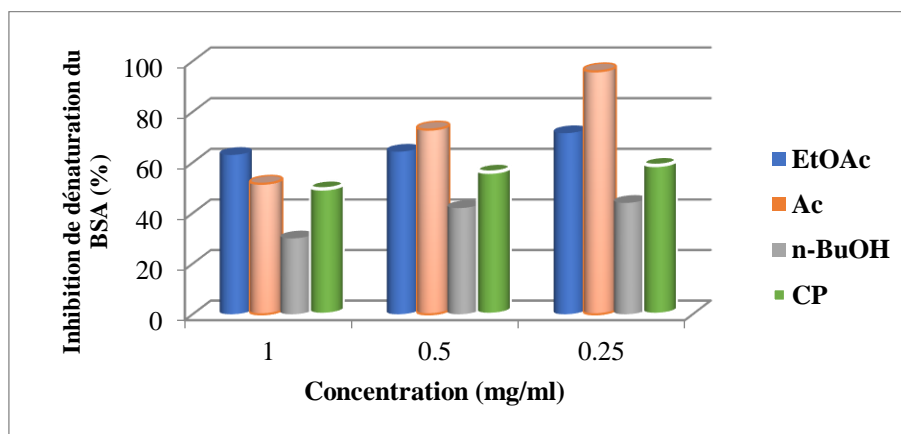


Figure.17 : Effet des extraits EtOAc, Ac et n-BuOH et du diclofénac sur la dénaturation de SAB

3.2.2. Evaluation de l'effet anti-hémolytique

La présence de composés phénoliques dans nos extraits nous a incités à étudier leur activité antihémolytique (Chihani et Oukas, 2018). L'hémolyse *in vitro* des érythrocytes humains a été utilisée pour évaluer l'effet protecteur des extraits *n-BuOH*, *Ac*, *EtOAc* vis-à-vis des

radicaux libres causant des lésions sur les membranes érythrocytaires. A des doses allant de 0.25mg/ml à 1mg/ml, tous les extraits issus des margines, protègent les membranes des érythrocytes humains de la lyse induite par les solutions hypotoniques. A une concentration de 0.25g/ml, l'extrait *EtOAc* avait le plus faible pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges (37,43%), comparé aux 62,24% produits par l'aspirine à la même concentration (**Figure 18**). Or, l'extrait *Ac* peut arrêter l'hémolyse des HRBCs de manière dose-dépendante, avec une signification très élevée allant jusqu'à 97,77% par rapport à 74,33% établie par l'aspirine à la même concentration.

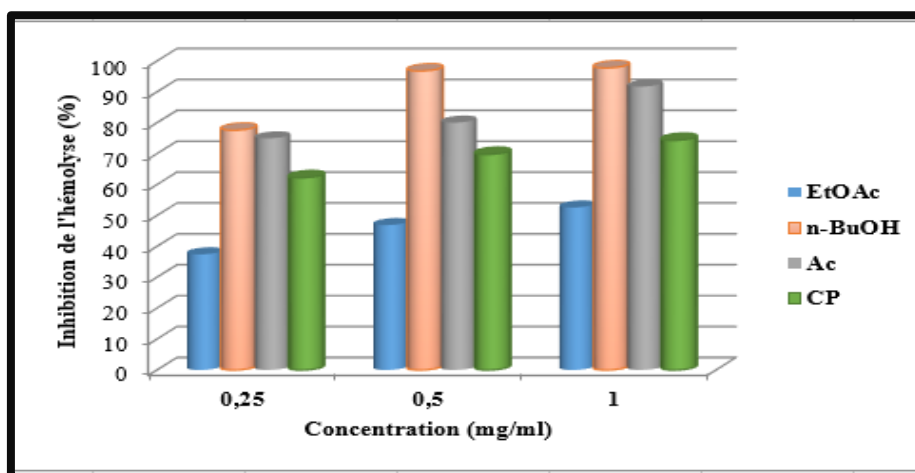


Figure.18 : Effet antihémolytique des fractions des extraits des margines en comparaison avec un contrôle positif (aspirine).

Selon **Bonarska-kujawa** et ses collègues (2011), les composés phénoliques s'incorporent dans la couche hydrophile externe et n'ont aucun effet sur la fluidité de la partie hydrophobe. Ainsi l'action protectrice des ces composés en ce qui concerne les membranes biologiques dépend du taux d'incorporation dans la partie hydrophile de cette dernière.

Il a été démontré que l'incorporation des composés phénoliques notamment les flavonoïdes dans la membrane des érythrocytes améliore la stabilité de ces dernières contre la lyse hypotonique (**Chopade et al., 2012**). Cette propriété peut s'expliquer par l'augmentation du rapport volume/ surface des cellules qui pourrait être obtenu soit par l'expansion de la membrane ou le rétrécissement de la cellule. De plus, la déformabilité et le volume cellulaire des érythrocytes sont étroitement liés au contenu intracellulaire en calcium. Par conséquent, nous pouvons penser que l'effet protecteur de l'extrait serait dû à la capacité de ce dernier à modifier l'afflux de calcium dans les érythrocytes. (**Chalal et Chibout, 2017**) montrent que l'activité anti-hémolytique pourrait être attribuée également aux tannins; des études ont montré que les tannins ont eu une inhibition très forte de la formation des corps de Heinz, cette même

étude a révélé une corrélation élevée entre le pourcentage d'inhibition des corps de Heinz et la concentration en tannins.

Plusieurs travaux effectués sur les plantes médicinales ont montrés que les conditions climatiques, l'origine géographique et le mode d'extraction peuvent affecter la quantité et la composition en métabolites secondaires et par conséquent les activités biologiques (**Elalaoui, 2015**).

3.3. Evaluation de l'activité anticoagulante

3.3.1 Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante a été réalisée à l'aide du test de temps de Quick (TQ), qui explore la voie extrinsèque (le facteur VII) et la voie commune (les facteurs X, V, II, fibrinogène) de la coagulation sanguine où le facteur tissulaire (thromboplastine) est le déclencheur de la voie exogène (**Blois ,1958**). Les résultats de la voie exogène sont présentés dans la **figure 19**.

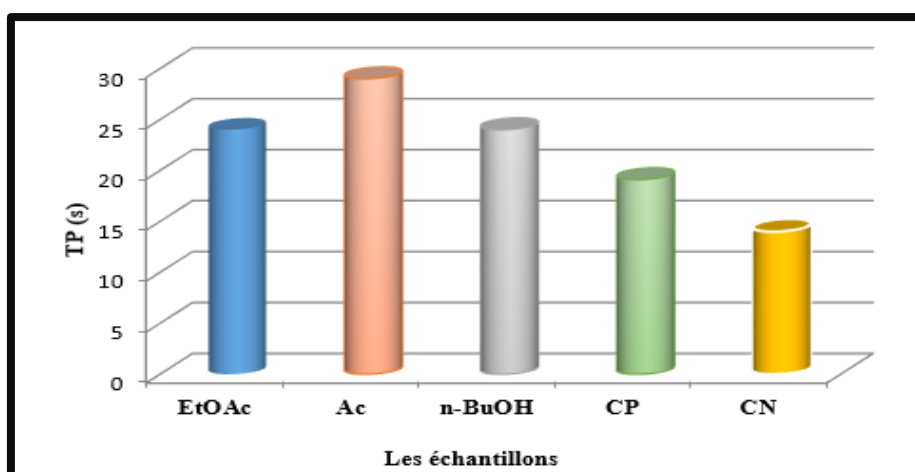


Figure.19 : résultats du voie exogène TP des extraits des margines

Le TP normal est compris entre 12 et 14 secondes+-* selon les réactifs utilisés (**Caquet, 2004**), d'après les résultats de figure 12, on note que les polyphénols des margines testés donnent des TP égalent à 29s pour *Ac* et 24s pour *n-BuOH* et *EtOAc*, qui sont supérieurs à celui du control négatif (14s) et un peu supérieur du control positif (19,1s). Donc, les extraits testés ont une activité anticoagulante remarquable vis-à-vis de la voie exogène.

3.3.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène est réalisée à l'aide du test de temps de céphaline kaolin (TCK).

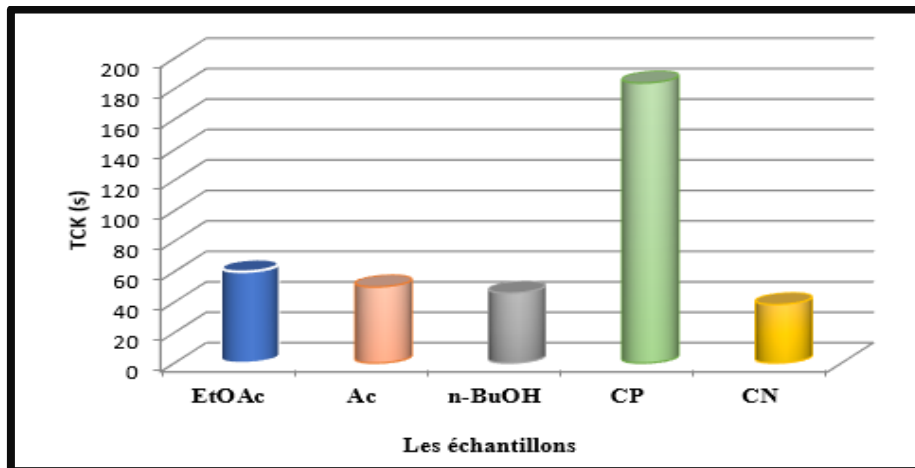


Figure.20 : Résultats du voie endogène des extraits des polyphénols des margines

D'après les résultats illustrés dans la **figure 20**, on note que les polyphénols des margines testés donnent des TCK égaux à 46s pour *n-BuOH*, 50s pour *Ac* et 60s *EtOAc*, par rapport à 38.4s pour le CN et 183.9s. pour le CP, ce qui prouve que les extraits testés ont une activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène. Cette voie de coagulation est activée par le contact entre le facteur XII et l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif in vitro). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquent l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (**Renné et al., 2006**).

L'évaluation de l'effet anticoagulant des extraits de deux tests (TP, TCK) a montré que ces extraits ont une importante activité anticoagulante vis à-vis la voie endogène et exogène par rapport au control positif. Ce dernier appartient au groupe des héparines exactement les Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM) forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III qu'inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (**Manallah, 2012**). L'activité anticoagulante des extraits phénoliques des margines est due à leur richesse aux flavonoïdes ; ces derniers participent à la prévention des maladies cardiovasculaires; ils inhibent l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, améliorent le fonctionnement de l'endothélium la couche cellulaire et assure le bon fonctionnement du système vasculaire en réduisant les risques d'athérosclérose. De plus, les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes (**Manallah, 2012**). Il présente un remplaceant d'origine naturelle des anticoagulants utilisés qui sont obtenues par différents procédés chimiques ou enzymatiques (**Zandecki, 2006**).

*Conclusion
et perspectives*

Conclusion et perspectives

La valorisation des polyphénols des margines offre une double opportunité d'obtenir des biomolécules actives et de réduire la toxicité de ces effluents. Dans le présent travail, on s'est intéressé à l'exploitation *in vitro* d'éventuel effet antioxydant, anti-inflammatoire et anticoagulant et des extraits polyphénoliques issus des margines récoltée de la région de Khenchela.

La caractérisation physico-chimique des échantillons a montré des rejets acides, de couleur marron avec un taux d'humidité élevé, un teneur en solide total en suspension beaucoup plus important, riches en matières organique, pauvre en matière minérale, et en teneur d'azote et en matière sèche.

Le criblage qualitatif des extraits par la CCM a révélé la présence des différentes classes flavonoïques susceptibles d'exprimer les activités recherchées. L'analyse quantitative a dévoilé que les extraits *Ac* et *EtOAc* sont plus riche en polyphénols totaux par rapport à l'extrait *n-BuOH*.

La capacité antioxydante résultante a montré que tous les extraits inhibent l'oxydation DPPH avec des pourcentages entre 51.82 et 90% à des très faibles concentrations en comparaison avec l'antioxydant de référence (l'acide ascorbique).

L'estimation de l'action anti-inflammatoire a été prouvée *in vitro* en inhibant la dénaturation thermique des protéines et en augmentant la stabilité de la membrane des HRBC (Human Red Blood Cells) contre l'hémolyse hypotonique, dont l'extrait *Ac* a été le plus efficace.

L'évaluation de l'effet anticoagulante des extraits polyphénoliques des margines vis-à-vis les deux voies de coagulation (endogène et exogène) a permet d'asseoir l'effet anticoagulant sur les deux voies avec un effet plus marqué sur la voie endogène dont l'extrait *Ac* a eu le plus important impact sur l'allongement des deux tests chronométrique.

A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que les polyphenols extraits des margines sont doués d'une activité antioxydante, anti-inflammatoire et anticoagulante remarquables. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle prometteuse afin d'atténuer les complications du stress oxydant associé ou déclenchant des maladies thrombolytique et cardiovasculaires

Notre recherche reste préliminaire et des études plus approfondies seront nécessaires concluant plusieurs points à savoir:

- Caractérisation quantitative des flavonoïdes par des méthodes de séparation plus performantes (HPLC, RMN, CL/SM, CG/SM...)
- Evaluer et tester ces molécules actives pour d'autres propriétés biologiques *in vivo* dans le cadre d'application pharmacologique et industrielle.

*Références
bibliographiques*



- ✚ **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*:53-78
- ✚ **Ademe A. (2000).** Les coproduits d'origine végétale des industries agroalimentaires. Ademe Angers, p76.
- ✚ **Aggoun-Arhab, M. (2016).** Caractérisation de la composition en micro-constituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière. Thèse de doctorat. Université Frères Mentouri-Constantine. p 209.
- ✚ **Aissam H. (2003).** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. Université sidi mohamed ben abdellah. Fes, p 156.
- ✚ **Ait Chabane, F., Rovellinib,P., Boucheffac, S. Medinad,E., Tamendjaria, A.(2019).** Quality of lipid fraction during Spanish-style table olives processing of Sigoise and Azzeradj cultivars. *Journal Pre-proof* : 1-35.
- ✚ **Ali, D., É, Sacchetto., E, Dumontet., D, carrer., J, Orsonneau., O, Delaroche., E, Bigot corbel. (2014).** Interférence de l'hémolyse sur le dosage de vingt-deux paramètres biochimiques. *Annales de biologie clinique* : 297-311.

- ✚ **Allouche N., Fki I., Sayadi S., (2004).** Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : 267-273.
- ✚ **Alloum D. (1987).** L'oléiculture Algérienne. *Options méditerranéennes* – N° 24:45-48.
- ✚ **Almi D. (2010).** Etude du pouvoir antioxydant des composés et extraits polyphénoliques issus des olives et sous-produits de l'olivier (feuilles et margines) variété chamlal sur l'oxydation thermique simulant la friture de deux huiles à large consommation : l'huile d'olive et l'huile de tournesol. Mémoire de magister. Option biochimie appliqué et biotechnologie, p 80.
- ✚ **Amoretti MC, Comet G. (1985).** Le livre de l'olivier. Edisud:56-90.

- ✚ **Annaki A., Chaouch M., Rafiq M. (1999b)** Influence de la durée du stockage des olives sur l'évolution de la composition des margines. L'eau. L'industrie. Les nuisances: 24-28.
- ✚ **Argenson C., Regis C S., Jourdain J. M., Vayesse P., (1999).** L'olivier. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes:07-09.
- ✚ **Assas N., Marouani L., Hamidi M., (2000).** Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotricum candidum*. *Bioprocess Engineering*: 503-507.
- ✚ **Azbar N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglu A., Sengul F., Ozer, A., (2004)** A review of wastes management options in olive oil production. *Critical Reviews on Environmental Science and Technology*: 209–247.



- ✚ **Zenjari B., El Hajjouji H.,G Ait Baddi ., R Bailly., C Revel.,A Nejmeddine.,M Hafidi (2006).** Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater–straw mixtures, *Hazardous Materials* : 433-437
- ✚ **Babar A., Hahn M., E J., K Y Paek. (2007).** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules* :607-621.
- ✚ **Bahorun T. (1997).** Substances Naturelles actives.La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiias*: 83- 94.
- ✚ **Bamforth CW. (2000),** Perceptions of beer foam. *J. Inst. Brew*: 229-38.
- ✚ **Barton GM. (2008).** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*: 413-420.
- ✚ **Bastos D., H Saldanha., L A., Catharino R., R Sawaya., A Cunha., I B., Carvalho P O., Eberlin M N. (2007).** Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilexparaguariensis*) and green tea (*Cameliasinensis*) extracts. *Molecules*: 423–432
- ✚ **Beaumont, C. et F. Canonne-Hergaux. (2005).** "Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques; régulation par l'hepcidine." *Transfusion clinique et biologique* : 123-130.

- ✚ **Ben Sassi A. (2007).** Traitement et valorisation des rejets liquides issues des unités de trituration des huiles d'olives (margines) par les levures: Etude expérimentale. Thèse de doctorat national, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech, Maroc. p139.
- ✚ **Bendini A., Bonoli M., Cerretani L., Biguzzi B., Lercker G., Toschi., T G. (2003)** Liquid-liquid and solid-phase extractions of phénols from virgin olive oil and their séparation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*:425-433.
- ✚ **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. (2016).** Poly phénols d'huile d'olive trésors santé. *Medicatrix*. p128.
- ✚ **Benyahia N., Zein K. (2003).**Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) à SESEC II: 2-7.
- ✚ **Benzie I., Strain F., J J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*: 70-76.
- ✚ **Béraud J. (2014).** Le technicien d'analyses biomédicales, 2ème édition:628-650.
- ✚ **Berset C., Bondini L. (2000).** Rôles des polyphénols en alimentation et santé humaine. *Compte rendu de la journée ACIA*:20-24.
- ✚ **Bianchi G. (2003).** Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipids and Science Technology*: 229-242.
- ✚ **Bitonti, M. B., Chiappetta, A., Innocent, A.M., Muzzalupo, I. & Uccella, N. (2000).** Biophenol functionality and distribution in *Olea Europa L. Drupes*. *Olivo & Olio*: 20-29.
- ✚ **Blika P., Stamatelatou K., Kornaros M., Lyberato G. (2009).** Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global Nest Journal*: 364-372.
- ✚ **Blois M. (1958)** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*: 1199–1200.
- ✚ **Bonarska-kujawa D., Pruchnik H., Oszmiancki J., Sarapk J., Kleszceynska H. (2010).** Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics* :58–67.

- ✚ **Borja R., Martin M.A., Duran Barrantes M.M.(1992).**Kinetic study of biomethanization of olive mill wastewater previously subjected to aerobic treatment with *Geotrichum candidum*. *Grasas y Aceites*: 82-86.
- ✚ **Boros B., Jakabova S., Dornyei A., Horvath G., Pluhare Z., Kilar F., Felinger A.(2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography– mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*: 7972–7980
- ✚ **Boskou D. (1996).** History and characteristics of the olive tree. *Olive oil: chemistry and technology*. AOCS Press, Champaign, Illinois: 1–11.
- ✚ **Boudoukhana H.(2008).** Impacts des margines sue les eaux d’oued bouchtata (Wilaya de Skikda) Mémoire de Magister Université du 20 Août 1955 skikda. p101.
- ✚ **Bourmad S. (2011).** Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles (Doctoral dissertation). p160.
- ✚ **Brenes M., Garcia A., Garcia B., Rios J.J., Garrido A. (1999).** Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Agric. Food Chem*: 3535-3540.
- ✚ **Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc/Lavoisier, Paris: 279-281.



- ✚ **Capasso R., De Martino A., Cristinzio G. (2002).**Production, characterization, and effectson tomato of humic acid-like polymerin metal derivatives from olive oil mill waste waters. *JAgric Food Chem*: 4018-24.
- ✚ **Caquet R. (2004).** 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation, Masson (Paris) :388-389.
- ✚ **Cardinali A., Cicco N., Linsalata V., Minervini F., Pati S. &Pieralice M. (2010).** Compounds in the phenolic fraction of olive oil.*Clinical Chemistry*: 976-988.
- ✚ **Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R., Giovannozzi Sermanni G., Lo Cascio B. (2003)** Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* :959-66.

- ✚ **Catalano L, Franco I, De Nobili M, Leita L. (1999).** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods *Agrochimica -Pisa-* :193-20.
- ✚ **Ch Angelakis AN. (2006).** Olive mill wastewater management in river basins: A case study in Greece. *Agricultural Water Management*: 354–70.
- ✚ **Chalal F, Chibout M. (2017).** Effet préventif de pathologies hémolytiques liées au stress oxydatif des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Mémoire de Master. Option biochimie physiopathologie. Université A. MIRA, Bejaia. p36
- ✚ **Chehani S., Oukas A. (2018).**Évaluation de l'activité anti hémolytique et antibactérienne des extraits de *Ajuga iva* et de *Allium cepa*, et recherche d'interaction synergique avec des antibiotiques. p 43.
- ✚ **Chimi H. (2001).** Qualité des huiles d'olive au Maroc. *Transfert de Technologie en Agriculture. Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture*:1-4.
- ✚ **Chimi H. (2006).** Technologies d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. *Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture*: 1-4.
- ✚ **Chopade A.R., Sontakke P.M. et Sayyad F.J. (2012).** Membrane stabilising activity and protein denaturation: A Possible Mechanism of Action for the Anti-inflammatory Activity of *Phyllanthus amarus*. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences Université*:67-72.
- ✚ **COI, (2006)** Le monde oléicole, L'olivier, Conseil Oléicole International, p1, (2006).
- ✚ **COI** Les données du COI conseil oléicole international pour la campagne oléicole 2020/21.
- ✚ **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 pruning, *Food chemistry*:806-812.
- ✚ **Conseil Oléicole International (COI). (2018).** Analyse sensorielle de l'huile d'olive méthode d'évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge, COI/T.20/Doc. N° 15/Rév: 10-20.

- + Conseil Oléicole International (COI). (2019). Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. COI/ T.15/NC N° 3/Rév.14, 17 p
- + Cortesi N., Rovellini P., Fedeli E. (2000a). Cultivars, technologie et qualité des huiles d'olive. *Olivae*: 26-35.
- + Cortesi N., Fiorino P., Ponzetti A. (2000b). La composition de l'huile d'olive : rapport entre cultivar et systèmes d'extraction. *Olivae*: 36-38.
- + Crozier A., Del Rio, Clifford D., M.N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*: 446–467.



D

- + D'Annibale A., Federic F., Fenice M., Semanni G., Petruccioli M., Vassilew N. (2003). Residues of olive oil extraction process: possible biotechnological approach. *Science and technology* :1-4.
- + Dacosta, E. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (éd). Paris, p317
- + Dagga, F ABU., B BÖHMER. (2003). Hazardous olive-mill wastewater problem and solution site Internet : <http://www.euro-arab.com>.
- + De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R., (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*: 858-867
- + DellaGreca M., Previtiera L., Temessi F., Carrelli A., (2004). Low-molecular-weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochemical Analysis*:184-188.
- + Di Giovacchino L., Sestili S. & Di Vincenzo D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*: 587-601.



E

- + Ehaliotis C., Papadopoulou K., Kotsou M., Mari I., Balis C. (1999). Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*: 301–311.
- + El Antari A., El Moudni H., Ajana H. et Cert A. (2003a). Etude de la composition lipidique de deux compartiments du fruit d'olive (pulpe et amande) de six variétés d'oliviers cultivées au Maroc. *Olivae*: 20-28.

- ✚ **El Antari A., El Moudni A. et Ajana H. (2003b)**. Evolution comparative de la qualité et de la composition acide de l'huile d'olive chez quelques variétés méditerranéennes cultivées au Maroc. *Olivae*: 26-31.
- ✚ **El-Abbassi A, Kiai H, Hafidi A. (2012)**. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*: 406-412.
- ✚ **Elalaoui R. (2015)**. Contribution à la recherche d'effet hémolytique à partir d'extraits de *Berberis vulgaris*. Mémoire de Master. Option biochimie appliquée. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen- Algérie. p50.



- ✚ **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely C. (2008)**. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* : 372-379.
- ✚ **Faure S. (2009)**. Anti-inflammatoires stéroïdiens. *Pharmacothérapeutique pratique* : 51-56.
- ✚ **Fedeli E. (1997)**. Technologie de production et de conservation de l'huile. In : *Encyclopédie mondiale de l'olivier*. Ed. Plaza et Janes:253-273.
- ✚ **Federici L., N H, Loukili., J Zimmer., S Affenberger., F Maloisel., E Andrés. (2007)**. "Manifestations hématologiques de la carence en vitamine B12: données personnelles et revue de la littérature." *La Revue de médecine interne* : 225-231
- ✚ **Ferradji, A. (2011)**. Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcoolique et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*. Mémoire Présenté Pour l'obtention du Diplôme de Magister en biochimie Sétif.p90.
- ✚ **Fiestas Ros de Ursinos JA., Borja R. (1992)** Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*: 101-106.
- ✚ **Fiestas Ros J A., (1981)** Différentes utilisations des margines. Actes du Séminaire International sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO):93-110.
- ✚ **Fountoulakis M.S., Dokianakis S N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G. (2002)**. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.*, 36 (19), 4735-44.

 **G**

- ✚ **Garcia E J., Oldoni T. L. C., Alencar S. M. D., Reis A., Loguercio A. D., Grande R. H. M. (2012)**, Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian dental journal*: 22-27.
- ✚ **Ghedira K., (2005)**. Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôle prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*:162-169
- ✚ **Ghosh D., Scheepens A. (2009)**.Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*: 322 – 331.
- ✚ **Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A.,Fernandez-Gutierrez A.(2006)** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* : 1220-1234
- ✚ **González-López J., Pozo C., Martínez-Toledo M.V., Rodelas B., Salmerón V., (1995)** Producción de polihidroxicanoatos por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpechín. *Simposium Obtención del aceite de Oliva y reciclado de Subproductos*. Granada, España. p 43.
- ✚ **Gortzi O., Lalas S., Chatzilazarou A., Katsoyannos E., Papaconstantinou S., Dourtoglou E., (2008)**. Recovery of Natural Antioxidants from olive mill wastewater using genapol-X080. *Journal of the American Oil Chemists' Society*: 133- 140.
- ✚ **Greco G. J. R., Toscano G., Cioffi M., Gianfreda L., Sannino F., (1999)**. Dephenolisation of olive mill waste-waters by olive husk. *Water. Research*: 3046-3050.
- ✚ **Guignard J.L., Dupont F. (2004)**., *Botanique les familles des plantes*, Editions Masson, Paris, France. p 336.

 **H**

- ✚ **Hachicha R., Hachicha S., Trabelsi I., Steve Woodward B., Mechichi T. (2009)**. Evolution of the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: Maturity assessment of the end product. *Chemosphere*: 15,58
- ✚ **Hagerman AE., Riedl KM ., Jones GA., Sovik KN., Ritchard NT., Hartzfeld PW., Richel TL. (1998)** High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem*: 1887-92.

- ✚ **Halal A, (2003)** .Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase,p55.
- ✚ **Hamdi M. (1991)**. Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse de l'université de Provence. Marseille, France. 166 p
- ✚ **Hamdi M. (1992)**. Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. Applied BiochemistryBiotechnoogy: 37-155.
- ✚ **Hamdi M. (1996)** **Anaerobic** digestion of olive mill wastewaters. Process Biochemistry :105– 110.
- ✚ **Hamdi M., Ellouz P. (1993)**. Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluized bed processes. Environmental Technolgy. Hamraia, mémoire d'ingénieur en agronomie, El Harrach. p16.
- ✚ **Han T, Li H L, Zhang QY, Han P, Zheng H C, Rahman K and Qin L P .(2007)**. BioactivityGuided Fractionation For Anti-Inflammatory And Analgesic Properties And Constituents Of Xanthium Strumarium L. Phytomedicine :825–829
- ✚ **Hebbani A V., V D Reddy. V Nallanchakravarthula. (2014)**. "In Vitro Anti-hemolytic Activity of Terminalia arjuna (Roxb.) Wt. & Arn. Bark Powder Aqueous Extract." Ind. J. Adv. Chem. Sci: 02-108.
- ✚ **Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul, F. (2004)**. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie: 3-6.
- ✚ **Hodgson J. M Croft, K D. (2006)**.Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure. Journal of the Science of Food and Agriculture: 2492–2498.
- ✚ **Höjer A., Adler S., Martinsson K., Jensen S.K., Steinshamn H., Thuen E., Gustavsson AM. (2012)**. Effect of legume-grass silages and α -tocopherol supplementation on fatty acid composition and α -tocopherol, β -carotene and retinol concentrations in organically produced bovine milk. Livestock Sc human health. Nutrition Reviews. p 58.



- ✚ **Iperidou C.I., Chaidou C.I., Stalikas D., Soulti K., Pilidis G.A., Balis C. (2000)** Bioremediation of olive mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. Journal of Agricultural and Food Chemistry: 1941–1948.



K

- ✚ **Karray Hamza M. (2008)** Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive : une voie prometteuse de valorisation par la production de l'hydroxytyrosol naturel. Thèse de doctorat Université de Sfax 94-95.
- ✚ **Kissi M., Mountadar M., Assobhei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P., Sannia G. (2001)**. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl Microbiol Biotechnol*: 6-221.
- ✚ **Kramoroff A. (1999)** Modélisation de la voie intrinsèque de la coagulation sanguine en corrélation avec le Temps de Céphaline + Activateur (TCA) - Thèse en Génie biologique et médical – CergyPontoise.

→ L

- ✚ **Lafka T-I., Sinanoglou V., Lazos E. S., (2007)**. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry* :1206-1214.
- ✚ **Leger C.L., Kadiri-Hassani N., Descomps B. (2000)**. Decreased superoxide anion production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters. *J Agric Food Chem* :7-5061.
- ✚ **Lemaoui. A. (2011)**. Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*. L. Algérienne. Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas – Sétif. p 62.
- ✚ **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*:501-507.
- ✚ **Leulmi N. (2011)**. La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine, p 101.
- ✚ **Levis-Menzi R., Gaviozzi A., Riffaldi R., falzi L. (1992)** L'épandage aux champs des margines : effet sur les propriétés du sol. *Olivae* : 20-25.
- ✚ **Linden et Lorient D. (1994)**. Pigments et arômes .In : Biochimie agro industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. Ed : Masson: 338-340

- ✚ **Liu R.H.,(2007).**Wholegrain phyto chemical and health. *Journal of Cereal Science:* 207-219.
- ✚ **Lopes-Lutz D., S Alviano D., S Alviano C., P Kolodziejczyk., (2008).** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry* : 1732-1738
- ✚ **Lopez M.J., Ramos-Cormenzana A. (1996)** .Xanthan production from olive mill wastewaters.*International Biodeterioration and Biodegradation*, p 38,263-270.
- ✚ **Loukas, M., Krimbas, C.B., (1983).** History of Olive cultivars based on their genetic distances. *Journal of Horticultural Science:* 121-127.
- ✚ **Lugasi A., Hovari J., Sagi K. V., Biro L. (2003).** The Role of Antioxidant Phytonutrients in the Prevention of Diseases. *Acta Biologica Szegediensis:* 119 –125.



- ✚ **Maataoui B.S., Hmyene A., Hilali S. (2006).**Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal:* 3-8.
- ✚ **Macheix J.,Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechnologiques et universitaires romandes:* 4-5.
- ✚ **MADR.**ministère de l'Agriculture et du développement Rural.
- ✚ **Maestro-Duran R., Borja R., Martin A., Fiestas Ros de Ursinos J.A., Alba Mendoza J. (1991)** Biodegradacion de los compuestos fenolicos presentes en el alpechin. *Grasas Y Aceites*, 42, 271-276.
- ✚ **Makhloufi N.,Talbi M.,(2018)** Activité antioxydante d'une plante de la région de Kabylie.mémoire de master .option :Biochimie appliqué.
- ✚ **Manach C., Mazur A., Scalbert A. (2005).** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology* : 1–8.
- ✚ **Marchand A., R S Galen., F, V, Lente. (1980).** "The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease: 1909-1911.
- ✚ **Marques I.P. (2001).** Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation. *Desalination:* 233–239.

- ✚ **Martin S., Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*: 304–315.
- ✚ **Martinez S., Barbas C. & Herrera E. (2002).** Uptake of alphatocopherol by the mammary gland but not by white adipose tissue is dependent on lipoprotein lipase activity around parturition and during lactation in the rat. *Metabolism*, p 58
- ✚ **McNamara C.J., Anastasiou C.C., O'Flaherty V., Mitchell R. (2008).** Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 127-134.
- ✚ **Memmi A. (2007).** Use of medicinal plants against scorpionic and ophidian venoms. *Arch. Inst. Pasteur. Tunis*: 49-55.
- ✚ **Mensor, L.I., menezes, F.S., leitao, G.G., reis, A.S., dos santos, T., coube, C.S., leitao, S.G., (2001).** Screening of Brazilian plants extracts for antioxidants activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res*: 127-130
- ✚ **Mezzou, H., A, B, Khelifa., F, Neffati., W, Douki., A, Ben Amor., M, F, Najjar. (2006).** "Détermination de l'hémoglobine plasmatique et évaluation spectrophotométrique de l'hémolyse en biochimie clinique." *Revue Francophone des Laboratoires* : 59-64.
- ✚ **Milardović S., Iveković D., Grabarić B. S. A. (2006)** novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*: 175-180.
- ✚ **Morillo J A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N. J., (2009).** Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl Microbiol Biotechnol* : 25-39.
- ✚ **Morisot A., Tournier J.P. (1986)** Répercussions agronomique de l'épandage d'effluents et déchets de moulins à huile d'olive, *Agronomie*: 235-241.



- ✚ **Nefzaoui A. (1991).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. *Option méditerranéennes*: 101-108.

- ✚ **Nefzaoui A. (1988).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. In : M. Allaya (ed.). L'économie de l'olivier. Paris : CIHEAM:153-173.

 **O**

- ✚ **Obied H., Allen M., Bedgood D., Prenzler P., Robards K., Stockmann R. (2005).** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. Journal of agricultural Food Chemistry : 823-837.

 **P**

- ✚ **Paraskevi. Moutsatsou. (2007).**The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. Hormones: 173-193.
- ✚ **Pauwels J, Van Ranst E, Verloo M, Mvondo A. (1992).** Manuel d'Analyses de sols et de plantes. Equipements, Gestion de stocks, de verrerie et produits chimiques. Publications agricoles-28, AGCD, Bruxelles, Belgique. p 265.
- ✚ **Pokorny, J., Yanixhlieva, N. and Gordon, M. H. (2001).** Antioxydants in food: practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. New York, USA : 108-109.
- ✚ **Proot J. (2002).** Les technologies propres appliquées aux industries agroalimentaires. Aris.T, Bourgogne, p12.

 **R**

- ✚ **Ramos-Cormenzana A. (1986)** Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. In: Inter. Symp.: On olive by-products valorization. Sevilla-Spain. 41-60
- ✚ **Ramos-Cormenzana A., Juarez-Jimenez B. (1996)** García-Pareja M.P. Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechín) and biotransformed olive oil mill wastewater. International Biodeterioration and Biodegradation : 283–290
- ✚ **Ranalli A. (1991a)** the effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. Olivae: 30-39.

- ✚ **Rayan, D. & Robards, K. (1998).** Phenolic compounds in olives. *Analyst*. 123: 31R-44R. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* :1231-1237.
- ✚ **Renné T, Nieswandt B, Gailani D. (2006).** The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*: 148-151
- ✚ **Risser A., Donovan D., Heintzman J., et Page T. (2009).** NSAID prescribing precautions. *American family physician*, :1371-8.
- ✚ **Rouba L. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols des graines de *Nigella sativa* L. Thèse de magistère en biochimie appliqué. Université Ferhat Abbes Setif .p80



- ✚ **Saiba A** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par conversion microbienne).
- ✚ **Saiz-Jiménez C., De Leeuw J.W., Gomez Alarcom G. (1987)** Sludge from the waste water of the olive processing industry: A potential soil fertilizer. *Sci. total Environ*: 445-452
- ✚ **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 : 559-564.
- ✚ **Sarni-Manchado P, Cheynier V. (2006).** Les polyphenols en agroalimentaire., Lavoisier (Tec &Doc), Paris, 300-398.
- ✚ **Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F. (2000).** Detrimental effects of high molecularmass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*, p 35.
- ✚ **Scioli C., Vollaro L. (1997)** The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research* :2520–2524

- ✚ **Sefi, M. (2010).** Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Food.Chem.Toxicol*: 1986–1993
- ✚ **Sebti, F. (2018).** Synthèse caractérisation et activités biologiques d'un ligand chélateur des ions métalliques. Thèse de doctorat.
- ✚ **Sousa A.,Ferreira, I.C.F.R.,Barros L.,Bento A.,Pereira A. (2008).** Effect of solvent and systems. *Fod Chemistry*: 501-507.
- ✚ **Stasinakis AS, Elia I, Petalas AV, Halvadakis CP. (2008)** Removal of total phenols from olive- mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace. *J Hazard Mater* :160:408.



- ✚ **Tili ML. (2015).** Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Mémoire de magister en biologie biochimie et analyse de bioproduits. Université KasdiMerbah – Ouargla, p 82.
- ✚ **Tomati U., Galli E., Di Lena G., (1991) Buffone R.** Induction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive oil wastewaters. *Agrochimica*: 273–279.
- ✚ **Tsagariki E., Harris N., Lazarides. Konstantinos B. P. (2007).** Olive mill wastewater treatment. *Springerlink*: 133-157.
- ✚ **Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G. (2002).** Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*: 251-257.
- ✚ **Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F., Polat G., (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molécules*: 484-496.



- ✚ **Urquiaga I., Leighton F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*:55-64.

➔ V

- ✚ **Veillet S.(2010).** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Thèse de doctorat. p42.
- ✚ **Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F. F., Galli C., (1999).**Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. Journal of Agricultural and Food Chemistry :3397-3401
- ✚ **Vuorela S., Kreander K., Karonen M., Nieminen R., Hämäläinen M., Galkin A., Laitinen L., Salminen J., Moilanen E., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P., and Heinonen M. (2005).** Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine barkphenolics for health related effects. Journal of Agricultural and Food Chemistry:5922-5931

➔ W

- ✚ **Wong C. C., Li H. B., Cheng K. W., Chen F. (2006).** Systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay:120-130

➔ X

- ✚ **Xiuzhen, H.,Tao, S.,Hongxiang, L.(2007).**Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. International Journal of Molecular Sciences : 950-988.

➔ Y

- ✚ **Yaakoubi A., Chahlaoui A., Rahmani M., Elyachioui M., Oulhote Y., (2009).** Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol, Agrosolution: 35-43
- ✚ **Yaakoubi A, Aghnchich B. (2021),** L'effet des margines sur la germination des graines de fève (*Vicia faba*. L) Afrique SCIENCE : 124 – 133
- ✚ **Yang X., Li J., Li X., She R. (2005).** Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus*Houtt) seeds. Peptides:27-31.

- ✚ **Yangui T., Dhouib A., Rhouma A., Sayadi S., (2009).** Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chemistry* :1-8.
- ✚ **Yi-Zhong Cai, Mei Sun, Jie Xing, Qiong Luo, (2006)** Harold Corke. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences* :2872-2888



- ✚ **Zandecki M.(2006).** Métabolisme du fer chez l'homme, Faculté de Médecine – CHU 49000 Angers France.. *Hématologie biologique*. France. p10.
- ✚ **Zeghad N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister en biotechnologie végétale. Université Mentouri-Constantine. p 26.28.
- ✚ **Zerari M, 2019** Contribution à l'exploration phytochimique et l'évaluation in vitro des activités biologiques d'une plante médicinale locale «*Thapsia garganica L* ».Mémoire de master .option : Biochimie appliqué. Université Abbes Laghrour –khenchela-
- ✚ **Zghari B ., Benyoucef F ., Boukir A. (2018)** Impact rnvironemental des margines sur les eaux d'oued ousserfou, *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences* : 2429-5396
- ✚ **Zhang A, ZhouQ Y, Luk Y S, Fung K P., Chen K Y. (1997).** Inhibitory effects of jasmine Green tea epicatechin isomers on free radical induced lysis of red blood cells. *Life sciences*. 61-383.

Annexes

La solution tampon phosphate (PBS) est une solution isotonique et non toxique utilisée couramment en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate dipotassique et de chlorure de potassium. Il est utilisé pour le lavage ou la dilution des cellules. Pour la préparation de PBS à pH égale à 7.2 on a besoin de :

- 13.21g/L de la base Na_2HPO_4 .
- 20.29g/L de l'acide $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$.
- 80g/L de NaCl .
- 2g/L de KCl .

Dissoudre les composants dans 100ml de l'eau distillée avec l'agitation jusqu'à l'homogénéiser par un agitateur et conservé à 4°C dans des fioles au réfrigérateur, jusqu'au moment de l'utilisation. Il ne faut pas congeler, surchauffer, conditionner dans des fioles présentant une fissure ...etc. Pour faciliter la préparation, il y a des comprimés commerciaux de tampon PBS qui donnent une solution PBS prête à l'emploi après leur dissolution dans une certaine quantité d'eau.

Mémoire
Master Académique
Option : Biochimie appliquée
Présenté par
BRIK Amira
BOUALLAGUE Maïssoun
ZEROUK Hadil

Thème

**Caractérisation physico-chimique et étude *in vitro* des activités biologiques
des polyphénols extraits des margines**

Résumé

La production de l'huile d'olive génère des quantités énormes d'effluents nommés "Margines", qui ont peu de valeur économique en Algérie et un polluant puissant déversé dans la nature sans aucun traitement préalable mais qui pourrait être considéré comme une source potentielle de produits naturels de haute valeur additive, en raison de leur teneur en composés phénoliques et d'autres antioxydants naturels. Cette étude a pour objectif de mise en évidence des activités biologiques des polyphénols issus de ces margines (variété *chemlal*) récoltée à Khenchela. La caractérisation physico-chimique des échantillons a montré des rejets acides (pH =4,64), de couleur marron avec un taux d'humidité élevé (H= 95,45%), un teneur en solide total en suspension beaucoup plus important (STS =0,55%), riches en matières organique (MO =14 %), pauvre en matière minérale (MM=2 %), et en teneur d'azote avec 0,42g/l et en matière sèche avec 8,55g/l. Une extraction liquide-liquide a été effectuée, en utilisant l'acétate d'éthyle (EtOAc), l'acétone (Ac) et le n-butanol (n-BuOH). Le dosage des polyphénols totaux a montré une richesse des extraits EtOAc et Ac avec 80 et 70 µgEAG/mg d'extrait respectivement, et 10 µg EAG/mg pour l'extrait *n-BuOH*. L'analyse qualitative des extraits par la CCM a révélé une diversité des composés phénoliques. La capacité antioxydante résultante a montré que tous les extraits inhibent l'oxydation DPPH avec des pourcentages entre 51.82 et 90% à des très faibles concentrations, l'action anti-inflammatoire a été prouvée *in vitro* en inhibant la dénaturation des protéines et en augmentant la stabilité de la membrane des HRBC (Human Red Blood Cells) dont l'extrait acétonique a été le plus efficace. Les temps de Quik et Céphaline Kaolin ont été utilisés pour analyser les voies de coagulation extrinsèque et intrinsèque afin de déterminer l'activité anticoagulante. L'extrait Ac a eu le plus grand impact sur l'allongement des deux tests chronométriques.

Mots-clés : Margines, polyphénols, physicochimique, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante, activité anticoagulante.

Jury d'évaluation

- **Promotrice** : Dr. DOUAOUYA Lilia
- **Président** : Dr. THABET Rachid
- **Examineur** : Dr. MAAMAR Hichem

Lieu d'étude

- Laboratoire pédagogique de biologie, Université Abbés Laghrour /Khenchela
- Hopital Ahmed bala /Khenchela
- Polyclinique BOUCHWAREB Hamou /Khenchela

Année universitaire 2021/2022

