



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère De l'Enseignement Supérieur et

De la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR - KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Biologie

Option : Microbiologie générale

Thème :

**Caractérisation physico-chimique des
margines et évaluation de leur activité contre
les bactéries à Gram positif**

Présenté par :

M. BOUACID Abdallah

M^{elle} BAALI Amel

Encadré par :

M^{elle} YAKHLEF Wahiba

Soutenu le : 15/06/2015

Jury de soutenance :

Président : M^{me} **Labani Fatma Zohra** (MAB) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

Encadreur : M^{elle} **YAKHLEF Wahiba** (MAA) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

Examineur : M^{me} **CHORFI Kelthoum** (MAB) Univ. Abbès Laghrou- Khenchela

Promotion : Juin 2015

Travail réalisé au niveau du Campus des Laboratoires Pédagogiques, Université de Khenchela.



Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience pour mener ce travail à bout.

*Nous exprimons nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à Mademoiselle **YAKHLEF Wahiba**, Maître-assistante à l'Université Abbès Laghrour de Khenchela, d'avoir dirigée ce travail avec une grande rigueur scientifique ainsi que pour sa disponibilité, ses conseils.*

*Une très grande reconnaissance va à Madame **LABANI Fatma Zohra**, Maître-assistante à l'Université Abbès Laghrour de Khenchela, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*Nous adressons également nos sincères remerciements à Madame **CHORFI Kelthoum**, Maître-assistante à l'Université Abbès Laghrour de Khenchela, d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.*

*Nous tenons également à exprimer notre gratitude et notre respect à : Melle **BENAMMAR Leyla** et M. **CHENAKER Hichem** pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apporté.*

*Un grand merci à toute l'équipe du Campus des Laboratoires Pédagogiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, en particulier Mme **CHORFI Rafika** et Mme **BOURMADA Madjida**, qui ont mis à notre disposition tout le matériel nécessaire pour la réalisation de ce travail.*

*Un grand merci à nos adorables amies **MERRAH Widdad** et **MEHDI Fatima** qui nous aident pendant la réalisation de ce travail.*



Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes parents

Mes frères et Mes sœurs

A toutes ma famille

A mes enseignantes

A mes amis

Ma promotion de master

Bouacid Abdallah



Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes parents

Mes frères et Mes sœurs

A toutes ma famille

A mes enseignantes

A mes amis

Ma promotion de master

Baali Amel

Table des matières

Liste des abréviations	I
Liste des figures.....	II
Liste des photographies	III
Liste des tableaux.....	IV
INTRODUCTION.....	1

Revue bibliographique

Chapitre I: Les effluents oléicoles

I. Généralités sur l'olivier.....	2
I.1. L'oléiculture dans le monde.....	2
I.2. L'oléiculture en Algérie.....	3
I.3. Les variétés d'olives.....	3
II. De l'olivier à l'huile d'olive	6
II.1. L'extraction de l'huile d'olive.....	6
II.1.1. Nettoyage.....	6
II.1.2. Broyage et malaxage.....	6
II.1.3. Séparation des phases.....	7
III. Les margines.....	9
III.1. Les caractéristiques physico-chimiques.....	9
III.2. La composition chimique.....	9
III.3. Dépollution des margines.....	10
III.4. Valorisation des margines.....	12

Chapitre II : Les composés phénoliques

I. Classification	13
II. Voies de biosynthèse	13
II.1. La voie de Shikimate	13
II.2. La voie de phényl-propanoïde	16
II.3 La voie d'acide acétique	17
III. Les composés phénoliques de l'olivier	18
III.1. Les feuilles de l'olivier	18

III.2. Les olives de tables.....	18
III.3. L'huile d'olive	19
III.4. Les grignons	19
III.5. Les margines	19
IV. Les propriétés biologiques des composés phénoliques.....	20

Chapitre III : Les bactéries à Gram positif

I. Généralités.....	21
II. La coloration de Gram	22
III. La structure des Gram positif.....	22
III.1. La membrane cytoplasmique	22
III.2. La paroi	23
III.2.1. Le peptidoglycane	23
III.2.2. Les acides téchoïques et lipotéichoïques	23
IV. Les cocci à Gram positif	24
IV.1. Les staphylocoques	24
IV.2. Les streptocoques et les entérocoques	25
V. Les bacilles à Gram positif	25
V.1. <i>Listeria</i>	25
V.2. <i>Clostridium</i>	26
V.3. <i>Corynaebacterium</i>	26

Chapitre IV : Les techniques d'étude de l'activité antibactérienne

I. Les agents antimicrobiens.....	27
I.1. Les agents physiques.....	27
I.2. Les agents chimiques	28
I.3. Les agents chimio-thérapeutiques	30
II. La mesure de l'activité antibactérienne	30
II.1. Le coefficient phénol	30
II.2. La concentration minimale inhibitrice	30
II.3. La diffusion sur gélose.....	31

Matériel et méthodes

I. Echantillonnage	32
II. Caractérisation des margines.....	32
II.1. Mesure du pH	32

II.2. Conductivité électrique et Salinité	32
II.3. Humidité et matière sèche.....	32
II.4. Demande biologique en oxygène	33
II.5.Demande chimique en oxygène	33
III. Extraction des composés phénoliques	34
III.1. Acidification	34
III.2. Délipidation	34
III.3. Extraction liquide-liquide.....	34
IV. Dosage des polyphénols totaux des extraits	36
V. Evaluation de l'activité antibactérienne	38
V.1. Inoculât des bactéries tests	38
V.2. Préparation des suspensions et ensemencements	38
V.3. Méthode de diffusion en milieu gélosé	38

Résultats et discussion

I. Caractérisation des margines.....	40
I.1. Le pH.....	40
I.2. La conductivité électrique et la salinité	40
I.3. L'humidité et la matière sèche.....	41
I.4. Les demandes chimique et biologique en oxygène.....	41
II. L'extraction des composés phénoliques.....	42
III. Dosage des polyphénols totaux	42
IV. L'évaluation de l'activité antibactérienne	43
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	48

Références bibliographiques

Résumés

Abréviations

ADN: Acide Désoxynucléique

ATCC: American Type Culture Collection

C°: Degré Celsius

CARPP : Centre d'Activité Régionale pour la Production Propre

CE: Conductivité électrique

COI: Conseil Oléicole International

Cm: Centimètre

CMI: Concentration Minimal Inhibitrice

CP: Composés phénoliques

CPG: chromatographie en phase gazeuse

DBO₅: Demande biochimique en oxygène en cinq jours

DCO: Demande chimique en oxygène

g: Gramme

H: Humidité

h: Heure

Kg : Kilogramme

L: Litre

mg: Milligramme

min: Minute

ml: Millilitre

mM: Milli Mol

mS : Milli Siemens

MS : Matière sèche

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

O₂ : Dioxygène

pH : Potentiel d'hydrogène

SS: solide en suspension

UFC : Unité Formant une Colonie

µm: Micromètre

µl : Microlitre

V: Volume

Liste des figures

Figure 01 : Principaux pays producteurs de l'huile d'olive.....	3
Figure 02 : Répartition de la superficie d'olivier en Algérie.....	3
Figure 03 : procédé moderne d'extraction de l'huile d'olive	7
Figure 04 : Extraction de l'huile d'olive par système continue et discontinue.....	8
Figure 05: Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel.	11
Figure 06. Principales voies de valorisation et de traitement des margine.....	12
Figure 07: La voie de Shikimate.....	16
Figure 08. La voie de phényl-propanoïde.....	17
Figure 09. La voie de l'acide acétique.....	17
Figure 10: La voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	18
Figure 11 : Les éléments composants la cellule bactérienne.....	21
Figure 12: L'aspect des cocci à Gram positif et des bacilles à Gram négatif à la coloration de Gram.....	22
Figure 13: La structure de la membrane cytoplasmique bactérienne.....	23
Figure 14 : Les composants de la paroi des Gram positif.....	24
Figure 15 : Les principaux agents antimicrobiens et leurs mode d'action.....	29
Figure 16 : La technique de la concentration minimale inhibitrice	31
Figure 17: La détermination de l'activité antibactérienne sur gélose.....	31
Figure 18: Délipidation par ampoule à décanter.....	34
Figure 19: Protocole d'extraction des polyphénols des margines.....	37
Figure 20: Les teneurs en humidité et en matière sèche des deux échantillons des margines.	41

Figure 21: Droite d'étalonnage des polyphénols totaux.....	42
Figure 22 : Les teneurs des dosages des polyphénols totaux.....	43
Figure 23 : L'activité antibactérienne sur les sept bactéries tests	44

Liste des photographies

Photographie 01 : Caractérisation des margines et extraction des composés phénoliques..	35
Photographie 02 : Dosage des composés phénoliques	36
Photographie 03 : Tests de l'activité antibactérienne.....	39
Photographie 04 : L'effet inhibiteur des extraits sur les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> ...	46
Photographie 05 : L'effet inhibiteur des extraits sur les deux bacilles à Gram positif.....	47

Liste des tableaux

Tableau 01 : Situation botanique de Genre <i>Olea</i>	2
Tableau 02 : Principales variétés d'olivier cultivées dans le monde.....	4
Tableau 03 : Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie.....	4
Tableau 04: La composition minérale des margines.....	10
Tableau 05. Technologies de traitement appliquées sur les margines.....	12
Tableau 06: Principales acides phénoliques simples.....	14
Tableau 07: Principales classes des flavonoïdes.....	15
Tableau 08 : Structure et teneur des monomères phénoliques rencontrés dans les margines	20
Tableau 09 : Pouvoir pathogène de streptocoques et des entérocoques	25
Tableau 10 : Les principaux agents antiseptiques et désinfectants.....	28
Tableau 11 : Caractéristiques des échantillons étudiés.....	32
Tableau 12 : Les souches bactériennes test utilisées.....	38
Tableau 13 : Les caractéristiques physico-chimiques des margines étudiées	40

INTRODUCTION



L'industrie oléicole est une activité économique importante concentrée principalement dans les pays méditerranéens, qui tiennent environ 95% de la production mondiale (**Gomri, 2013**). Comme toutes les industries agro-alimentaires, la trituration des olives engendre d'importantes quantités d'effluents liquides qu'on appelle margines ou eaux de végétation. On estime généralement d'un kilogramme d'olive fournit 1 à 1,5 litres de margines (**Ouffad, 2011**).

En absence de techniques de traitements adaptés, ces effluents sont souvent déversés dans les égouts d'assainissement ou répandus directement sur le sol. Il en résulte un impact négatif sur l'environnement qui se traduit par le colmatage des sols, la pollution des eaux superficielles et souterraines et le dégagement d'odeurs nauséabondes (**Lakhtar, 2009**).

La toxicité des margines est principalement attribuée à leur richesse en matière organique et en composés phénoliques (tannins, flavonoïdes, acides phénoliques) responsables d'effets phytotoxiques et antimicrobiens (**El hajjouji, 2001**).

Les composés phénoliques sont doués de diverses activités biologiques (antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires, antiallergiques et antimicrobiennes), ce qui a orienté les chercheurs vers leur valorisation dans divers domaines (**Zeghad, 2009**). En effet, la récupération des polyphénols des margines offre la double possibilité d'obtenir des biomolécules à haute valeur et de réduire la toxicité de ces effluent.

L'évaluation des propriétés antibactériennes des polyphénols naturels demeure une tâche intéressante face à l'émergence rapide des phénomènes de l'antibio-résistance. C'est dans ce contexte que nous sommes intéressés à valoriser les composés phénoliques des margines comme agents antibactériens. Ainsi, notre étude a pour objectifs essentiels :

- La caractérisation physico-chimique des margines issues de différentes huileries ;
- L'extraction des composés phénoliques de ces margines ;
- La quantification du contenu phénolique de chaque extrait ;
- Et enfin, l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces substances vis à vis des bactéries pathogènes à Gram positif.

Chapitre I:
Les effluents
oléicoles



I. Généralités

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen, de 6 à 8 m de hauteur, à tronc tortueux et à écorce grisâtre et crevassée. Les feuilles sont blanches argentées sur la face inférieure, vertes grisâtres sur la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces et lancéolées. Les fleurs, petites et blanches, à quatre pétales, sont réunies en grappes dressées (Benlemlih & Ghanam, 2012).

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 (Loukas & Krimbas, 1983 ; Blazquez, 1996).

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

Tableau 01 : Situation botanique de Genre *Olea*. (Blazquez, 1996 ; Lavee, 1996).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dialypetales</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Oleaceae</i>
Genre	<i>Olea</i>

I.1. L'oléiculture dans le monde

L'oléiculture se concentre principalement dans les pays du pourtour méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, Syrie, Tunisie, Maroc et l'Algérie. La production de ces pays représente 94% de la production mondiale. En 2001, la production mondiale d'olives atteignait les 2.5 millions de tonnes (Benyahia & Zein, 2003)

Le patrimoine oléicole mondial compte actuellement environ 750 millions d'oliviers cultivés sur une superficie de 9,23 millions d'hectares. Les pays méditerranéens comptent 715

millions d'oliviers sur une superficie d'environ 8.16 millions d'hectares, soit 95 % du patrimoine oléicole mondial (Fiorentino *et al.*, 2003; El hajjouji, 2007; Tsagariki *et al.*, 2007).

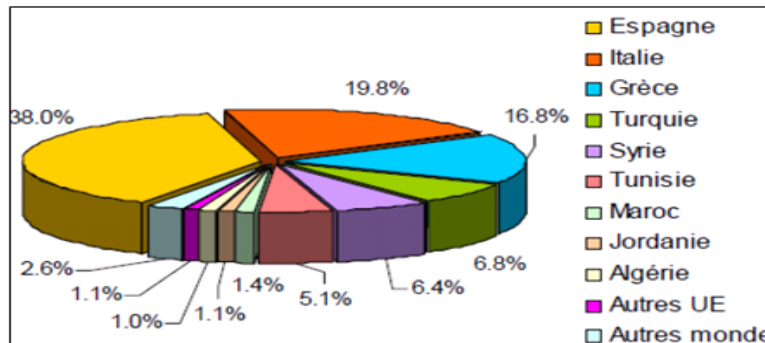


Figure 01 : Principaux pays producteurs d'huile d'olive (COI, 2001).

I.2. L'oléiculture en Algérie

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est des plus propices à la culture de l'olivier. Elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs d'huile d'olive (Tsagariki *et al.*, 2007). Le patrimoine oléicole algérien est estimé à 32 millions d'oliviers, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. La production annuelle en huile a atteint 35.000 tonnes et celle de l'olive de table 80.000 tonnes (Bensemmane, 2009).

En Algérie, l'oléiculture couvre 24% de la surface agricole utilisée, soit 200 000ha répartis notamment sur les zones Est et Centre-Est du pays, en particulier Béjaia, Tizi Ouzou, Bouira, Bordj-Bouarreridj, Sétif et Jijel, qui représentent ensemble 69% de la superficie totale de l'oléiculture Figure 02 (Madr *et al.*, 2003).

I.3. Les variétés des olives

Selon le Conseil Oléicole International (COI, 2006), actuellement on dénombre près d'une centaine de variétés d'oliviers cultivées dans le monde tableau 02.

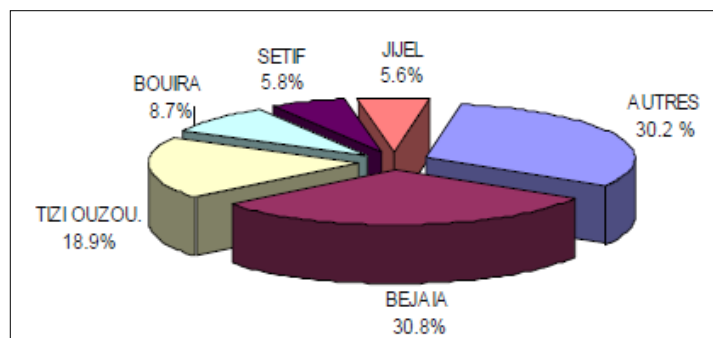


Figure 02 : Répartition de la superficie d'olivier en Algérie (Madr *et al.*, 2003).

Tableau 02 : principales variétés d'olivier cultivées dans le monde (C.O.I, 2006).

Pays producteur	Part de la production	Variétés principales
Espagne	44%	<i>Picual, cornicabra, hojibianca, gordal, Manzanilla</i>
Italie	20%	<i>Frantoio, leccino, moraiolo, ascolona tenera</i>
Grèce	13%	<i>Koroneiki, mastoidis, conserviola, Kalamata</i>
Turquie	7%	<i>Ayvalik, cakir, gemlik</i>
Syrie	7%	<i>Sorani, zaiti,</i>
Tunisie	2%	<i>Chemlal, chetoui, ouslati, meski</i>
Maroc	2%	<i>Picholine marocaine</i>
Algérie	1%	<i>Chemlal, limli, azeradj, sigoise</i>
Portugal	1%	<i>Verdal, carrasquenha, galega, redonli</i>
France	Infime	<i>Sabina, verdale, picholine, tanche, Lucques</i>

En rouge : variété à huile. En vert : variétés mixtes. En bleu : variétés d'olives de table.

L'Algérie dispose d'un patrimoine constitué de 164 cultivars autochtones et introduits de toute la méditerranée et même d'autres atlantiques. Les travaux de caractérisation entamés par Amirouche et Ouksili (Mendil & sebai, 2006), ensuite par Mendil et Sebai (2006) ont permis de répertorier 72 variétés autochtones dont 36 sont homologuées, le reste est en cours de réalisation. Les variétés nationales les mieux connus sont recommandés dans les régions d'origine (tableau 03).

Tableau 03 : Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie (Mendil & sebai, 2006).

Variétés et Synonymes	Origines et diffusion	Caractéristiques
Var.Azeradj Blanquette de Guelma	Petite kabylie (oued Soummam), occupe 10% de la surface oléicole nationale Originaire de Guelma ; assez répandue dans le Nord-est constantinois, Skikda et Guelma	Arbre rustique et résistant à la sécheresse ; fruit de poids élevé et de forme allongée ; utilisé pour la production d'huile et olive de table, rendement en huile de 24 à 28% Sa rigueur est moyenne, résistant au froid et moyennement à la sécheresse ; le fruit de poids moyen et de forme ovoïde, destiné à la production d'huile, le rendement de 18 à 22% ; la multiplication par bouturage herbacé donne un bon résultat 43,4%
Bouricha, olive d'El-Hrrouch	El-Harrouch, Skikda	Arbre rustique, résistant au froid et a la sécheresse ; poids faible du fruit et de forme allongée, production d'huile, rendement de 18 à 22%.

Chemlal Syn.Achemlal	Occupe 40% du verger oléicole national, pré »sent surtout en Kabylie, s »entend du mont Zekkar à l'Ouest aux Bibans à l'Est.	Variétés rustique et tardive, le fruit est de poids faible et de forme allongée, destiné à la production d'huile, le rendement en huile de 18 à 22%
Ferkani, ferfane	Ferfane (Tébessa), diffusée dans la région des Aurès	Variété de vigueur moyenne, résistante au froid et à la sécheresse, le poids de fruit est moyen et de forme allongée, production d'huile et rendement très élevés 28 à 32%, le taux d'enracinement des boutures herbacées de 52.30% ; variétés en extension en régions steppiques et présahariennes
Grosse de Hamma, Syn. Queld Ethour	Hamma (Constantine)	Variété précoce, résistante au froid et à la sécheresse ; fruit de poids très élevé et de forme allongé, double aptitude : hile et olive de table, le rendement de 16 à 22%
Hamra, Syn. Rougette ou Roussette	Originnaire de Jijel, diffusée au nord constantinois	Variété précoce, résistante au froid et à la sécheresse, le fruit est de poids faible et ovoïde, utilisée pour la production d'huile, rendement de 18 à 22%.
Limli	Originnaire de Sidi-Aich (Bejaïa), occupe 8% du verger oléicole national, localisée sur les versants montagneux de la base vallée de la Soummam jusqu'au littoral.	Variété précoce, peu tolérante au froid, résistante à la sécheresse ; le fruit est de poids faible de forme allongée, utilisée dans la production d'huile, le rendement de 20 à 24%.
Longue de Maliana	Originnaire de Maliana, localisée actuellement dans la région d'El-Khemis, cherchell et le littoral de Ténés.	Variété tardive, sensible au froid et à la sécheresse ; le fruit est de poids moyen et de forme sphérique, utilisé pour la production d'huile et olives de table, rendement de 16 à 20%
Rougette de Mitidja	Plaine de Mitidja	Variété rustique ; le fruit est moyen et allongé, utilisé pour la production d'huile, rendement de 18 à 20% ; le taux d'enracinement des boutures herbacées donne un résultat moyen de 48.30%
Souidi	Vallée d'Oued Arab Cherchar Khenchela	Variété tardive, résistante au froid et à la sécheresse ; fruit moyen et allongé, utilisé dans la production d'huile, le rendement de 16 à 20% ; le taux d'enracinement très faible.
Sigoise ou olive de Tlemcen ou olive de Tell.	Elle est dominante depuis Oued Rhiou jusqu'à Tlemcen	Variétés rustique, le fruit est de poids moyen et de forme ovoïde, produit une olive à deux fins est très recherchée pour la conserverie et donne un bon rendement en huile de 18 à 22%, le taux d'enracinement moyen est de 51.6%, elle est sensible au <i>dacus</i> et au <i>coclonium</i> .

II. De l'olivier à l'huile d'olive

La récolte est une opération importante de la culture de l'olivier et, par conséquent, elle doit être contrôlée de près étant donnée ses répercussions sur le coût de la production, la qualité du produit obtenu et la qualité de l'huile d'olive. Cette dernière est affectée aussi bien par les modalités de récolte (système, durée) que par l'époque à laquelle intervient celle-ci (ONUDI, 2007).

Dans le souci de conserver les caractéristiques de qualité que les olives possèdent au moment de la récolte sur l'arbre, il s'avère nécessaire de les acheminer immédiatement vers les moulins.

Le moyen le plus approprié pour le transport des olives est représenté par les caisses à claire voie en matière plastique permettant la circulation de l'air et évitant des réchauffements préjudiciables causés par l'activité catabolique des fruits (ONUDI, 2007).

II.1. L'extraction d'huile d'olives

L'objectif idéal de toute méthode d'extraction consiste à produire la plus grande quantité d'huile possible sans l'altération de sa qualité d'origine. Toutefois, si la qualité ne doit pas être modifiée, il est nécessaire d'utiliser uniquement des méthodes mécaniques ou physiques pour extraire l'huile, en évitant les réactions chimiques et enzymatiques qui pourraient changer sa composition naturelle (Di Giovacchino *et al.*, 2002).

II.1.1. Nettoyage

Le nettoyage comporte deux opérations : l'effeuillage et le lavage. Les défoliateurs aspirent les feuilles, les brindilles et les saletés à travers un flux d'air puissant généré par un ventilateur d'extraction. Après quoi, les olives sont lavées par un courant d'eau (Benlemlih & Ghanam, 2012).

II.1.2. Broyage et malaxage

Le broyage est une opération qui consiste à la dilacération du tissu des olives pour libérer les gouttelettes d'huile contenues dans les vacuoles à l'intérieure des cellules d'olives. Après, le malaxage consiste en un broyage lent et continu de la pâte d'olive préalablement chauffée. Il a pour but de libérer le maximum d'huile en brisant les vacuoles qui sont restées entières durant la phase précédente et d'amasser les gouttelettes d'huile en gouttes plus grosses (Gomri, 2013).

II.1.3. Séparation des phases

II.1.3.1. Système discontinu

Ce système utilise des presses métalliques à vis ou, le cas échéant des presses hydrauliques. La pâte issue du broyage est empilée sur les scourtin, à raison de 5 à 10 Kg par scourtin. L'application de la pression sur la charge des scourtin doit être réalisée de manière progressive. L'opération de pressage dure au moins 45 mn. Les scourtin doivent être lavés, selon les normes internationales en vigueur et à raison d'une fois par semaine pour éviter d'augmenter l'acidité de l'huile. Le système discontinu d'extraction par presse est représenté par la figure 4 (Bouhadjra, 2011).

II.1.3.2. Les systèmes en continu

Les systèmes en continu à trois ou à deux phases constituent les systèmes les plus modernes, ils utilisent des centrifugeuses pour la séparation de la pâte.

Dans le système à trois phases, la quantité d'eau ajoutée dans le malaxeur est supérieure à celle du système traditionnel (entre 80-100/100 Kg d'olive), et la production des margines est très importante (Martinez- Garcia *et al.*, 2006).

Pour le système à deux phases, il ne nécessite pas d'ajout d'eau pour le processus d'extraction mais il y a une génération de grignon humide (CARPP, 2000).

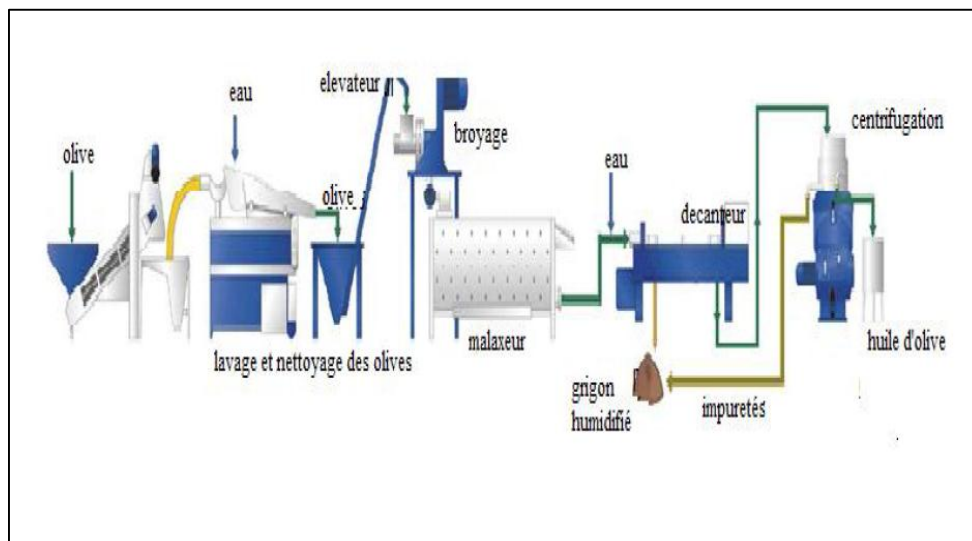


Figure 03 : schéma d'un procédé moderne d'extraction de l'huile d'olive (Sekour, 2012)

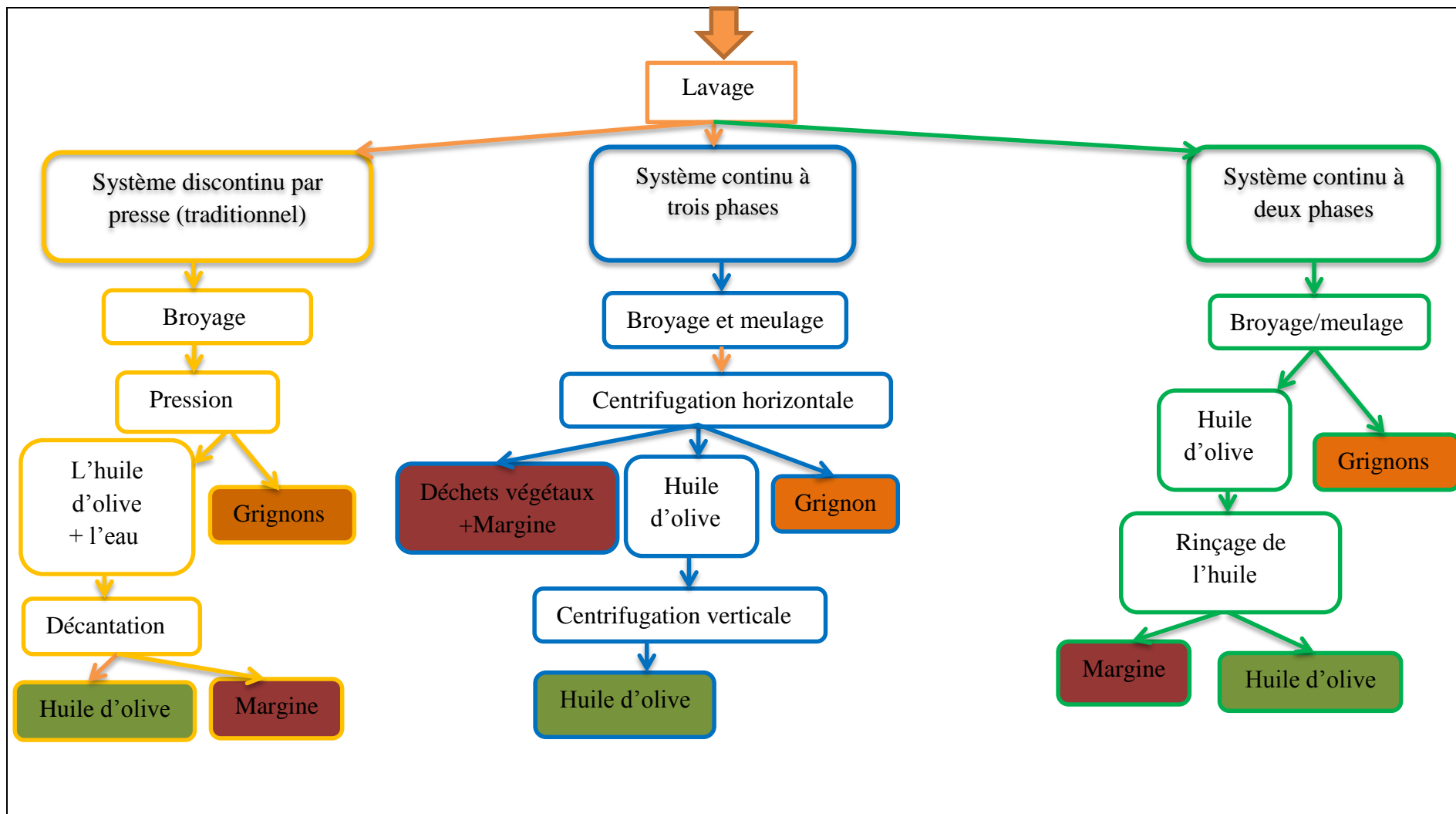


Figure 04: Extraction de l'huile d'olive par système continu et discontinu (Morillo, 2009)

III. Les margines

Les eaux de végétation (margines) sont obtenues lors de l'extraction de l'huile d'olive à partir de l'eau contenue dans le fruit et celle ajoutée au cours du broyage et des étapes de la trituration (**Fiorentino et al., 2003**). En fonction du système d'extraction utilisé, on estime généralement qu'un kilogramme d'olives fournit de 1 à 1,5 litre de margines. La production d'huile d'olive dans le monde atteint 250 000 tonnes par an, ce qui est équivalent à 3 750 000 litres d'eau de végétation (**Zouari & Ellouz, 1996; Léger, 1999; FAO, 2003**).

III.1. Les caractéristiques physico-chimiques

La margine est un liquide légèrement acide, de couleur brun rougeâtre à noir en fonction de l'état de dégradation des composants phénoliques et des olive dont elles proviennent ; d'odeur forte de l'huile d'olive, de goût amer, de degré élevé de pollution organique (protéines, lipides, glucides et polyphénols peu biodégradable) qui inhibent la croissance des micro-organismes (**Rivas et al., 2000**). Leur pH est acide (4,2-5,9), une salinité élevée exprimée en conductivité électrique qui se varie de (18 à 50 ms.Cm⁻¹), une demande chimique en oxygène (DCO) de (50 à 200 g d'O₂/L), une demande biochimique en oxygène (DBO₅) de (12 à 60 g d'O₂/L) et enfin des solides en suspension (SS) de (40 à 150 g/L) (**Panizza & Cerisola, 2006 ; Di Serio et al., 2008 ; Eroglu et al., 2008**).

III.2. La composition chimique

La composition chimique des margines est très variable, elle dépend de plusieurs paramètres (**Annaki et al., 1999b**) comme le stade de maturation des olives, les conditions climatiques, les variété d'oliviers, la situation géographique, le temps, les techniques et lieu de stockage des olives et enfin le procédé d'extraction d'huile d'olive qui représente le facteur le plus important (**Ramos-Cormenzana, 1986 ; De Felice et al., 1997 ; Annaki et al., 1999b**).

La margine peut être considérée comme un complexe chargé en matières organique et minérale. Sa composition massique est de (83 à 94%) eau, 4 à 16% de matière organique et 0,4 à 2,5% de sels minéraux (**Noubih et al., 2007**). La matière organique des effluents d'huileries d'olive est constituée par des polysaccharides (13-53%), des protéines (8-16%), des composés phénoliques (2-15%), des lipides (1-14%), des polyalcools (3-10%) et des acides organiques (3-10%). Cette composition résulte de la destruction des tissus de l'olive au

cours de la trituration et de l'extraction de l'huile (Fiestas & Borja, 1992b ; Cossu *et al.*, 1993 ; Al Mallah *et al.*, 2000 ; Centi *et al.*, 2000 ; Chamkha *et al.*, 2001).

Les margines contiennent des quantités significatives de sels minéraux, 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%) (Ranalli, 1991 ; Fiestas & Borja, 1992 ; Tsagariki *et al.*, 2007).

Les valeurs minimales et maximales des minéraux et métaux lourds déterminées dans les margines issues de deux systèmes d'extraction d'huile sont données dans le tableau 04.

Tableau 04 : La composition minérale des margines (C.O.I, 2008)

Eléments (mg/L)	Procédé d'extraction de l'huile	
	Traditionnel	Moderne
Sodium	38-285	18-124
Potassium	1500-5000	630-2500
Calcium	58-408	47-200
Magnésium	90-336	60-180
Fer	16,4-86,4	8,8-31,5
Cuivre	1,1-4,75	1,16-3,42
Zinc	1,6-6,5	1,42-4,48
Manganèse	2,16-8,9	0,87-5,2
Nickel	0,44-1,58	0,29-1,44
Cobalt	0,18-0,96	0,12-0,48
Plomb	0,40-1,58	0,35-0,72

III.3. Dépollution des margines

Les margines sont caractérisées par une concentration élevée en polyphénols et en matières organiques (camurati *et al.*, 1984). Une fois rejetées sans traitement préalable, ces effluents auront un impact négatif sur l'environnement, dû à leur pouvoir d'inhiber le développement des plantes et de certains microorganismes (Filidei *et al.*, 2003).

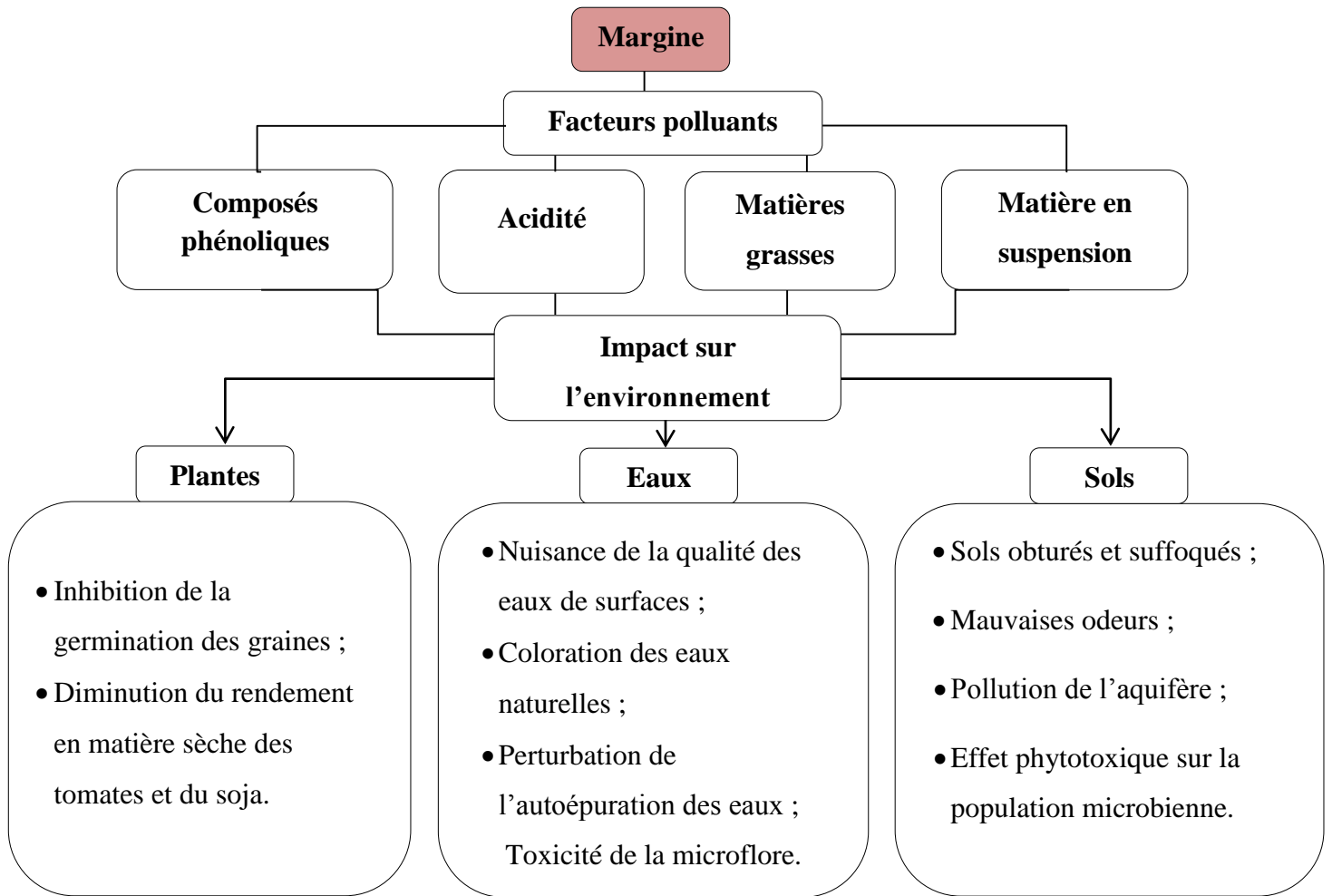


Figure 05. Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel (Projet SMAP III –Tunisie, 2006-2008).

Jusqu'à nos jours, le traitement des margines constitue un problème complexe vue la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment (Ranalli, 1991a ; Hamdi, 1993a). Les procédés de traitement envisageables pour l'élimination de la charge polluante des margines peuvent être classés en trois catégories (physiques, chimiques et biologiques), ces derniers peuvent être utilisés seuls ou combinés. Le choix du système de traitement approprié est lié à plusieurs facteurs locaux, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la possibilité de stockage et le rapport entre la charge produite par les huileries et la population locale (Francesco, 1993).

Tableau 05. Technologies de traitement appliquées sur les margines

Type de traitement	Procédé	Référence
Thermique	Evaporation naturelle	(Lacomelli, 2000)
	Evaporation forcée	(Lacomelli, 2000)
Biologique	Lagunage	(Kavvadias <i>et al.</i> , 2010)
	Aérobic	(Borja <i>et al.</i> , 1995)
	Anaérobic	(Arda <i>et al.</i> , 2010)
	Aérobic anaérobic	(Kavvadias <i>et al.</i> , 2010)
	Enzymatique (laccase)	(Gonçalves <i>et al.</i> , 2009)
Physique	Procédés membranaires	(Kavvadias <i>et al.</i> , 2010)
	Neutralisation-Floculation	(Kavvadias <i>et al.</i> , 2010)
	Procédés d'adsorption	(Azbar <i>et al.</i> , 2000)
	Biofiltration	(Lacomelli, 2000)
Physico-chimique	Electrocoagulation	(Mantzavinos <i>et al.</i> , 2005)
	Coagulation-Floculation	(Dias <i>et al.</i> , 2004)

III.5. Valorisation des margines

Les margines sont riches en éléments nutritifs minéraux et organiques. Ce critère a amené les chercheurs à mettre au point de nombreux procédés de valorisation (Fiestas Ros de Ursinos, 1981). 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, de l'agriculture et voire même du génie civile d'autre part (Levis-Menzi *et al.*, 1992).

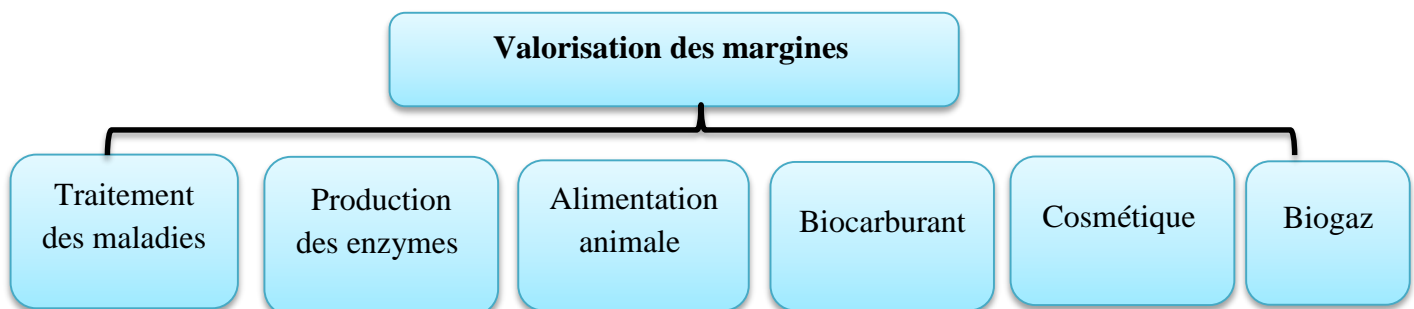


Figure 06. Principales voies de valorisation et de traitement des margines (Fiorentino *et al.*, 2003b)

Chapitre II:
Les composés
phénoliques



Les composés phénoliques sont des phyto-micronutriments, synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (**Gee & Johnson, 2001**). Les composés phénoliques contribuent fortement au goût piquant, à l'astringence et à l'amertume des huiles (**Brenes et al., 2000**). De nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de leur consommation sur la santé.

En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer (**Brown et al., 1998**) et les maladies dégénératives et cardio-vasculaires (**Paganga et al., 1999**).

Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga & Leighton, 2000**). Les polyphénols présentent une structure très variée. Il existe des molécules de structure simple, de forme phénolique avec un cycle benzénique sur lequel sont fixés des groupements hydroxyles (les acides coumarique, OH-coumarique, caféique, ferrulique, cinnapique), et des composés plus complexes qui sont les flavonoïdes et les anthocyanes (**Macheix et al., 2005b**). Les principaux composés phénoliques ne se trouvent pas à l'état libre mais sous forme d'esters ou d'hétérosides (**Ribereau-Gyon, 1968**).

I. Classification

Les composés phénoliques sont regroupés en nombreuses classes qui se différencient par leurs voies de la biosynthèse, la complexité de leur squelette de base (de simple C₆ à des formes polymérisées), les degrés de modification de ce squelette (degrés d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation) et la liaison possible de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines) (**Macheix et al., 2005b**).

II. Biosynthèse

II.1. La voie de Shikimate

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ces acides aminés sont formés à partir des sucres simples issus du métabolisme primaire par la voie l'acide shikimique. La désamination de la phénylalanine donne naissance au précurseur direct des phénols: l'acide cinnamique (**Ribereau-Gayon, 1968**).

Tableau 06: Principales acides phénoliques simples
(Harbone, 1989 ; Macheix, 1990 ; Sarni-Manchado & Cheyner, 2006; Macheix *et al.*, 2005a).

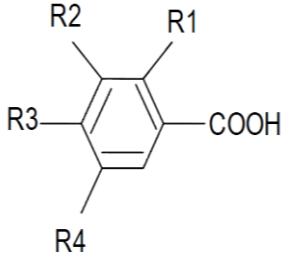
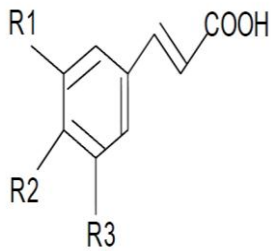
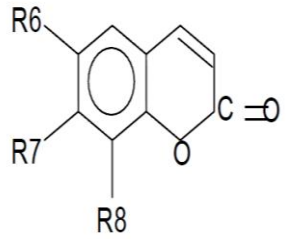
Classe des acides phénoliques simples	Squelette carboné	Structure	Les Radicales				Exemple
			R1	R2	R3	R4	
Acides hydroxybenzoïques	C6-C1		H	H	H	H	Acide benzoïque
			H	H	OH	H	Acide p hydroxyl benzoïque
			H	OH	OH	H	Acide protocatechique
			H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
			H	OH	OH	OH	Acide gallique
Acides hydroxycinnamiques	C6-C3		H	H	H	Acide cinnamique	
			H	OH	H	Acide p coumarique	
			OH	OH	H	Acide caféique	
			OCH ₃	OH	H	Acide férulique	
			OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique	
Coumarines	C6-C3		H	OH	H	Umbelliférol	
			OH	OH	H	Aescultol	
			OCH ₃	OH	H	Scopolétol	
			OCH ₃	OH	OH	Fraxétol	
			H	OH	OH	Daphnétole	

Tableau 07 : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001; W-Erdman *et al.*, 2007).

Classe des flavonoïdes	Squelette carboné	Structure	Les Radicaux			Exemple
			R3'	R4'	R5'	
Flavones	C ₆ -C ₃ -C ₆		H	OH	H	Apigénine
			OH	OH	H	Lutéoline
			OH	OHC ₃	H	Diosmétine
Flavonols	C ₆ -C ₃ -C ₆		H	OH	H	Kaempférol
			OH	OH	H	Quercétine
			OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols	C ₆ -C ₃ -C ₆		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones	C ₆ -C ₃ -C ₆		H	OH	H	Naringénine
			OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines	C ₆ -C ₃ -C ₆		H	OH	H	Pelargonidine
			OH	OH	H	Cyanidine
			OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones	C ₆ -C ₃ -C ₆		R5	R7	R4'	
			OH	OH	OH	Genisteine
			H	O-Glu	OH	Daidezine

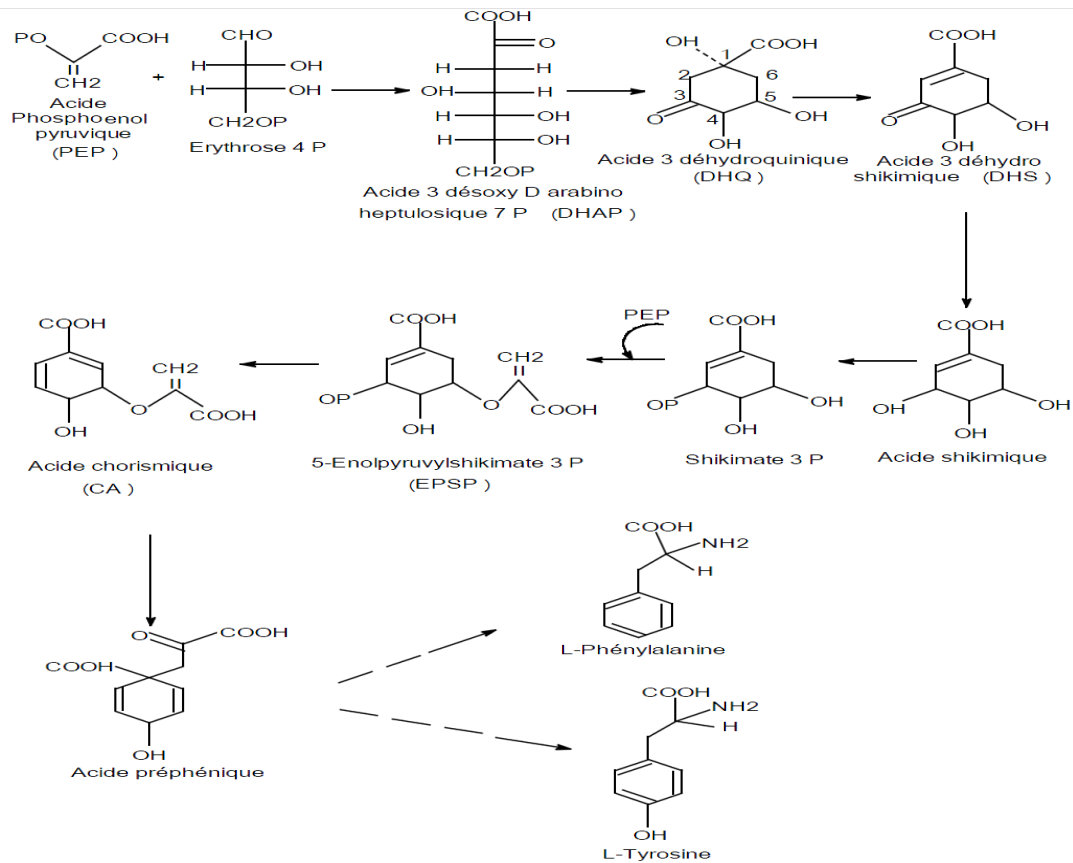
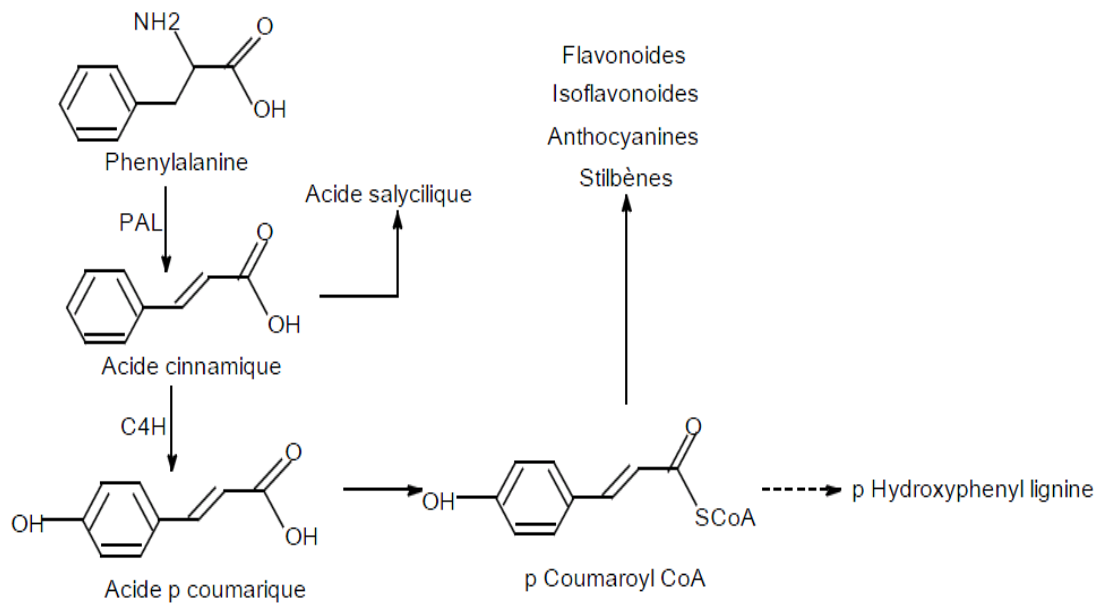


Figure 07 : La voie de Shikimate (Floss, 1997)

II.2. La voie de phényl-propanoïde

Cette séquence biosynthétique permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques (acide coumarique, caféique, férulique et sinapique) qui se présentent généralement sans forme d'esters ou glucosides (Ribereau-Gayon, 1968).



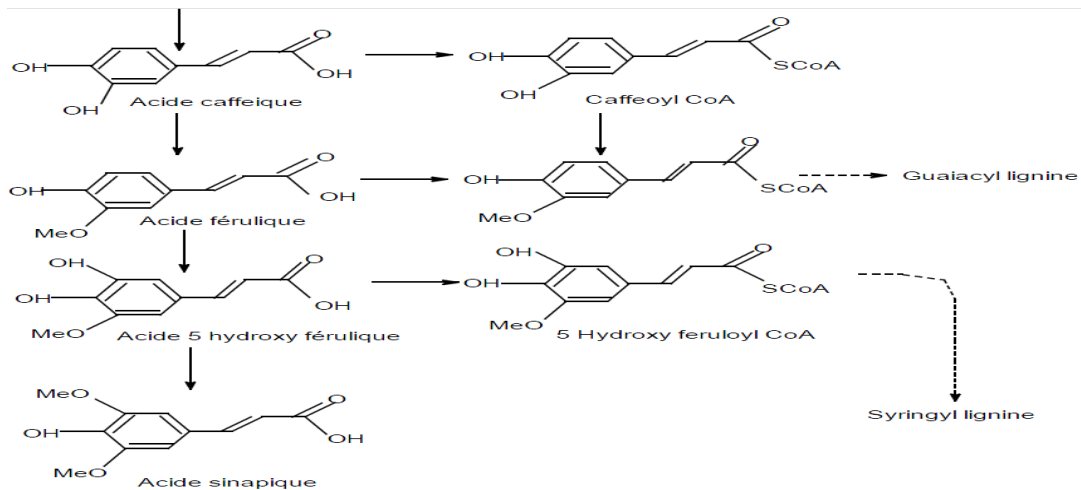


Figure 08. La voie de phényl-propanoïde (Hoffmann *et al*, 2004).

II.3 La voie d'acide acétique

Cette voie donne naissance aux flavonoïdes dont le squelette de base a une double origine : trois molécules d'acétyl COA (cycle A) et une molécule de p-coumaryl COA (cycle B et l'hétérocycle C). La condensation de ces unités donne naissance aux flavonoïdes et particulièrement aux pigments anthocyanes et flavonols ou encore certains monomères de types flavanols dont la polymérisation conduit aux tanins condensés.

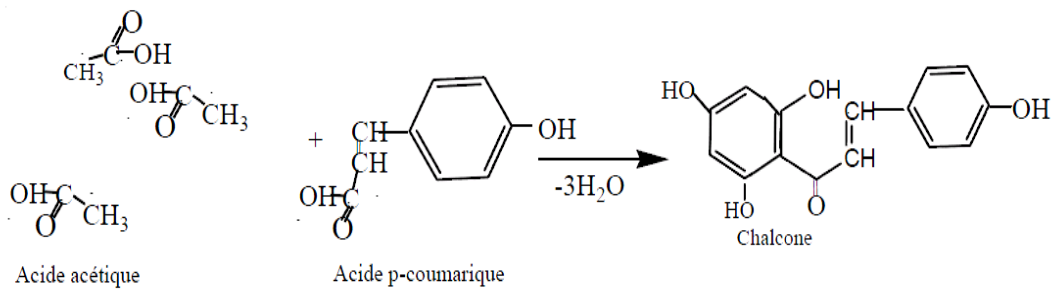
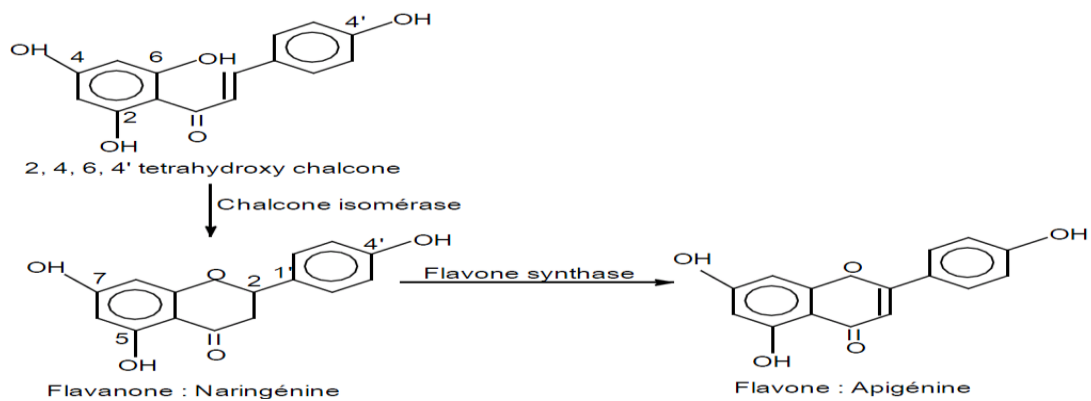


Figure 09. La voie de l'acide acétique (Ribereau-Gayon, 1968).



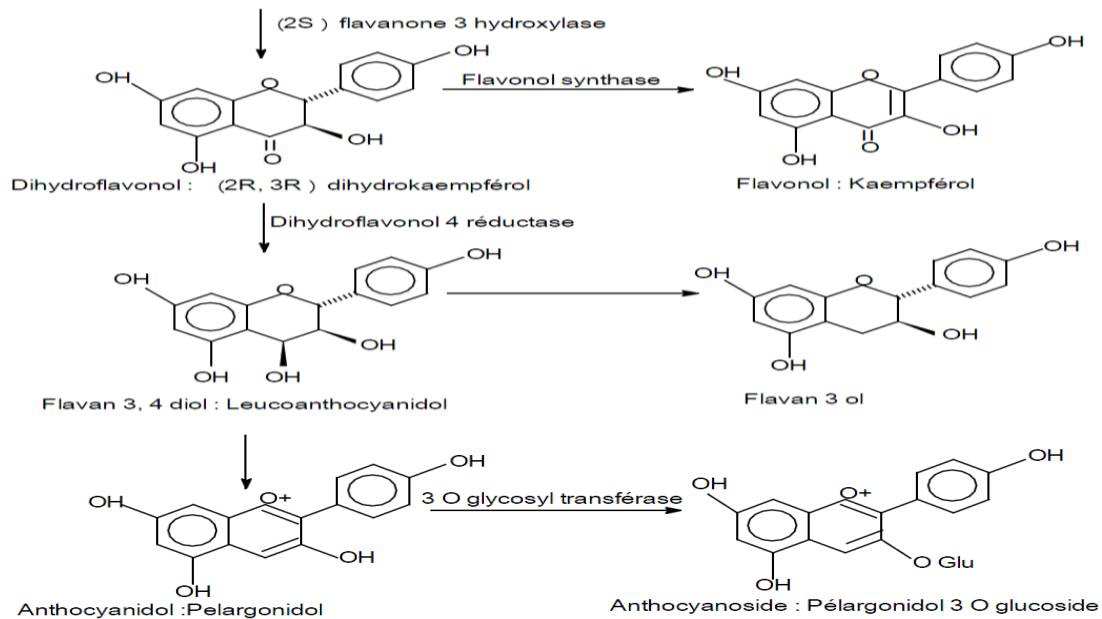


Figure 10 : La voie de biosynthèse des flavonoïdes (Winkel–Shirley, 2001 ; Subsamanian *et al.*, 2007).

III. Les composés phénoliques de l'olivier

III.1 Les feuilles de l'olivier

Les analyses montrent que l'oleuropéine est le composé majoritaire. Elle atteint un pourcentage de 14,2% de la matière sèche (Bouaziz, 2003). Une hydrolyse acide de l'extrait des feuilles produit une concentration élevée en hydroxytyrosol (2,3g d'hydroxytyrosol/100g de feuilles fraîches) (Harzallah & Kiritsakis, 1999) et en verbascoside. Ces trois polyphénols sont considérés par certains auteurs comme des substances antibactériennes et antifongiques potentielles (Aziz *et al.*, 1998; Bisignano *et al.*, 1999; Sudjana *et al.*, 2009).

III.2. Les olives de table

L'analyse chromatographique des composés phénoliques contenus dans la pulpe et dans la saumure des olives révèle que dans la préparation des olives de table vertes, un seul composé phénolique est prépondérant, tant dans la pulpe des olives que dans la saumure, il s'agit de l'hydroxytyrosol.

Dans la préparation des olives de table noires, quatre composés phénoliques sont présents en quantité non négligeable. Il s'agit de l'hydroxytyrosol, l'acide dihydrocaféique, le tyrosol et l'acide phloretique, encore appelé acide dihydro-p-coumarique (Owen, 2003).

III.3. L'huile d'olive

Les composés phénoliques trouvés dans l'huile d'olive vierge sont : l'oléuropéin (un hétérosidique ester d'acide élenoléique avec 3,4 dihydroxyphenethylalcohol (hydroxytyrosol)), le dimethyloléuropéin (acide dérivé de l'oléuropéin), le ligstroside (un hétérosidique ester d'acide élenoléique avec 4 hydroxyphenethylalcohol (tyrosol)) et l'acide caféique (**Guedon, 1992; Binchi Bianchi & Pozzi, 1994**).

III.4. Les grignons

Le grignon d'olive renferme divers composés phénoliques : des poly phénols solubles dans les solvants utilisés (méthanol-eau et acétone-eau), des poly phénols attachés aux parois cellulaires, des flavonoïdes et des tanins (**Servili et al., 1999; Romani et al., 1999; Cardoso et al., 2005; Ranalli et al., 2006**).

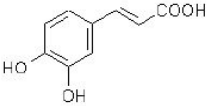
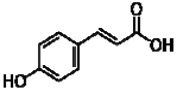
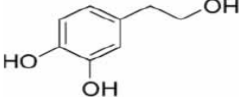
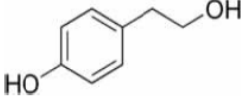
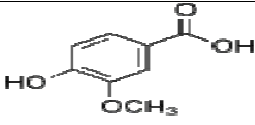
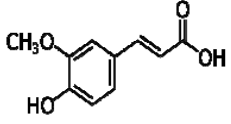
III.5. Les margines

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. La teneur en composés phénoliques dans les margines dépend du système d'extraction de l'huile d'olive et de la variété d'olive traitée. En général, elle varie entre 3 et 5 g/l et elle peut même dépasser les 9 g/l. Plus de 50 composés phénoliques et plusieurs alcools ont été identifiés. Ces derniers sont classés en monomères et en polymères phénoliques (**Ramos-Cormenzana, 1986; Annaki et al., 1999; Aissam et al., 2002; Casa et al., 2003; Fenice et al., 2003**).

Plusieurs monomères aromatiques ont été identifiés dans les margines par des techniques de chromatographie en phase liquide (HPLC) ou chromatographie en phase gazeuse (CPG). Ils sont représentés essentiellement par des acides et des alcools phénoliques.

Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement les anthocyanes (**Tanchev et al., 1980**), les tannins qui ont une structure plus complexe et leur concentration peut atteindre 12 g/l (**Balice et al. 1982**) et les lignines qui sont des hétéro-polymères formés par la polymérisation oxydative de trois types de monomères dérivés de l'alcool hydrox cinnamique (**Hamdi, 1991**).

Tableau 08 : Structure et teneur des monomères phénoliques rencontrés dans les margines (Lakhtar, 2009).

Composés phénoliques	Structure	Teneurs (unité)
Acide caféique (mM.l ⁻¹)		0,32 - 1,36
Acide <i>p</i> -coumarique (mM.l ⁻¹)		0,19 - 0,57
Hydroxytyrosol (mg.l ⁻¹)		37,9 - 143,34
Tyrosol (mg.l ⁻¹)		8,51 - 9,43
Acide vanillique (mg.l ⁻¹)		20
Acide ferrulique (mg.l ⁻¹)		95

IV. Les propriétés biologiques des composés phénoliques

L'huile d'olive est très riche en antioxydants, comme les polyphénols, et en particulier, l'hydroxytyrosol et le tyrosol. Ils permettent de prévenir et de traiter les maladies cardiovasculaires, les cancers, le diabète, les maladies neurodégénératives, l'inflammation et le vieillissement. Ils sont antimicrobiens 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 & Ghanam, 2012).

Chapitre III :
Les bactéries à
Gram positif



I. Généralités

Les bactéries sont des organismes unicellulaires relativement simples, de petite taille (0.5 à 1 µm de large, 1 à 3µm de long) que l'on distingue au microscope optique à fort grossissement. Elles ne possèdent pas de noyau différencié, ce qui les classe parmi les procaryotes, mais un chromosome circulaire dépourvu d'une membrane nucléaire (Blancard *et al.*, 2003).

Une cellule bactérienne est composée d'éléments constants, présents chez quasiment toutes les bactéries et d'éléments facultatifs, observés ou non en fonction des espèces Figure 11.

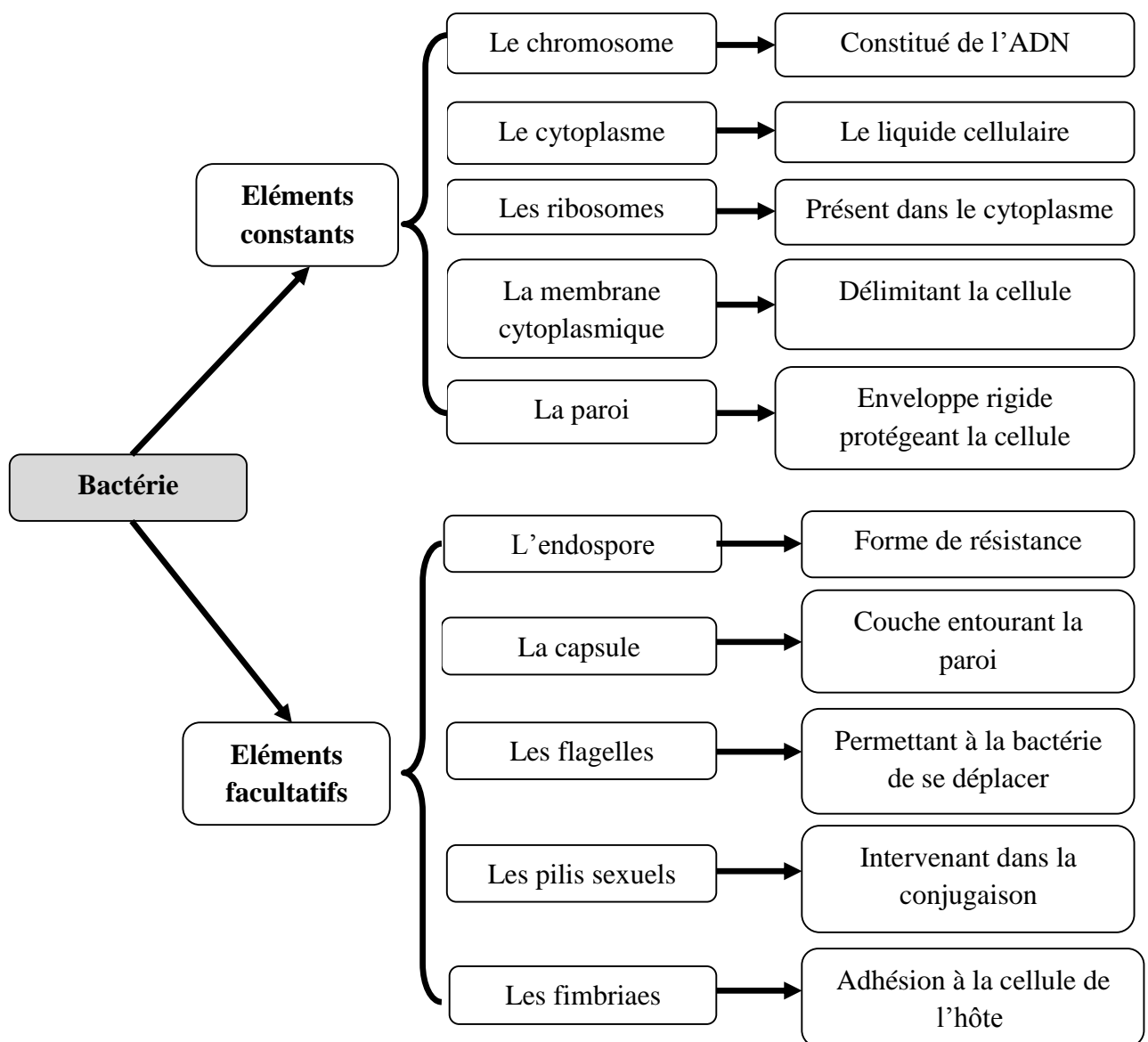


Figure 11 : Les éléments composants la cellule bactérienne.

II. La coloration de Gram

En 1884, un médecin danois mit au point la méthode de coloration qui porte son nom. Cette dernière permet de classer les bactéries en deux grandes catégories, les Gram positif et les Gram négatif.

La coloration de Gram consiste à traiter un frottis ou un étalement bactérien séché et fixé à la chaleur, par une solution de violet de cristal puis par une solution iodo-iodurée (lugol). En soumettant la préparation à l'action de l'éthanol, les cellules bactériennes réagissent de deux façons et forment deux groupes : les unes, dites à Gram négatif se décolorent rapidement sous l'action du solvant ; les autres, au contraire conservent leur coloration violette et sont dites à Gram positif. Pour accentuer le contraste, la préparation est finalement traitée par la fushine : les bactéries à Gram négatif se colorent en rose tandis que celles à Gram positif restent colorées en violet (Meyer *et al.*, 2004).

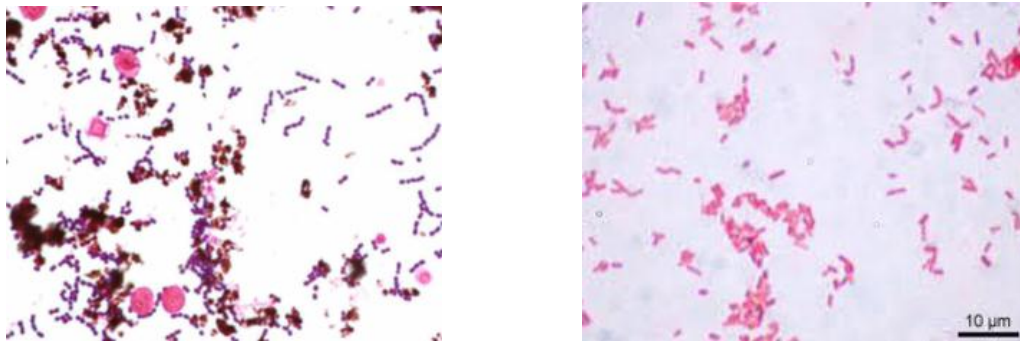


Figure 12 : L'aspect des cocci à Gram positif (à gauche) et des bacilles à Gram négatif (à droite) à la coloration de Gram (Colton & Russell, 2003).

La classification en bactérie à Gram positif et à Gram négatif reflète des différences fondamentales basées sur leurs propriétés de perméabilité aux colorants, liés à la nature de leurs composants de surface. Les différences les plus importantes sont la présence d'une membrane externe chez les Gram négatif et une couche épaisse du muréine chez les Gram positif (Assous *et al.*, 1999).

III. La structure des Gram positif

III.1. La membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique est constituée d'une bicouche phospholipidique, dont la perméabilité, très limitée pour les molécules polaires, est influencée par la longueur des chaînes et le degré de saturation des acides gras qui la composent.

Il existe des protéines appelées "perméases" qui sont insérées dans cette double couche hydrophobe et qui facilitent le passage à travers la membrane (**Bingen, 1986**).

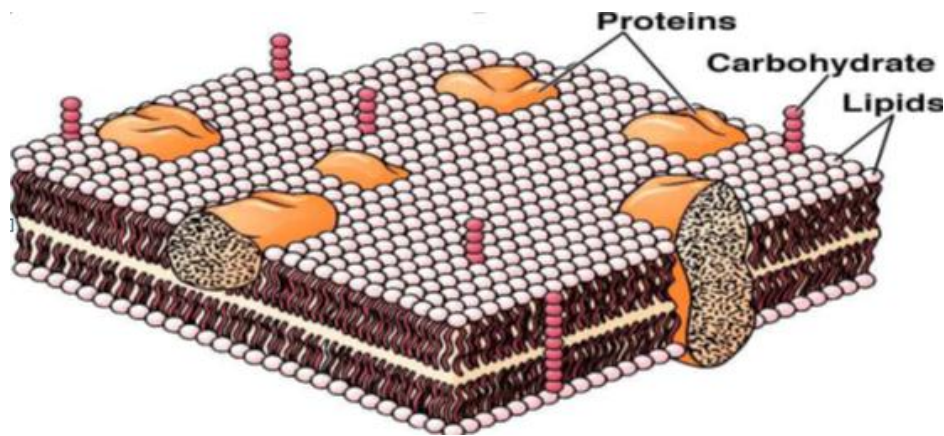


Figure 13 : La structure de la membrane cytoplasmique (**Colton & Russell, 2003**).

III.2. La paroi

Au-delà de la membrane cytoplasmique, les enveloppes bactériennes sont indispensables à la vie. Elles consistent en une paroi rigide nécessaire au maintien de l'importante pression osmotique intracellulaire générée par les fortes concentrations en ions, métabolites et autres macromolécules. Elle confère également la forme de la bactérie et assure la protection (physique, chimique et immunologique) de la cellule (**Nikaido & Vaara, 1985**).

III.2.1. Le peptidoglycane

Le composant majeur de la paroi des Gram positif est un polymère complexe de sucres et d'acides aminés, appelé muréine ou peptidoglycane. La muréine est un composant essentiel qui donne à la bactérie sa forme et sa rigidité. Elle est composée de chaînes de glycane (sucres) qui sont reliés les une aux autres par l'intermédiaire de peptides (**Assous, 1999**).

III.2.2. Les acides téchoïques et lipotéchoïques

Ce sont des polymères du ribitol-phosphate ou du glycérol-phosphate, reliés par des groupes phosphate. Les acides téchoïques sont fixées soit au peptidoglycane lui-même, soit aux lipides de la membrane cytoplasmique, on les s'appelle dans ce cas, des acides lipotéchoïques (**Prescott *et al.*, 2010**).

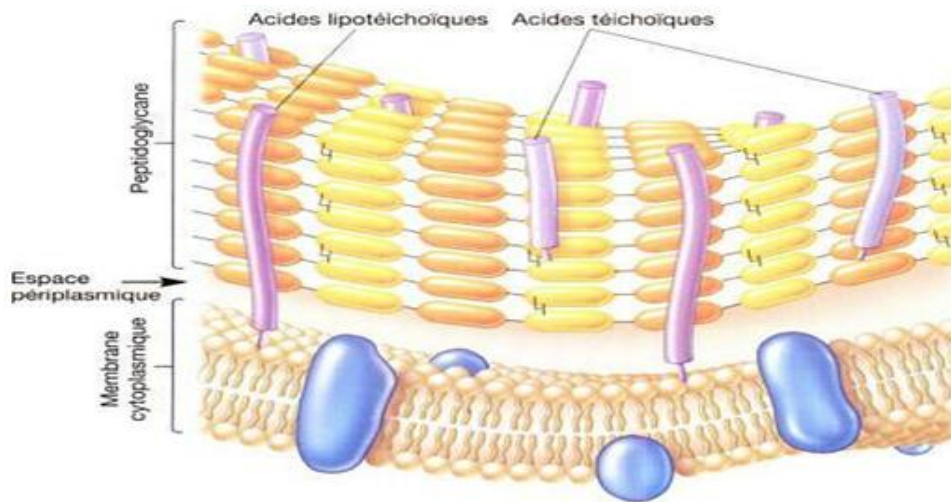


Figure 14 : Les composants de la paroi des Gram positif (Prescott *et al.*, 2010).

IV. Les cocci à Gram positif

Les cocci à Gram positif occupent en pathologie humaine une place importante par leur nombre et la gravité des infections qu'ils provoquent. Ce sont des espèces bactériennes constituées par des cellules de forme arrondie (cocci ou coques) immobiles, à Gram positif, aérobie anaérobie facultative, dont l'importance médicale est très grande (Drugeon & Courtieu, 1987 ; Sirot, 1990; Bannerman *et al.*, 1993; Koseki & Yamamoto, 2007).

IV.1. Les staphylocoques

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, immobiles, a sporulés et habituellement non capsulés. La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives, à catalase positive. Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Micrococcaceae* qui comprend quatre genres : *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* et *Planococcus* (Avril & Monteil, 2000).

Il s'agit de germes très répandus dans la nature (air, eau, sol). Les staphylocoques en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis*, font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des porteurs asymptomatiques (Ferron, 1984; Avril & Monteil, 2000).

S. aureus est l'espèce majeure, d'origine humaine, animale (volaille, bovin, ovin, caprin...) *S. aureus* est une bactérie pathogène :

- Par virulence : elle fabrique des protéines de surface et des enzymes dont la coagulase libre et la thermonucléase recherchées en routine.

- Par toxinogénèse : elle produit diverses toxines, dont des entérotoxines de différents types antigéniques (A à F), provoquant une intoxication alimentaire ou une

toxi-infection alimentaire (Tia). Le type A est le plus souvent rencontré dans la toxi-infection alimentaire collective (Tiac) (Camille, 2007).

IV.2. Les streptocoques et les entérocoques

Ce sont des cocci à Gram positif ; les cellules peuvent être ovoïdes, sphériques ou rarement allongées en bâtonnets, et se divisent en un seul plan pour former des paires ou plus souvent des chaînettes. Ils sont dépourvus de cytochrome et de catalase. Le contenu en guanine et cytosine (G + C %) est compris entre 33 et 42 (Potel & Baron, 1990).

Les streptocoques appartenant à la famille des *Streptococcaceae*, sont retrouvés à l'état commensal sur la peau et les muqueuses. Ce sont des germes ubiquitaires. Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux, dans le milieu extérieur (plantes, sols, eaux...) (Vassaut et al., 1986; Bouvet, 1994).

Tableau 10 : les espèces de streptocoques et des entérocoques et leurs pouvoirs pathogènes (Baudry C & Buzellec H, 2006).

Groupe	Espèce	Pouvoir pathogène
A	<i>S. pyogenes</i>	Pathogène pour l'homme : Scarlatine, néphrite, angines, septicémie...etc.
B	<i>S. agalactiae</i>	Responsable de mammite chez les bovidés et responsable chez l'homme : des infections génito-urinaires, néonatales (méningite) et de septicémie.
C	<i>S. equi</i> <i>S. dysgalactae</i>	Responsable de la gourme du cheval et de suppurations diverses chez les autres espèces animales. Commensal de rhino-pharynx chez l'homme occasionnellement pathogène.
D	<i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. faecium</i>	Commensaux de l'intestin de l'homme et des animaux. Responsable d'infections urinaires, des suppurations, endocardites et de septicémie.

V. Les bacilles à Gram positif

V.1. Listeria

Listeria se présente sous la forme de petit bacille droit, de 0,4 à 0,5 µm de diamètre sur 0,5 à 2,5 µm de longueur, aux extrémités arrondies, se présentant de manière isolée ou groupés en V ou en L ou en palissades ou, parfois, en courtes chaînes ou petits amas. Ce sont des bactéries à Gram positif, non acido-résistantes, non capsulées, non sporulées, aéro-anaérobies facultatives mais cultivant mieux en aérobiose et mobiles lorsqu'elles sont cultivées à 20 °C (ciliature périt riche), immobile

37° C, non capsulé, non sporulé. *Listeria* est une bactérie ubiquiste, tellurique, très répandue dans l'environnement, et qui possède de grandes capacités de résistance dans le milieu extérieur (**Kaismoune, 2009**).

Les infections à *L. monocytogenes* sont sérieuses mais heureusement « rares ». La bactérie pouvant contaminer un certain nombre d'aliments, de nombreuses personnes ingèrent assez fréquemment de petites quantités de *L. monocytogenes* sans qu'aucun symptôme n'apparaisse (**Ryser et al., 1999**).

V.2. *Clostridium*

Toutes les bactéries du genre *Clostridium* sont des anaérobies stricts. Elles peuvent se développer dans une grande gamme de température. La plupart des espèces sont mobiles et possèdent des flagelles péritriches. Elles sporulent quand les conditions sont défavorables. Ainsi, leur endospore leur permet de se maintenir en milieu sec, chaud et aérobie (**Brelivet et al., 2005**).

Les espèces de *Clostridium* associées aux infections humaines ont été isolées dans un large spectre environnemental : sols, déchets, eaux usées, rivières, lacs, lait, légumes, viande fraîche, insectes, appareil intestinal humain et de nombreux animaux (**Starr et al., 1981**).

V.3. *Corynaebacterium*

Corynaebacterium est un bacille non ramifié, non capsulé, non sporulé et immobile. Les bactéries se présentent souvent en forme de massue et groupé en amas donnant des images en palissade, en paquet d'épingles ou en lettres d'alphabets. Il est rencontré uniquement chez l'homme dans le rhino-pharynx et sur la peau. *C. diphtheriae* l'agent causale de la diphtérie, une toxi-infection se traduisant par une angine pseudomembraneuse et/ou une laryngite asphyxiante (croup). Elle peut se compliquer d'une myocardite et de paralysie des nerfs crâniens et périphériques (**Danielle, 2008**).

Chapitre IV:
Les techniques
d'étude de l'activité
antibactérienne



Dès la naissance, l'Homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. Tels que les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise. Cependant, si on traite les microorganismes toujours avec la même méthode et le même produit, ces derniers vont s'adapter et y deviennent insensibles. C'est pour cela qu'il est recommandé d'alterner plusieurs produits antimicrobiens (**Kaufmann, 1997**).

I. Les agents antimicrobiens

Un agent antimicrobien est un facteur physique ou chimique qui contrôle le développement d'une population microbienne. Il est dit bactériostatique lorsqu'il crée un état d'inhibition momentanée de la multiplication bactérienne, ou dit bactéricide lorsqu'il détruit totalement les bactéries (**Hardy, 2003**).

I.1. Les agents physiques

La chaleur humide tue facilement différents types de micro-organismes (virus, bactéries, champignons), en dégradant les acides nucléiques, dénaturant les protéines, et brisant les membranes. Par contre la chaleur sèche, moins efficace, nécessite des températures plus élevées et des temps d'exposition plus longs. Elle engendre l'oxydation des constituants cellulaires et la dénaturation des protéines (**Assous et al., 1999**).

La réfrigération consiste à baisser la température à des valeurs légèrement supérieures au point de congélation. Elle inhibe le développement des germes mésophiles, dont la plupart des microorganismes pathogènes. Par contre, on parle de la congélation lorsque la température de fusion de glace est de 0°C. Elle tue les germes par la rupture de leurs membranes (**Guy & Vierling, 2007**).

Les radiations ionisantes (rayons X ou Gamma) ont pour cible l'ADN cellulaire. De ce fait, la synthèse des protéines et des enzymes est impossible, donc le microorganisme et la spore meurent.

Les radiations non ionisantes ou ultraviolettes (UV) détruisent la plupart des microorganismes, sauf les spores, en altérant leurs structures chimiques. La reproduction est donc possible à partir des spores restant (**Baudry & Brezellec, 2006**).

I.2. Les agents chimiques

Les désinfectants sont des substances chimiques qui tuent les microorganismes en bloquant leurs multiplications. Les antiseptiques sont des substances semblables aux désinfectants mais ils peuvent être utilisés directement sur la peau (**Hunter *et al.*, 2006**).

Tableau 10 : Les principaux agents antiseptiques et désinfectants (**Bousseboua, 2002**).

Antiseptiques	
Agent	Domaine d'utilisation
Composés mercuriels	Peau
Nitrate d'argent	Yeux de nouveau-nés
Solutions iodées	Peau
Alcool (70%)	Peau
Biphényles	Savon, lotions
Détergents cationiques	Savon, lotion
Peroxyde d'hydrogène	Peau
Désinfectants	
Agent	Domaine d'utilisation
Composés mercuriels	Surfaces diverses
Sulfate de cuivre	Algicide (piscines)
Solution iodée	Instruments médicaux
Formaldéhyde	Matériel hospitalier
Composés chlorés	Eau potable, industrie
Composés phénoliques	Surfaces diverses
Détergents cationiques	Instruments médicaux
Oxyde d'éthylène	Matériaux plastiques
Ozone	Eau potable

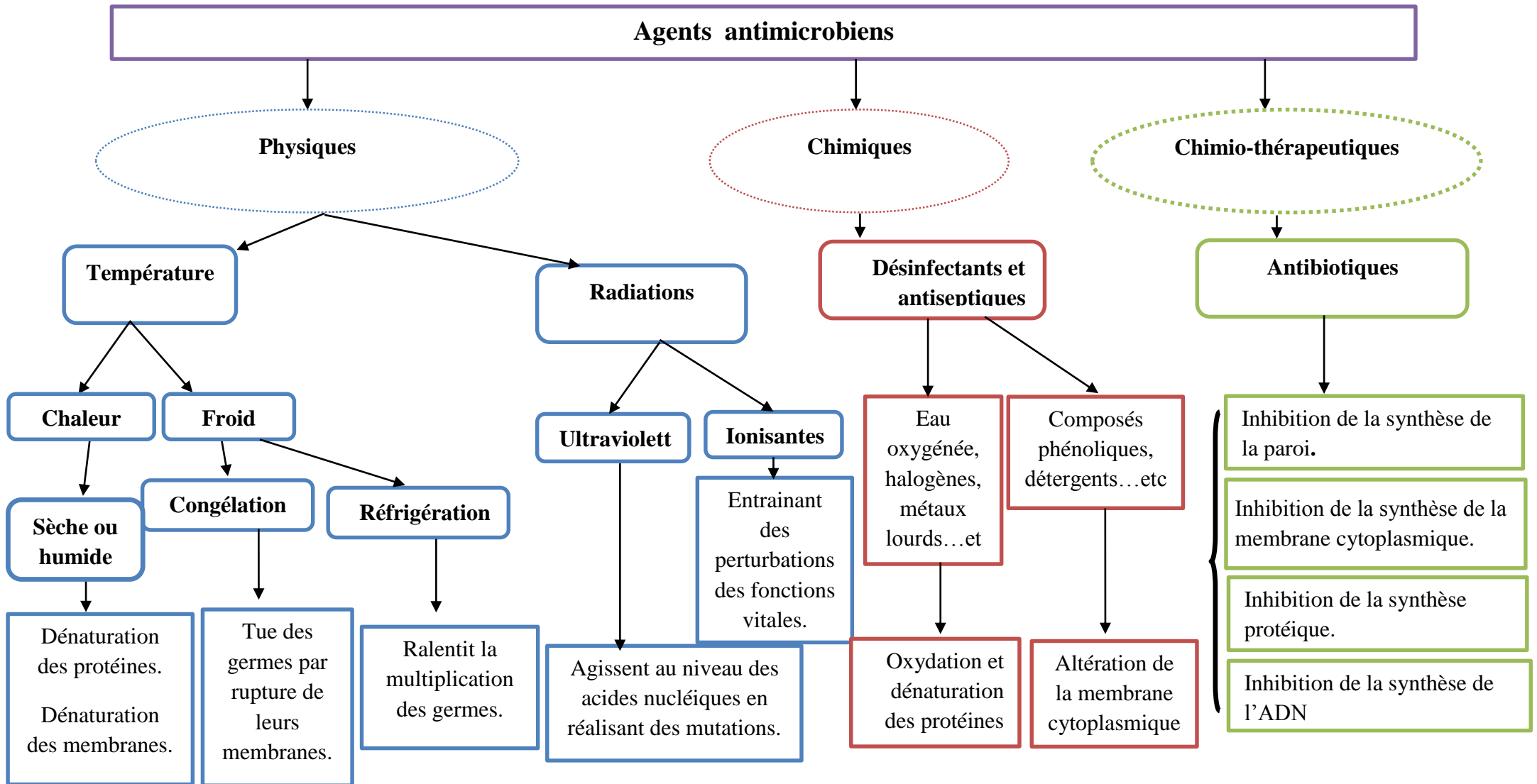


Figure 15 : les principaux agents antimicrobiens et leurs mode d'action (Prescott *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2004).

I.3. Les agents chimio-thérapeutiques

Après la notion de « antibiose », exprimée par Pasteur en 1877, l'antibiotique peut se définir comme toute substance élaborée par des microorganismes, ou pouvant être reproduite par synthèse chimique, qui possède la propriété de détruire les bactéries ou d'inhiber leur croissance (**Baudry & Brezellec, 2006**).

L'action d'un antibiotique est le résultat des interactions organisme-antibiotique d'une part et antibiotique-bactéries d'autre part. Pour résumer ces dernières, on peut dire que pour être actif, un antibiotique doit : pénétrer jusqu'à sa cible bactérienne, ne pas être inactivé et enfin, être capable de se lier à sa cible (**Gaudy & Buxeraud, 2005**).

II. La mesure de l'activité antibactérienne

II.1. Le coefficient phénol

La méthode de coefficient phénol est le test le plus commun pour l'évaluation des désinfectants. Elle permet de comparer, dans un intervalle de temps de contact de 10 min, l'efficacité d'un désinfectant donné, par rapport au phénol pris comme référence. Sur le plan pratique, des gammes de dilutions de concentrations connues du désinfectant testé et du phénol sont additionnées d'un inoculum défini d'une culture bactérienne de référence. Après un temps d'action de dix minutes, des échantillons de ces suspensions sont repiqués sur un milieu de culture convenable et incubés pour 48 heures, afin d'évaluer l'activité inhibitrice du désinfectant testé. Cette dernière s'exprime par l'absence de toute croissance dans les tubes repiqués (**Bousseboua, 2002**).

II.2. La concentration minimale inhibitrice

Des dilutions sériées d'une solution mère d'antibiotique sont préparées suivant une progression géométrique de raison de 1/2. Par la suite, une addition, pour chaque dilution, d'une même quantité d'inoculum du germe à étudier permet de déterminer. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, la plus faible concentration de l'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible représente la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Archambaud, 2009**).

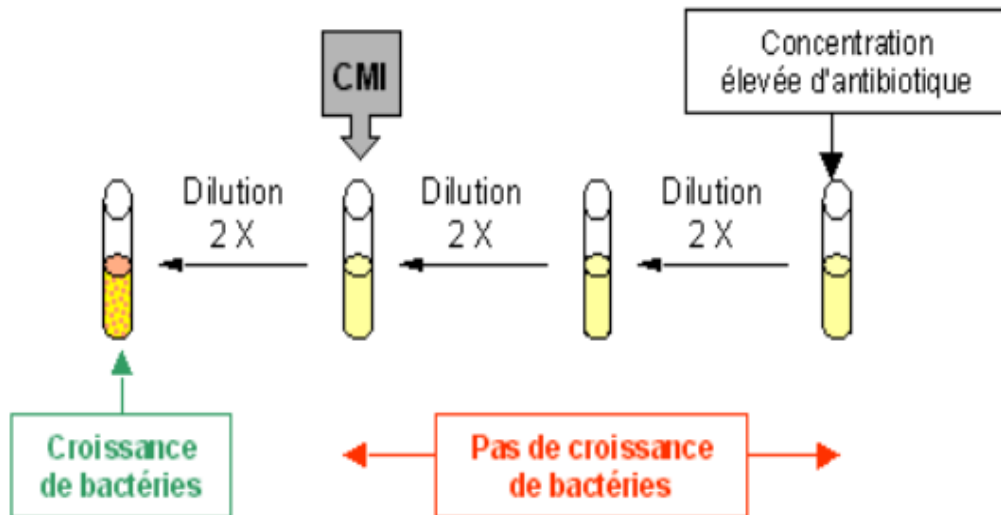


Figure 16 : Technique de la concentration minimale inhibitrice (Vincent *et al.*, 1992).

II.3. La diffusion sur gélose

La diffusion en disque se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques, tablettes ou bandes, dans le milieu de culture solide, qui a été ensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure. La diffusion en disque est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque (Threlfall *et al.*, 1999; Walker, 2000).

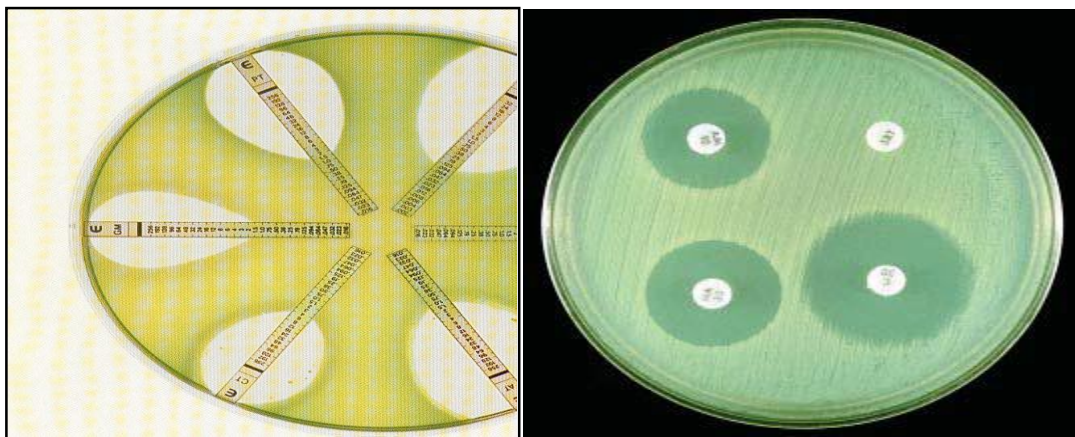


Figure 17 La détermination de l'activité antibactérienne sur gélose (Archambaud, 2009)

Matériel
et
Méthodes



I. Echantillonnage

Les margines de l'olivier ayant fait l'objet de notre étude ont été collectées en période de trituration des olives à partir d'une région de Guelma Tableau 11.

Les échantillons de margines ont été placés dans des récipients hermétiques à l'air et à la lumière et conservés à 4°C jusqu'à l'analyse.

Tableau 11 : Caractéristiques des échantillons étudiés.

	Echantillon 1	Echantillon 2
Période	Novembre 2014	Décembre 2014
Commune	Roknia	Ain Hessainia
Variété	<i>Rougette</i>	<i>Rougette</i>
Procédé de trituration	Discontinu (presse)	Continu (deux phases)

II. Caractérisation des margines

II.1. Mesure du pH

Après l'étalonnage du pH-mètre (Hanna), l'électrode est plongé dans un bécher contenant un volume de 100 ml de la marge et on note la valeur du pH.

II.2. Conductivité électrique et Salinité

La conductivité électrique (CE) et la salinité (S) sont mesurées par un multi-paramètre de terrain (Consort C931 version 2.4). Après rinçage de la sonde, on la plonge dans un bécher contenant un volume de marge à analyser, en prenant soin à ce que les électrodes soient complètement immergées (photographie 01) (**Rodier et al., 2009**).

II.3. Humidité et matière sèche

La matière sèche (MS) est constituée de l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans le substrat. La détermination de la MS consiste à évaporer un échantillon de 10 ml dans un creuset en porcelaine à 105°C jusqu'à poids constant (**Hamdi, 1991 ; Aissam, 2003**).

La teneur en matière sèche, exprimée en g.l^{-1} est donnée par la formule suivante :

$$\text{MS} = \frac{(M - M_0)}{V} \times 1000(\text{g.l}^{-1})$$

Pour l'humidité (H) elle est déterminée comme suit :

$$\text{TE} = \frac{(M_1 - M)}{(M_1 - M_0)} \times 100(\%)$$

M_0 : masse du creuset vide en g.

M_1 : masse du creuset et de margines avant séchage en g.

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

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

II.4. Demande biologique en oxygène

La DBO_5 est la quantité d'oxygène consommée par les microorganismes à 20°C , dans l'obscurité et pendant cinq jours d'incubation, temps qui assure l'oxydation par voie biochimique d'une fraction de matière organique carbonée contenue dans l'échantillon. La consommation d'oxygène est proportionnelle à la quantité de matière organique biologiquement oxydable contenue dans l'échantillon, et donc à son niveau de pollution (**Rodier et al., 2009; Metahri, 2012**).

La mesure de la DBO_5 de nos échantillons a été faite par une méthode respirométrique (**Rodier et al., 2009**) à l'aide d'un DBO-mètre (DBO Sensor 6, VELP Scientifica). Les résultats sont exprimés en $\text{mg d'O}_2/\text{l}$.

II.5. Demande chimique en oxygène

La DCO est la mesure de la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation chimique de toute la matière organique biodégradable ou non, contenue dans une eau à l'aide de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) à 150°C . Elle est exprimée en $\text{mg d'O}_2/\text{l}$ (**Rodier et al., 2009; Metahri, 2012**).

La détermination de la DCO a été effectuée par la méthode à petite échelle en tubes fermés (**Rodier et al., 2009**).

III. Extraction des composés phénoliques

III.1. Acidification

Avant de procéder à l'extraction des polyphénols à partir des échantillons de margines, il est nécessaire de précipiter leur fraction protéique en baissant leur pH jusqu'à 2, à l'aide d'une solution d'HCl (2M) (Deeb *et al.*, 2000).

III.2. Délipidation

Après l'acidification, 50 ml de margines sont centrifugées pendant 10 min à 3200 tour/min. Deux phases sont obtenues : une phase aqueuse et un culot précipité. 30 ml de la partie aqueuse sont ajoutées à 60 ml de n-hexane. L'extraction des lipides est effectuée dans une ampoule à décanter. L'opération est répétée deux fois afin d'extraire le maximum des lipides (Bouhadjra, 2011 ; Leulmi, 2011).

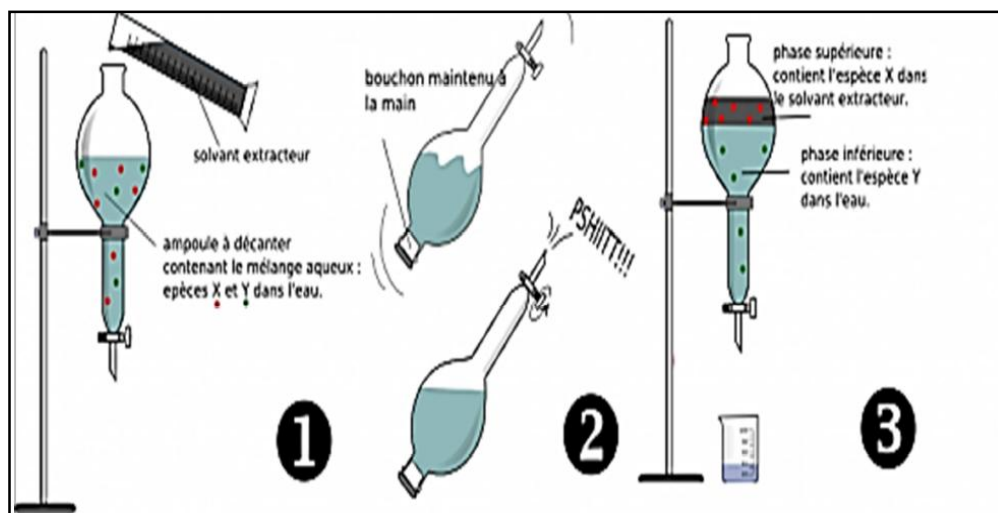
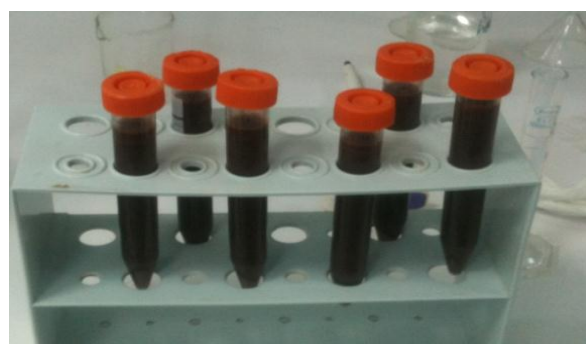
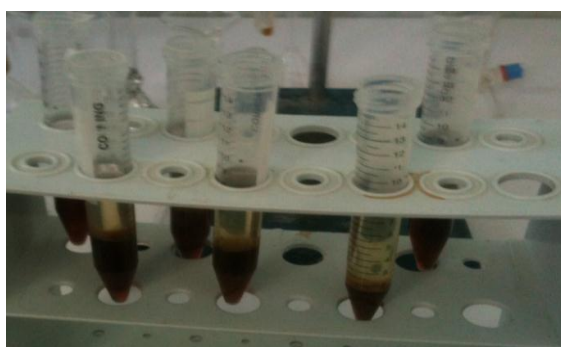


Figure 18 : Délipidation par ampoule à décanter (Bouhadjra, 2011).

III.3. Extraction liquide-liquide

L'acétate d'éthyle est confirmé être un solvant convenable pour la récupération des CP contenus dans les margines. L'extraction des CP est effectuée dans une autre ampoule à décanter de capacité 250ml. Une prise d'essai de 25 ml de margine délipidée est mélangée avec 25 ml de solvant. Le mélange subit ensuite une agitation puis une centrifugation pendant 10 min à 3200 tour/min. l'opération d'extraction est répétée quatre fois pour récupérer le maximum des CP. La phase organique riche en CP subit une évaporation rotatif à 40°C jusqu'à l'obtention d'un dépôt jaune foncé de

polyphénols. Ce dépôt est récupéré dans le méthanol pur (Visioli *et al.*, 1999; Bcherrawi, 2000; Ghattas, 2004; Bouhadjra, 2011).

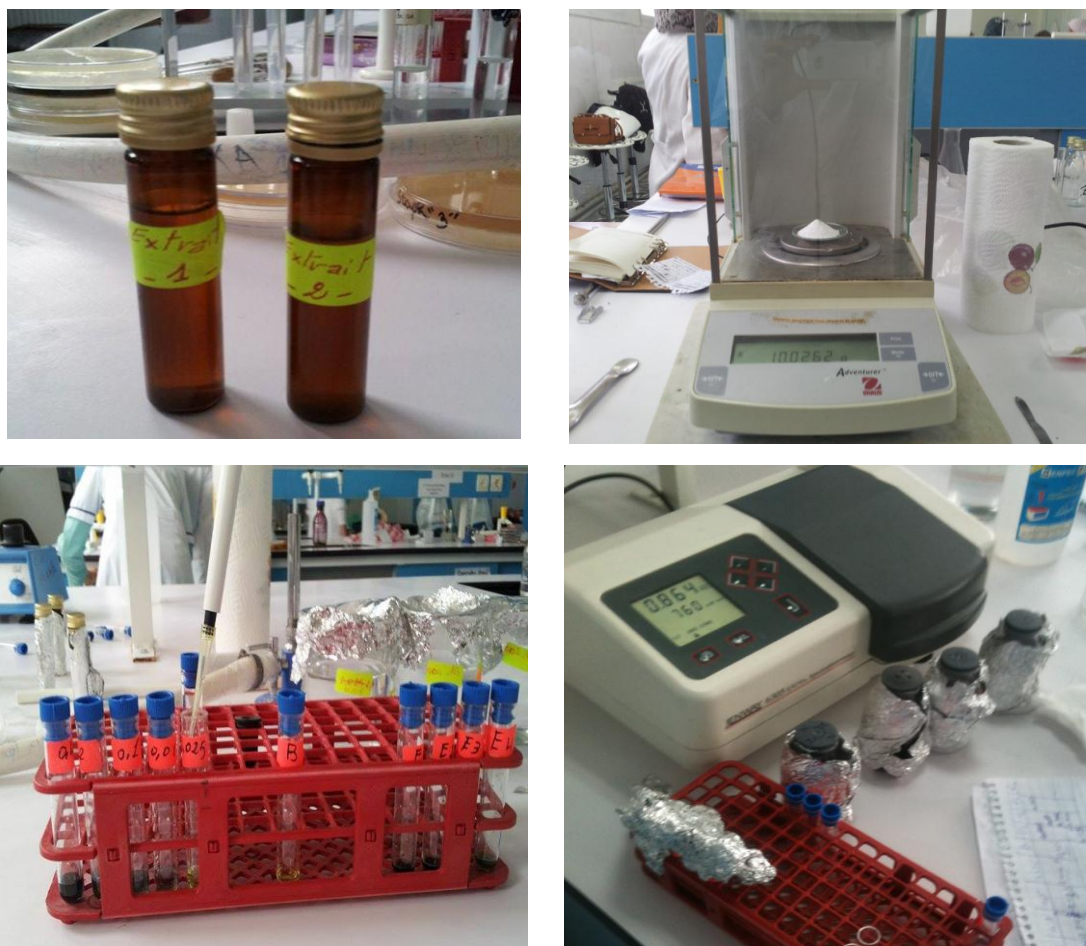


Photographie 1 : Caractérisation des margines et extraction des composés phénoliques.

IV. Dosage des polyphénols totaux des extraits

Suivant le protocole de Yaakoubi et ses collègues (2010), le dosage a été réalisé avec 50 µl d'extrait des polyphénols (convenablement dilué par 1,35 ml d'eau distillée) auquel sont rajoutés 200 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, 400 µl de Na₂CO₃ (20 %) ont été ajoutés, la couleur bleue commence à apparaître. Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 40 min et à température ambiante. Une partie de la solution est transférée dans une cuvette de quartz (volume de 4ml, distance optique 1cm). L'absorbance a été mesurée à 760 nm à l'aide un spectrophotomètre (JENWAY 6715 UV/Vis).

La teneur en phénols totaux a été déterminée par comparaison de la densité optique observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.



Photographie 2 : Dosage des composés phénoliques.

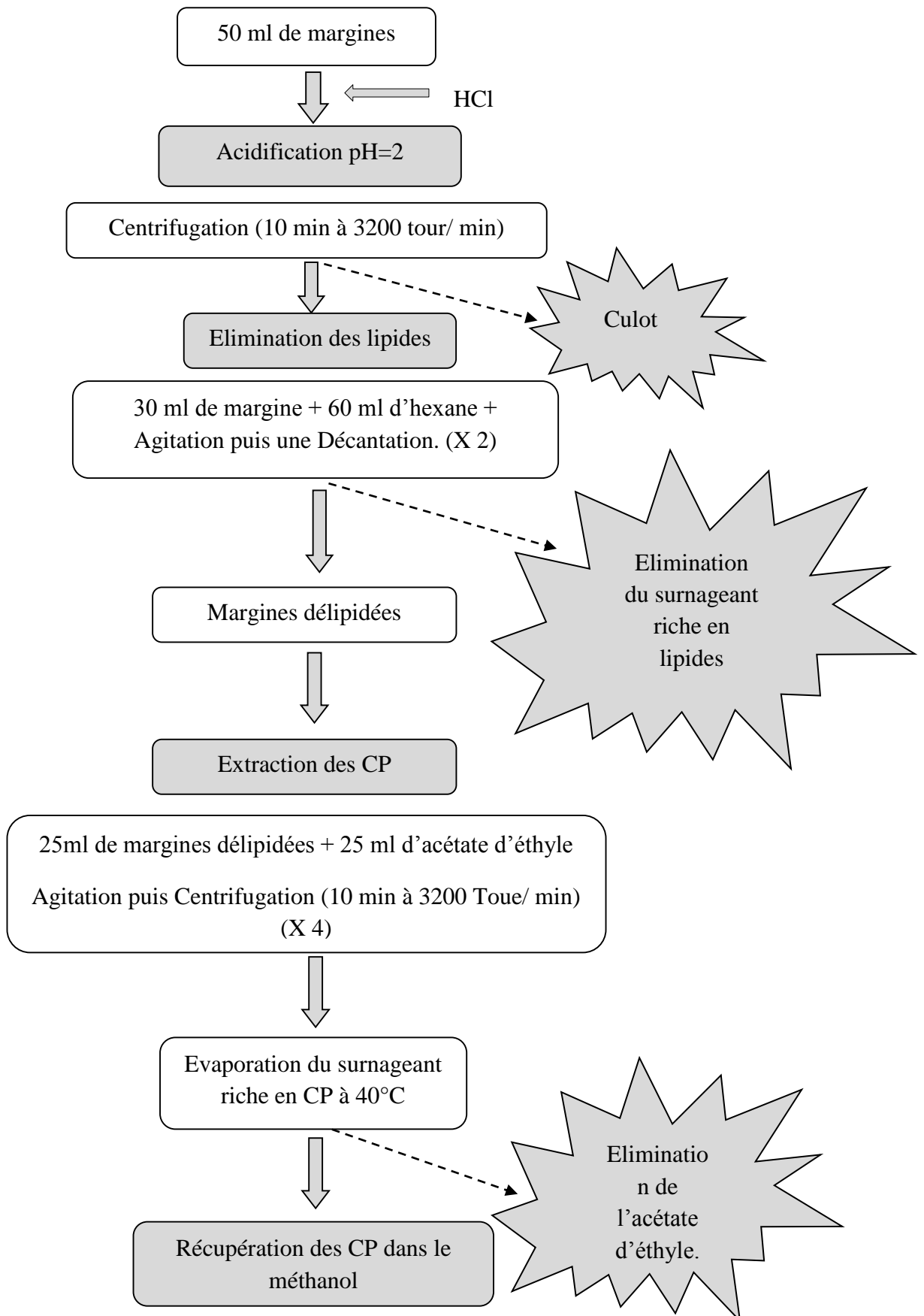


Figure 19: Protocole d'extraction des polyphénols des margines.

V. Evaluation de l'activité antibactérienne

V.1. Inoculât des bactéries tests

Sept souches cibles ont été utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne. Quatre souches proviennent de la collection *American type culture collection* (ATCC) fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), les restes sont des souches cliniques fournies par les services de bactériologie de l'établissement public hospitalier Ahmed Ben Balla de Khenchela (EPH Ahmed Ben Balla) et la clinique privée Mazdaouet de Khenchela (CPM).

Tableau 12 : Les souches bactériennes test utilisées

N°	Bactéries tests	Origine
1	<i>Staphylococcus aureus</i> 43300	ATCC
2	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	ATCC
3	<i>Listeria monocytogenes</i> 25922	ATCC
4	<i>Bacillus subtilis</i> 21332	ATCC
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	EPH
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	CPM
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	CPM

V.2. Préparation des suspensions et ensemencements

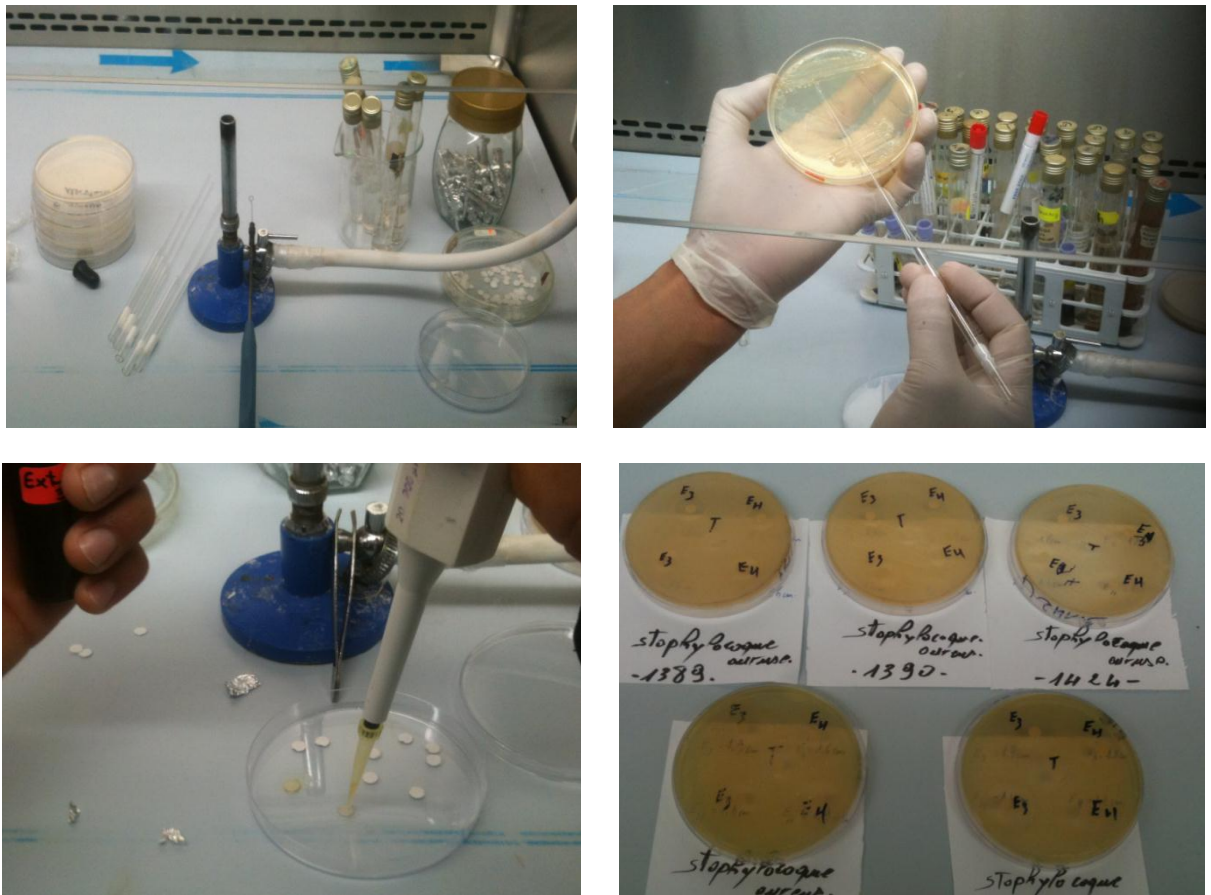
Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive. Après 18h d'incubation à 37°C, des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0.5 Mc Farland ont été préparées, pour chaque bactérie, dans d'eau physiologique stérile (Boudjouref, 2011).

V.3. Méthode de diffusion en milieux gélosé

Des disques de 6mm de diamètre sont découpés dans du papier Wathman n°3 puis autoclavés pendant 20 min à 121°C. Ces disques sont ensuite imbibés avec 30µl des extraits obtenus. Des disques imprégnés de méthanol sont utilisés comme témoin négatif (Bolouet, 2011).

Les disques préparés sont ensuite déposés délicatement à l'aide d'une pince stérile sur la surface des milieux Muller-Hinton préalablement ensemencés par les bactéries-tests. Les boîtes sont d'abord laissées à une température ambiante pendant une heure pour assurer une bonne diffusion, puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'activité antibactérienne est estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (Djenaneet *al.*, 2012).



Photographie 3 : Tests de l'activité antibactérienne.

Résultats
et
Discussion



1. Caractérisation des margines

Les différentes propriétés physico-chimiques (pH, CE, S, MS, H, DCO et DBO₅) des effluents étudiés sont présentées dans le tableau 13 :

Tableau 13 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de margines.

	Echantillon 01	Echantillon 02
pH	4.92	4.86
CE (mS/cm)	18.10	7.90
S	10.60	4.40
MS (g/l)	89	55
H (%)	91.08	94.67
DCO (g d'O₂/l)	314.40	313.20
DBO₅ (g d'O₂/l)	201.25	224.56

1.1. Le pH

D'après les résultats du tableau 13, les échantillons de margines ont montré une acidité légère avec des pH de 4.92 et de 4,86 respectivement. Ces valeurs se situent dans la limite inférieure de la fourchette citée dans la bibliographie [4.5 - 5.5] (**COI, 1990; Levi-Meminzi et al., 1992**).

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. La conductivité électrique et la salinité

Les margines provenant de l'huilerie de Roknia ont présenté une conductivité électrique relativement élevée (18,10 mS/cm). Des échantillons de margines provenant de la même huilerie ont donné une conductivité égale à 11,90 mS/cm durant la campagne oléicole 2012/2013 (**Ghedir et al., 2013**). Quant aux margines de Ain Hessainia, ils ont donné une conductivité plus au moins faible (7,9 mS/cm).

Ces variations de conductivité et de salinité (10,6 – 4,4) sont principalement dues au degré de maturation des olives ainsi qu'aux opérations de salage effectuées durant la trituration (**Benyahia & Zein, 2003; Hanafi et al., 2009**).

Le degré de minéralisation de ces effluents a orienté leur valorisation en fertilisant des terres agricoles (**Capasso et al., 2002**).

1.3. L'humidité et la matière sèche

Les résultats des taux d'humidité et de la MS obtenus sont présentés dans la figure 20.

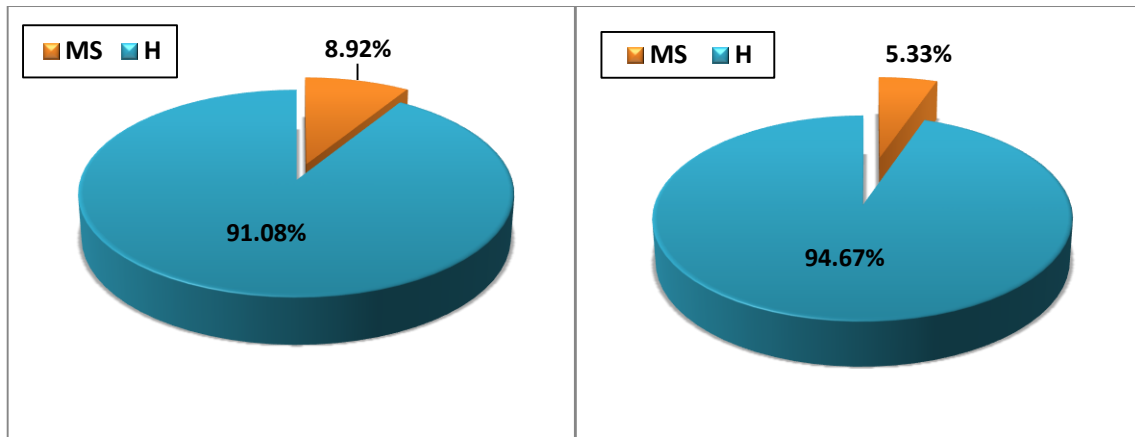


Figure 20 : Les teneurs en humidité et en matière sèche des deux échantillons des margines.

Les teneurs des margines en MS sont de 89 g/l pour le premier échantillon et 55 g/l pour le deuxième. Ces valeurs sont proches à celles obtenues par Ghedir et ses collègues (**2013**) et inférieures à celles notées dans les travaux de Aissam (**2003**) (98 g/l). Cette matière résulte principalement des différents débris solides de la trituration (grignons, membranes des pulpes d'olives, ...).

Il est à noter que le taux d'humidité des margines est fonction de la nature du processus d'extraction utilisé (**Chimi, 2006; Procida & Cecon, 2006**). En effet, les échantillons de margines provenant d'un système d'extraction continu qui nécessite la consommation d'importantes quantités d'eau (huilerie de Ain Hessainia) étaient plus humides (94,67%) que celles résultant d'un système d'extraction discontinu par presse (huilerie de Roknia) (91,08%).

1.4. Les demandes chimique et biologique en oxygène

Les résultats enregistrés révèlent une charge polluante très importante ($DCO = 314,4 - 313,2 \text{ g d'O}_2/l$) et une biodégradabilité très difficile ($DBO_5 = 201,25 - 224,56 \text{ g d'O}_2/l$) de nos margines. Nos valeurs sont beaucoup supérieures à celles obtenues par Yaakoubi (**2010**) portant sur des margines de la région de Meknès (Maroc) rejetées d'un système d'extraction continu à trois phases, où la DCO n'a pas dépassé $100 \text{ g d'O}_2/l$ et la DBO_5 n'a pas dépassé $50 \text{ g d'O}_2/l$.

2. L'extraction des composés phénoliques

Une extraction liquide-liquide a été effectuée afin de récupérer les composés phénoliques des deux échantillons de margines. Le protocole d'extraction suivi lors de notre étude est similaire à celui cité par De Marco (2007) et Obied et ses collègues (2005) pour l'extraction des CP des margines de l'Italie et de l'Australie, respectivement.

Après l'élimination des fractions protéique (acidification) et lipidique (délipidation), quatre extractions successives ont été réalisées afin de récupérer le maximum des CP contenus dans les margines (Allouche *et al.*, 2004). L'acétate d'éthyle (v:v) a été choisies comme solvant. Ce dernier est ensuite éliminé sous vide afin de transférer finalement dans le méthanol la fraction phénolique purifiée (Visioli *et al.*, 1999; Ghattas, 2004).

3. Dosage des polyphénols totaux

Avant de procéder aux dosages des CP, une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant l'acide gallique comme référence [0 - 0,4 g/l]. Les contenus phénoliques de nos extraits ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu (Yaakoubi *et al.*, 2010). Les résultats obtenus figure 21 ont révélé une grande richesse des effluents oléicoles en composés phénoliques, ce qui fait d'eux une excellente source naturelle de composés bioactifs.

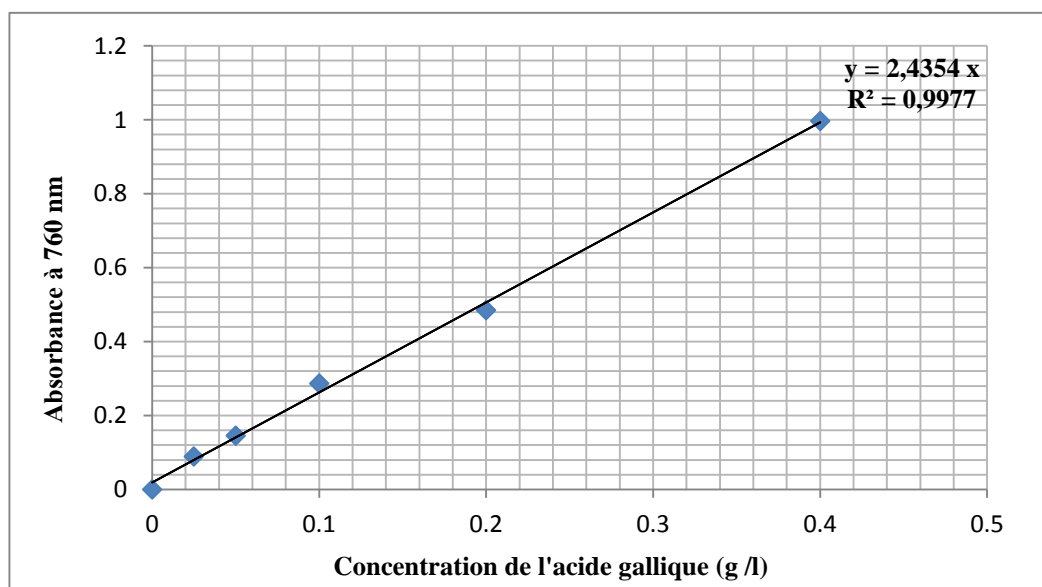


Figure 21 : Droite d'étalonnage des polyphénols totaux.

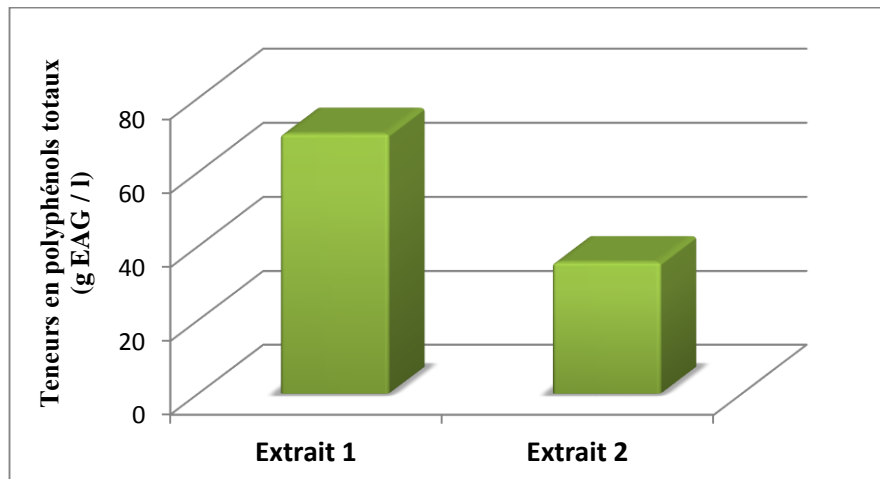


Figure 22 : Résultats des dosages des polyphénols totaux.

Les margines provenant d'une huilerie à système d'extraction traditionnel sont montrées très riches en CP, soit 70,33 g EAG/l par rapport aux margines résultantes d'un système d'extraction moderne à deux phases, dont la teneur en CP est de 35,66g EAG/l.

Ces résultats conviennent tout à fait à ce qui a été rapporté par Chimi (2006). D'autres parts, nos valeurs sont beaucoup supérieures à celles enregistrées par Larifi et ses collègues (2013) et Yaakoubi (2009). Ou les teneurs en CP sont comprises entre 6,30 et 11,70 g/L, pour des margines issus d'un processus continu à trois phases.

La variation des teneurs phénoliques des extraits dépend en premier temps des facteurs génotypiques (El-Waziry, 2007), géographiques (Ksouri *et al.*, 2008) et climatiques (Atmani *et al.*, 2009) de l'olivier. Mais aussi du système de trituration utilisé Bouknana *et al.*, 2014) et de la composition phénolique des extraits (Hayouni *et al.*, 2007).

4. L'évaluation de l'activité antibactérienne

Les extraits méthanoliques obtenus ont été testés sept souches bactériennes. Il s'agit de cinq cocci à Gram positif (*S. aureus*) et deux bacilles à Gram positif (*L. monocytogenes.* et *B. subtilis*).

Nous avons procédé à une étude comparative entre le pouvoir antibactérien de deux extraits phénoliques issus des margines de l'Est algérien. L'effet antibactérien des extraits a été testé *in-vitro* contre sept souches bactériennes. Il s'agit de cinq cocci à Gram positif (*S. aureus*) et deux bacilles à Gram positif (*Listeria sp.* et *B. subtilis*). En dépit de leur implication dans diverses pathologies humaines, ces germes sont connus comme responsables de l'altération de différents produits alimentaires.

L'activité antibactérienne des extraits a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion des disques en papier sur milieu gélosé (Muller-Hinton). Cette technique a été choisie en raison de sa simplicité et de sa facilité. L'apparition d'une zone d'inhibition au tour du disque après 24 h d'incubation à 37 °C est considérée comme un résultat positif. Des disques imbibés du méthanol sont utilisés comme témoin négatif.

D'après les résultats présentés dans la figure 23, on constate que nos extraits phénoliques ont donné un effet antibactérien appréciable et variable sur tous les Gram positif testés avec des zones d'inhibition qui comprises entre 4 et 22 mm pour les staphylocoques et entre 13 et 18 pour les bacilles. Cette variabilité dépend en premier temps de la nature de la souche-test et en deuxième temps de la composition chimique de l'extrait testée.

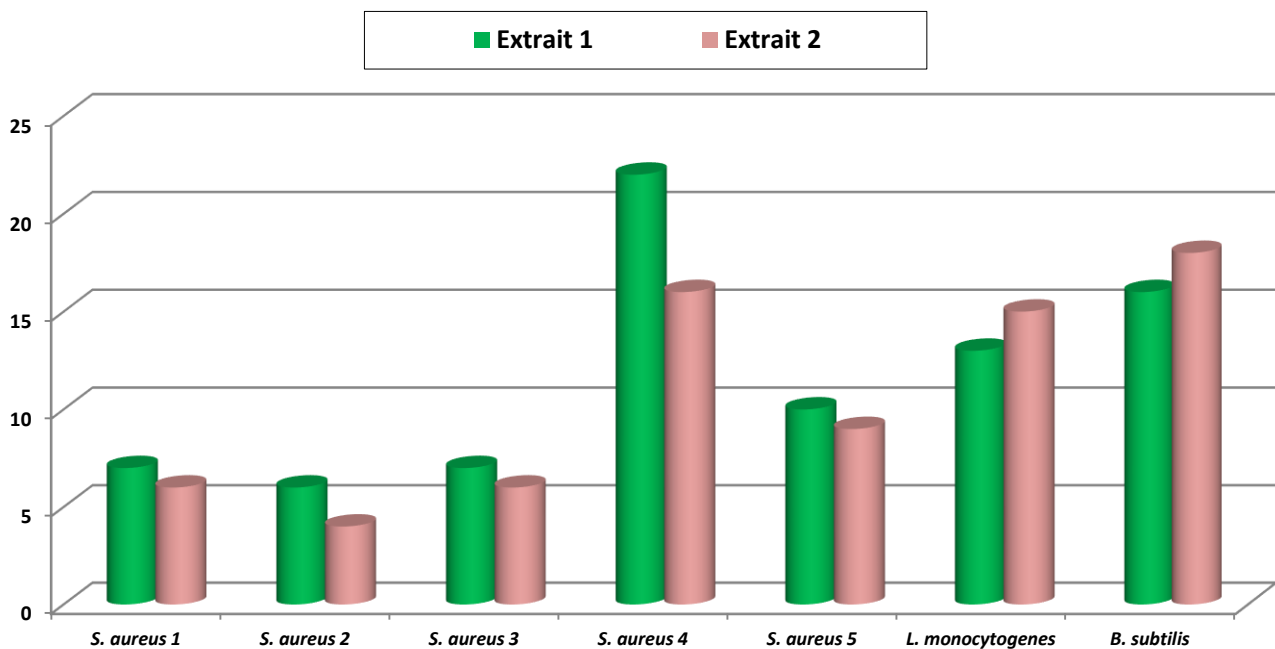


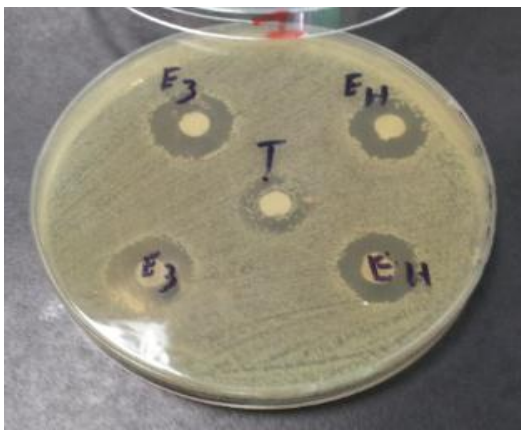
Figure 23 : Diamètres des zones d'inhibition des sept bactéries tests en millimètre.

Le premier extrait, issu des margines qui résultent d'une trituration discontinu à presse, a donné des zones d'inhibition plus importantes [6 - 22 mm] en comparaison avec le deuxième extrait [4 - 18 mm]. Cela confirme la notion de corrélation entre la teneur en CP d'une substance et son effet antimicrobien.

Parmi les principaux mécanismes d'action des composés phénoliques sur les microorganismes, on peut citer leur forte dénaturation des protéines, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Jungkind, 1995).

Il faut également signaler que le pH d'une substance peut affecter son activité antimicrobienne. A faible pH, les molécules peuvent se dissoudre plus facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne, ce qui justifie le grand pouvoir inhibiteur des acides phénoliques (Japón-Luján & Luque-Rodríguez, 2006). L'aspect lipophile des polyphénols (flavonoïdes et les quinones) leurs permet aussi d'interagir avec les lipides membranaires en neutralisent leur potentiel électrique (Firas, 2008).

Il en sort que nos extraits ont exercé une activité modérée sur les cocci, à l'exception du *S. aureus* 4 qui s'est montré le plus sensible. Cela est probablement expliqué par la grande faculté d'acquisition de nouveaux mécanismes de résistance chez les cocci à Gram positif (Quincampoix & Mainardi, 2001).



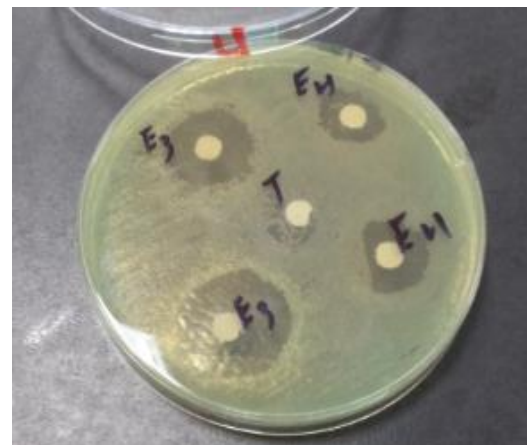
S. aureus 1



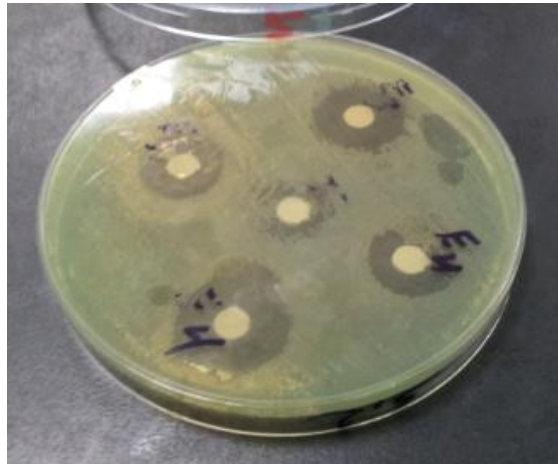
S. aureus 2



S. aureus 3



S. aureus 4



S. aureus 5

Photographie 04 : L'effet inhibiteur des extraits sur les souches de *Staphylococcus aureus*.

Larif et ses collègues (2013) et Ghedir et ses collègues (2013) ont enregistré des diamètres plus importants [12 à 20 mm] et [11 à 14 mm] en étudiant l'effet inhibiteur des extraits phénoliques, issus des margines de la variété marocaine *Picholine* et la variété algérienne *Chemlal* contre des souches de *Staphylococcus aureus* sauvages.

Cependant, les extraits phénoliques issus des olives du Nepal ont donné des zones d'inhibition moins importants [9 à 12 mm] sur *Bacillus subtilis* (Paudel *et al.*, 2011).

Medina et ses collègues (2006) ont montré une activité considérable des polyphénols de l'huile d'olive contre *Listeria monocytogenes*. Ces auteurs ont également indiqué que les extraits testés étaient plus actifs sur les Gram positifs par rapport aux Gram négatifs.

Dans une autre étude, Tafesh et ses collègues (2011) ont indiqué que l'effet antibactérien des composés phénoliques des margines diminue si on les teste individuellement.

Il est intéressant de noter que les deux extraits ont exercé un effet antibactérien significatif contre *L. monocytogenes* et *B. subtilis*. Ces premiers résultats suggèrent la possibilité de valoriser les biophénols actifs des effluents oléicoles dans la conservation des aliments. D'ailleurs, les résultats obtenus par Djenane et ses collègues (2011) ont indiqué l'efficacité des extraits phénoliques des feuilles de l'olivier dans la conservation de la viande.



Listeria sp.



B. subtilis

Photographie 5 : L'effet inhibiteur des extraits sur les deux bacilles à Gram positif.

Plusieurs autres études ont mis en évidence l'effet inhibiteur des polyphénols de l'olivier (feuilles, olives, huile, margines, grignons) sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Bisignano *et al.*, 1999; Korukluoğlu *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007; Erdohan & Turhan, 2011 ; Krid *et al.*, 2011; Paudel *et al.*, 2011**).

Enfin, on peut dire que la méthode de diffusion des disques en papier sur milieu gélosé est considérée comme un test préliminaire principalement qualitatif. Pour cela, il est recommandé d'évaluer la CMI des extraits qui ont donné des zones d'inhibition supérieures ou égale à 10 mm (**Bisignano *et al.*, 1999**).

CONCLUSION



La valorisation des polyphénols des margines offre une double opportunité d'obtenir des biomolécules actives et de réduire la toxicité de ces effluents.

Notre étude avait pour objectifs essentiels, l'extraction et la quantification des composés phénoliques des effluents oléicoles, et ensuite, l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits obtenus sur huit souches pathogènes à Gram positif.

Les échantillons choisis pour notre travail appartiennent à la variété *Rougette* et proviennent de deux huileries de l'Est algérien (Guelma). Les margines étudiées, résultent de deux systèmes d'extraction différents, le premier est dit discontinu ou à presse et le deuxième est continu à deux phases.

D'après les normes des rejets des effluents liquides, citées dans le journal officiel de la république Algérienne (2006), on conclue que nos margines sont plus au moins acides [pH = 4,92 - 4,86] et très riches en matières organique [MS = 89 - 55 g/l] et minérale [CE = 18,10 - 07,90 mS/cm ; S = 10,60 - 04,40]. Une énorme charge polluante et une biodégradabilité difficile, traduites en termes de DCO [314,40 - 313,20 g d'O₂/l] et de DBO₅ [201,25 - 224,56 g d'O₂/l], ont été également marquées pour les deux échantillons.

Une extraction liquide-liquide a été effectuée, en utilisant le n-hexane et l'acétate d'éthyle comme solvants, afin de récupérer les composés phénoliques des margines. Les dosages des polyphénols totaux des extraits ont été effectués selon la méthode de Folin-Ciocalteu en se référant l'acide gallique. La teneur la plus élevée (70,33 g/l) correspondre aux margines provenant d'une huilerie traditionnelle.

L'effet antibactérien des extraits a été mis en évidence par la technique de diffusion des disques sur sept bactéries à Gram positif (cinq *S. aureus*, *L. monocytogenes*. et *B. subtilis*).

Les résultats montrent différentes zones d'inhibitions. Le spectre d'activité varie selon la composition de l'extrait testé, l'espèce de la souche-test et son origine.

Les deux extraits ont exercé un effet antibactérien intéressant sur l'ensemble des souches-test avec des zones d'inhibition comprises entre 4 et 22 mm. Les diamètres les plus

importants ont été enregistrés contre *S. aureus* 4 (22 mm), *B. subtilis* (18 mm) et *L. monocytogenes* (15 mm).

Ces résultats sont prometteurs et suggèrent la possibilité d'utiliser les biophénols issus des effluents des industries oléicoles comme moyens de lutte contre les germes d'altération des aliments. Néanmoins, d'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- La confirmation du pouvoir antibactérien de nos extraits en utilisant d'autres techniques ;
- L'identification du contenu phénolique de chaque extrait ;
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits vis-à-vis de d'autres bactéries et champignons pathogènes.

Résumés



Résumé

Les industries oléicoles, en plus de leur production principale qui est l'huile d'olive, génèrent des quantités énormes de margines. Ce travail consiste à valoriser ces effluents en évaluant leur pouvoir antibactérien. La caractérisation physico-chimique des échantillons a montré des rejets acides [pH = 4,92 - 4,86], polluants [DCO = 314,40 - 313,20 g d'O₂/l ; DBO₅ = 201,25 - 224,56 g d'O₂/l] et très riches en matières organique [MS = 89 - 55 g/l] et minérale [CE = 18,10 - 07,90 mS/cm ; S = 10,60 - 04,40]. Une extraction liquide-liquide a été effectuée, en utilisant l'acétate d'éthyle. Les dosages des polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu (70,33 - 35,66 g EAG/l). L'activité antibactérienne a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis de sept souches bactériennes à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus subtilis*). Les résultats obtenus sont très encourageants et ouvrent une voie prometteuse pour l'utilisation des polyphénols des margines comme agents antimicrobiens naturels.

Mots clés : olivier, margines, pollution, extraction, polyphénols, effet antibactérien.

Abstract

The olive oil industries, in addition to their main production of olive oil, generate huge amounts of olive mill wastes water (OMW). This work involves valuing these effluents by evaluating their antibacterial effect. The physico-chemical characterization of the samples showed acid wastes [pH = 4.92 - 4.86], pollutants [COD = 314.40 - 313.20 g O₂ /l; BOD₅ = 201.25 - 224.56 g O₂ /l] and very rich in organic [MS = 89 - 55 g / l) and mineral matter [EC = 18.10 - 07, 90 mS /cm; S = 10.60 - 04, 40]. A liquid-liquid extraction was performed using ethyl acetate. Quantification of total polyphenols were determined by the Folin-Ciocalteu reagent (70, 33 - 35.66 g EAG /l). The antibacterial activity was determined by the agar diffusion method against eight bacterial Gram-negative strains (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*). The results are very encouraging and open a promising way for the use of OMW's polyphenols as natural antimicrobial agents.

Keywords: olive, wastes, pollution, extraction, polyphenols, antibacterial effect.

ملخص

صناعة زيت الزيتون، بالإضافة إلى إنتاجها الرئيسي ألا وهو زيت الزيتون، تولد كميات كبيرة من النفايات السائلة. يشمل هذا العمل تقييم هذه النفايات السائلة من خلال تقييم قوتها المضادة للجراثيم. أظهرت الخصائص الفيزيائية للعينات ان النفايات الحمضية [الرقم الهيدروجيني = 4,86-4,92]، والملوثات [COD = 314,313-20,40 ز O2 / لتر. BOD5 = 201,224-56,25 ز O2 / لتر] وغنية جدا بالمواد العضوية [MS = 89-55 غرام / لتر] والمعادن [CE = 18.10 إلى MS 07.90 / سم؛ S = 10.60 إلى 04.40]. تم إجراء استخراج السائل السائل باستخدام خلاص الإيثيل. وتم تحديد جرعات من إجمالي البوليفينول التي فولين- (70 Ciocalteu، 33-35، 66 ز EAG / لتر). تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا من خلال طريقة نشرها وجها لوجه أجار سبع سلالات موجبة الجرام البكتيرية (المكورات العنقودية الذهبية، الليستريا المستوحدة والعصوية الرقيقة). نتائج مشجعة جدا وتفتح طريقة واعدة لاستخدام مادة البوليفينول النباتية، العوامل المضادة للجراثيم الطبيعية.

كلمات المفتاحية: ماء الزيتون النباتية، التلوث، استخراج، بوليفينول، تأثير مضاد للجراثيم.

Références
bibliographiques



- Aissam H.** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. *Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fes.* **2003**; 156p.
- Allouche N., Fki I., Sayadi S.** Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.***2004**; 52: 267–273.
- Al Mallah K., Asma O.J., Abu Lail N.I.** Olive mills effluent (OME) wastewater posttreatment using activated clay. *Separation and Purification Technology.* **2000**;20: 225-234.
- Annaki A., Chaouch M., Rafiq M.** Influence de la durée du stockage des olives sur l'évolution de la composition des margines. *L'eau. L'industrie. Les nuisances.* **1999b**; 218: 24-28.
- Archambaud M.** Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques *in vitro*. *Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse.***2009**.
- Arda Y., Nazli B.P., Semra Y.T.** Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Desalination.* **2010**; 262: 209–214.
- Assous M-V., Guérineau A-L-B., Bourly H., Dhote R., Paugam A.** Microbiologie et pathologie infectieuse. *Edition américaine.***1999**; 32p.
- Azbar N.,Tutuk F.,Keskin T.** Biodegradation performance of an anaerobic hybrid reactor treating olive mill effluent under various organic loading rates. *International Biodeterioration & Biodegradation.***2009**; 63: 690–698.
- Aziz NH., Farag SE., Mousa LA., Abo-Zaid MA.** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds.*Microbios.***1998**; 93: 43-54.
- Bannerman L.T., Kleeman K.T., Kloss W.E.** Evaluation of the Vitek System Gram positive identification of coagulase negative Staphylococci. *J. clin. Microbiol.***1993**; 31(5) : 1322-1325.
- Baudry C., Buzellec H.** Microbiologie-immunologie (exercices, application), 2ème édition. **2006**; 45-49 p.
- Beccari M., Majone M., Petrangeli Papini M., Torrasi L.** Enhancement of anaerobic treatability of olive oil mill effluents by addition of Ca (OH) ₂ and bentonite without intermediate solid/liquid separation. *Proceedings of the First World Congress of International Water Association, Paris.***2000**; 3-7.

- Ben Rouina B., Nefzaoui A.** L'utilisation d'un aliment complet à base de feuille et de grignons dans l'engraissement des ovins. *Proceeding du séminaire national de la valorisation des sous-produits agro-alimentaires*.**1986**.
- Benabid H.** Caractérisation de l'huile d'olive algérienne Apports des méthodes chimiques. Thèse de doctorat en science, université Mentouri Constantine.**2009**.
- Benlemlih M., Ghanam J.** Poly phénols d'huile d'olive trésors santé. Edition Médicartrix**2012**;19-30.
- Bensemmane A.** Le trait d'union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural. *1er forum méditerranéen de l'oléiculture*.**2009**;1111- 4762.
- Benyahia N., Zein K.** Pollution and development issues in Medeteranean basin. *2ndconferance international Swissevenvironmental Solutions for emerging Countries (SESEC2), Lausanne, Suisse*. **2003**; 28- 29.
- Binchi Bianchi G., Pozzi N.** 3,4-dihydroxyphenylglycol, a major C6-C2 phenolic in Olea europaea fruits. *Phytochemistry*. **1994**;35:1335-1337.
- Bingen E.** Mécanisme d'action des bêta-lactamines; de la structure bactérienne à la structure de la molécule. *Laboratoire Roussel, Nice*.**1986**; p. 8-17.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A.** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol*. **1999**; 51:971-4.
- Blancard D., Lot H., Maisonneuve B.** Maladies des salades, identifier, connaître et maîtriser. *Edition Paris*.**2003**; p 277.
- Blazquez M-JM.** History of Olive Tree, *The World Olive Encyclopaedia, IOOC. Madrid*.**1996**;19-54.
- Bolou G.E.K., Attioua B., Guessan A.C., Coulibaly A., Guessan J.D., Djaman A.J.** Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. **2011**; 80: 72-790.
- Borja R., Martin M.A., Banks C.J., Alonso V., Chica A.** Kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environ. Pollution*. **1995**; 88:13-18.

Bousseboua H. Eléments de microbiologie générale. Edition de l'université Mentouri Constantine. **2002**; 161p.

Bouaziz M. Production et caractérisation de molécules bioactives à partir de deux plantes médicinales: oleaeuropaeal et hyparrheniahirtal. stapf. *Thèse pour l'obtention du grade de docteur en chimie, Université de sfax.***2003**.

Boudjouref M. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. *Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister, Université Mouloud Mammeri.***2011**.

Bouhadjra K. Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. *Thèse de magister, Université Mouloud Mammeri.* **2011**; p 94.

Bouknana D., Hammouti B., Salghi R., Jodeh S., Zarrouk A., Warad I., Aouniti A and Sbaa M.J. *Mater. Environ. Sci.* 4. **2014** ; 1039.

Brélivet D., Galaret A., Jedor B. Clostridium difficile et risque pour la santé dans les systèmes de soins. **2005**.

Brenes M., Hidalgo F. J., Garcia A., Rios J. J., Garcia P., Zamora R., Garrido A. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of American oil Chemist's Society.***2000**; 77 (7): 715-720.

Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions. *Biochem. J.* **1998**; 330: 1173-1178.

Camurati F., Lanzani A., Arpino A., Ruffo C., Fedeli E. Le acque di vegetazione della lavorazione delle olive: tecnologie de economie di recupero di sottoprodotti. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.***1984**; 61: 283-292.

Centi G., Perathoner S., Torre T., Verduna M.G. Catalytic wet oxidation with H₂O₂ of carboxylic acids on homogeneous and heterogeneous Fenton type catalysts. *Catalysis Today.***2000**; 55: 61-69.

Chamkha M., Patel B.K.C., Garcia J.L., Labat M. Isolation of *Clostridium biofermentants* from oil mill wastewater converting cinnamic acid to 3-phenylpropionic acid and emendation of species. *Anaerobe.* **2001**; 7: 189-197.

Cheyrier V.V., Souquet J.M., Fulcrand H., Sarni P., Moutounet M. Stabilisation tannins-anthocyanes données générales. Extrait des composés phénoliques. *Journée technique sur les polyphénols*.**1998**.

Chimi H. Technologie de l'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. *Département des sciences alimentaires et nutritionnelles IAV Hassan 2 Rabat*. **2006**; 1-4.

COI. International course on water management and irrigation of olive orchards.*Limassol-Cyprus*.**2008**; 20p.

Colton R., Russell J. Structure de la bactérie, PDF **2003**.

Cossu R., Blakey N., Cannas P. Influence of co-disposal of municipal solid waste and olive vegetation water on anaerobic digestion of sanitary landfill. *Water SciencesTechnology*.**1993**; 27:261-271.

De Felice B., Pontecorvo G., Cartagena M. Degradation of waste waters from olive oilmills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20 255 and *pseudomonas pitida*. *Acta Biotechnol.***1997**; 17: 231-239.

De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oilmill wastewaters. *Food Chemistry*.**2007**; 104(2): 858–867.

Deeb A-A., Fayyad M-K., Alawi M-A. Separation of poly phenols from Jordinian olive oil mill waste water, search article **2012**.

Di Serio M.G., Lanza B., Mucciarella M.R., Russi F., Iannucci E., Marfisi P., Madeo A. Effects of olive mill wastewater spreading on the physico-chemical andmicrobiological characteristics of soil. *International Biodeterioration andBiodegradation*.**2008**; 62: 403-407.

Dias A., Bezerra R., Pereira A. Activity and elution profile laccase during biological decolorization and dephenolisation of olive mill waste water. *Bioresource Technology*.**2004**; 92:7-13.

Di Giovacchino L., Sestili S., Di Vincenzo D. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**;104 : 587–601.

- Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P.** Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature & Technologie*. **2012**; 7: 53-61.
- Clavé D.** Laboratoire de Bactériologie-Hygiène CHU Toulouse **2008**.
- Drugeon H.B., Courtieu A.L.** Techniques semi-automatisées où automatisées Eds bactériologie médicale : *Techniques usuelles, Paris, SIMEP*.**1987**;245-247.
- El Alami B.** Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante de la fraction phénolique des margines. *Thèse de Doctorat, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan, Maroc*. **2000**;93p.
- El hajjouji H.** Evaluation des caractéristiques physico-chimiques et éco toxicologiques des effluents d'huileries d'olive au cours de traitement biologique et chimique. *Thèse de doctorat, Université de Marrakech*.**2007**; 148p.
- Ercoli E., Ertola R.** SCP production from olive black water. *Biotechnol.Lett.***1983**; **7**: 457-462.
- Eroglu E., Eroglu I., Gündüz U., Yücel M.**Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. *Bioresource Technology*. **2008**; 99: 6799-6808.
- FAO.** Graines, noix et amandes oléagineuses. *FAO Bull.Stat.*, **2003**;4: 75 p.
- Fedeli E.** Lipids of olives. *Pros. Chem. Fats other lipids*.**1977**; 15: 57-74.
- Ferron A.** Bactériologie médicale. *Editions C. et R.* **1984**; (3, 14,15) : 32-166.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A., Borja R.** Use and treatment of olive mill waste water: Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*. **1992a**; 2: 101-106.
- Fiestas J.A., Borja R.** Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Acietes*. **1992b**; 43: 101-106.
- Filidei S., Masciandro G., Ceccanti B.** Anaerobic digestion of olive oil mill effluents: Evaluation of wastewater, the organic load and phytotoxicity reduction. *Water, Air Soil Pollut.* **2003**; 145: 79-94.

- Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A., Panella A., Fabio T.** Environmental effects caused by olive mill waste waters: Toxicity comparison of low-molecular-weight phenol compounds. *J. Agr. Food Chem.* **2003a**; 51: 1005-1009.
- Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A., Parrella A., Temussi F.** Environmental effects caused by olive mill Waste waters : toxicity comparison of low-molecular-weight phenol Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2003b**; 51: 1005–1009.
- Firas A., Hassan F. J.** *Zhejiang Univ. Sci.* **2008**; 9(2): 154.
- Floss H.G.** Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports.***1997**; 14:433-434.
- Francesco G.L.** Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae.***1993**; 47:15-20.
- Frédérique G.** Bactériologie générale ; fédération de bactériologie, virologie et hygiène hospitalière problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae.***2008**;47: 15-20.
- Gaudy C., Buxeraud J.** Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. *Collection Pharma, Elsevier.***2005**; 269 p.
- Galli E., Pasetti L., Volterra E., Tomati U.** Compost from olive processing industry waste waters. Congresso Internazionale, L'approccio Integrato della Moderna Biologia : Uomo, Territorio, Ambiente.**1994**; 1: 22-25. Vieste (FG). 22-25 Settembre Italia.
- Gee J.M., Johnson I.T.** Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry.* **2001**;8: 1-182.
- Ghattas D.** Valorisation des margines par digestion anaérobie. *Mémoire De Diplôme d'Etudes Approfondies. Agence Universitaire de la Francophonie, Bureau Moyen-Orient.***2004**; 40p.
- Ghattas D.** Valorisation des margines par digestion anaérobie. *Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA). Contrôle et gestion de qualité.***2004**.
- Gonçalves C., Lopes M., Ferreira J. P., Belo I.** Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *BioresourceTechnology.***2009**; 100: 3759–3763.

- Gomri A.** Diversité et propriété fonctionnelles des bactéries lactiques isolées des margines d'olives fermentés. *Thèse de Magister. Université d'Oran Es-Senia.* **2013**; 3-17.
- Guedon D.B.** Le Tutour, Antioxidativeactivities of Olea europaealeaves and relatedphenoliccompounds. *Phytochemistry.***1992**;1:1173-1178.
- Hamdi M.** Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. *Thèse de doctorat. Université de Provence. Marseille.* **1991**; 168 p.
- Hamdi M.** Future prospects and constraints of olive millwaste waters use and treatment. A. *Review. Bioprocess Engineering.* **1993**; 8: 209-214.
- Hanafi F., Sadif N., Assobhei O., Mountadar M.** Traitement des margines par électrocoagulation avec des électrodes plates en aluminium. *Revue des sciences de l'eau, Journal of Water Science.* **2009**; 22: 473-485.
- Harbone J.B.** General procedures and measurment of total phenolics. *In Harbone J B.Plant phenolic. Academic Press, Londres.***1989**; 1-28.
- Hardy S.P.** Human microbiology. *Taylor & Francis.* **2002**; 257p.
- Hartzallah H., Kiritsakis A.** Effet antioxydant des extraits phénoliques des feuilles et des fruits de l'olivier.**1999**; N°77.
- Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B., Legrand M.** Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinatehydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.***2004**;16: (6) : 1446-1465.
- Hunter A.** avec la collaboration d Uilenberg G et Meyer C, la santé animale, **2006**.
- Kaufmann S. H. E.** Host response to intracellular pathogens. *New York.* **1997**; 345 p.
- Kaismoune N.** *Listeria monocytogenes* et les produits alimentaires ; Date de soutenance : 12/05/2009.
- Kaufmann S. H. E.** Host response to intracellular pathogens. *New York.***1997**; 345 p.

- Kavvadias V., Doula M.K., Komnitsas K., Liakopoulou N.** Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *Journal of Hazardous Materials*.**2010**; 182: 144–155.
- Koseki S., Yamamoto K.** Modeling the bacterial survival / death interface induced by high pressure processing Food Microbiol. **2007**; 1116(1): 136-143.
- Lacomelli A.** Olive mill waste water & SAP adopted by BACRON contracting parties. Work Shop on Agro- industry development in the coastal areas, with special focus on the olive oil industry, Liban.**2000**.
- Larif M., Soulaymani A., Elmadaoui A.** Potential Effluent Oil Mills And Antibacteril Activity Poly Phenols Against Some Pathogenic Strains. *Research On Chemical Intermediates*. **2013**.
- Lavee S.** Olive Tree Biology and Physiology. *World Olive Encyclopaedia, IOOC*, Madrid, **1996**; 5910.
- Le Conseil Oléicole International (COI, 2001).**www.internationaloliveoil.org
- Le Conseil Oléicole International (COI, 2006).**www.internationaloliveoil.org
- Léger C.L.** Co-produits de l'huilerie d'olive : Les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques. *Oléagineux Corps Gras Lipides (OCL)* **1999**; 6: 60-63.
- Leulmi N.** La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. *Mémoire de Magister, université de Mentouri Constantine*. **2011**;2: 24- 26.
- Levi-Minzi, R., Saviozzi A., Riffaldi R., Falzo L.** Lo smaltimento in campo delle acque di vegetazione. Effetti sulle proprietà de l terreno. *Olivae*.**1992**; 40: 20-25.
- Loukas M., Krimbas C.B.** History of Olive Cultivars Based on the Generic Distances, *J. Hort. Science*.**1983**; 58: 121-127.
- Loulan P.Y., Thelier Y.** Procédé et dispositif de traitement par fermentation méthanique des eaux résiduaires lipidiques. *Brevet français*.**1987**; 262-439.
- Mendil M., Sebai A.** Catalogue des variétés algériennes de l'olivier. Aperçus sur le patrimoine génétique Autochtone. **2001**; P: 7-11.

Madr., Dsasi., Sdsa. (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural/Direction des Statistiques et des Systèmes d'Informations/Sous-Direction des Statistiques Agricoles) **2003**.

Macheix J.J., Fleuriet A., Billot U. Fruit phenolics. *CRC Press Inc, Boca Raton Florida*.**1990**; 378p.

Macheix J-J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes*. **2005a**; p4-5.

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux (Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique).*Lavoisier*.**2005b**.

Mantzavinos D., Kalogerakis N. Treatment of olive mill effluent: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes. *Environment International*.**2005**; 31: 289-295.

Metahri M.S. Elimination simultanée de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitées, par des procédés mixtes. Cas de la STEP Est de la ville de Tizi-Ouzou. *Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri*. **2012**; 148p.

Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N. J. Bioremediation and biovalorisation of olive-millwastes. *Applied Microbiology Biotechnology*. **2009**; 82 : 25–39.

Meyer A., Deiana J., Bernard A. Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} édition.**2004**; 30 p.

Narayana K-R., Reddy M-S., Chaluvadi M-R., Krishna D-R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*. **2001**; 33:2-16.

Nefzaoui A. Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. *Proceeding du séminaire sur l'économie de l'olivier, Tunis*.**1987**.

Nefzaoui A. Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits) option méditerranéennes série séminaire. *Ecole Supérieure d'horticulture Sousse, Tunisie*.**1991a**; 16:101-108,

- Nefzaoui A.** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. *Options méditerranéennes*. **1991b**; 153-173.
- Nikaido H., Vaara M.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* **1985**.
- Noubih A., Abderrabba M., Provost E.** Temperature and addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *J. Chem. Thermodynamics*. **2007**; 39:297-303.
- Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Stockmann R.** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**; 53(4):823–837.
- Owen.** Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*. **2003**; 41 (5): 703-17.
- Paganga G., Miller N., Rice-Evans C. A.** The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. *Free Radic Res.* **1999**; 30: 62-153.
- Panizza M., Cerisola G.** Olive mill wastewater treatment by anodic oxidation with parallel plate electrodes. *Water research*. **2006**; 40, 1179-1184.
- Papadimitriou E.K., Chatjipa I., Balis C.** Application of composting to olive mill wastewater treatment. *Environmental technology*. **1997**; 18: 101-107.
- Paredes., 1999; Sieria., 2001; Gereti., 2004.** influence of bulking agent on the degradation of olive mill waste water sludge during composting" international biodeterioration & biodegradation. **1996**; 205-210.
- Potel G., Baron D.** Infections à Staphylocoques *EMS, Mal. Infection, 8001 A 10, 1990*.
- Prescott H., Klein W., Sherwood W.** Microbiologie. Debook. **2010**; 58 p.
- Procida G., Ceccon L.** Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill waste waters. *Analytica Chimica Acta*. **2006**; 561: 103–106.
- Projet SMAP III –Tunisie.** Stratégie de gestion intégrée de la zone côtière Sud du Grand Sfax. Aménagement paysager des bassins de margine. **2006-2008**.

Protais J., Boscher E., Quéguiner S., Chidaine B., Fravalo P. Identification du genre enterococcus Dans la matrice « oeuf entier liquide ». **2007**.

Quincampoix J.C., Mainardi J.L. Mécanisme de résistance des cocci à Gram positif. **2001**; 268-275.

Ramos-Cormenzana A. Physical, chemical, microbiological and biochemical treatability of olive oil mill effluents by addition of Ca(OH)₂ and bentonite without Water Association, *Paris*. **1986**;3-7.

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

Ribereau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. *Dun ond, Paris*. **1968**.

Rivas J., Beltran F., Acedo B., Gimeno O. Two step waste water treatment: Sequential ozonation –Aerobic biodegradation. *Ozone Science and Engineering*. **2000**; 22: 617- 636.

Rodier J., Legube B., Merlet N. L'analyse de l'eau, 9^{ème} Ed, *DUNOD, Paris*. **2009**; 1525.

Roig A., Cayuela M.L., Sanchez-Monedero M.A. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* **2006**; 26.960-969.

Ryser T., Marth E.H., EDS. *Listeria, listeriosis and food safety. Second edition; Marcel Dekker*. **1999**; 41- 60.

Salvemini F. Composizione chimica e valutazione biologica di un man gime ottenuto essic and otercamente le acque di vegetazione delle olive. *Riv. Delle Sostanze Grasse*. **1985**;112: 559-564.

Sekour B. Phyto protection de l'huile d'olive vierge (H.O.V) par ajout des plantes végétales (thym, ail, romarin). **2012**;15 p.

Siroit J. Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques in vitro In L. LEMINOR et VERON : bactériologie médicale, 2^{ème} éd., *Flammarion, Paris*. **1990**.

Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A., Schlegel H.G. The prokariotes, handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. **1981**; p1756-1802.

Subsamanian S., Stacey G., Yu O. Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science.*, **2007**;12(7): 282-283.

- Sudjana AN., D'Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Riley T.V., Hammer KA.** Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *I. J. Antimicrob. Agents.* **2009**; 33:461-463.
- Tomati U., Galli E.** In Humus, its structure and role in agriculture and environment, Kubat J. Ed. Elsevier, London. **1992**; 117-126.
- Threlfall E.J., Fisher I.S.T., Ward L., Tschape H., Gerner-Smidt P.** Harmonization of antibiotic susceptibility testing for Salmonella: Results of a study by 18 national reference laboratories within the European Union-funded Enter-Net group. *Microb. Drug Resist.* **1999**; 5, 195.199.
- Treki Amina S., Merghem R., Dehimat L.** Etude phyto chimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée : *Thymus hirtus*. **2009**; 25-29.
- Tsagariki E., Harris N., Lazarides., Konstantinos B. P.** Olive mill waste water treatment. *Springerlink.* **2007**; 133-157.
- Tyouri M., Elbouardi A., Manal A., Homari A., Ezbakhe H., Ajzoul T.** Propriétés thermo physiques du sable emulsion Margineux utilise dans la réalisation des Pistes agricoles. *13èmes Journées Internationales de Thermique. Albi, France du 28 au 30 Août. 2007.*
- Urquiaga I., Leighton F.** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.* **2000**; 33:(2): 55-64.
- Vassaut A., Mollard J.F., Naudin C., Dumont G., Azzedine M.C., Bailly M.** Définition et description d'une technique de validation (document C). *FMES, Mal. Infection.* **1990**: 18p.
- Vincent Jarlier.** Résistance aux antibiotiques Rôle du laboratoire de bactériologie **1992.**
- Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F., et al.,** Antioxidants and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **1999**; 47: 3397-3401.
- Walker R.D.** Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Ames, IA, Iowa State University Press. **2000**; 12-26.
- Winkel-Shirley B.** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology.* **2001**; 126:485-493.

Werdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J. et al. Flavonoids and heart health. Washington. *Journal of Nutrition*. **2007**; 718-737.

Yaakoubi A., Chahlaoui A., Rahmani M., Elyachioui M., Oulhote Y. Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. **2009**; 36-43.

Yaakoubi A., Chahlaoui A., Rahmani M., Elyachioui M., Oulhote Y. Traitement des margines à pH neutre Et en conditions d'aérobic par la Microflore du sol avant épandage. *Bull.Soc.Pharm.Bordeaux*. **2010**;44-56.

Yakhlef G. Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vul garis* et *Laurus nobilis*. *Mémoire de Magister, Université de Batna*. **2010**; 32-62.

Zenjari B. Etude ecotoxicologique des effluents liquides des huileries de la ville Marrakech : Impact sur les milieux récepteurs et détoxification. Thèse de Doctorat, Université de Marrakech, Maroc. **2000**.

Zouari N.R., Ellouz M. Microbial consortia for the aerobic degradation of aromatic compounds in olive mill effluent. *J. In dust. Microbiol.* **1996**; 16, 152-162.

M. BOUACID Abdallah

&

M^{elle} BAALI Amel

Diplôme: Master

Thème : Caractérisation physico-chimique des margines et évaluation de leurs activité contre les bactéries à Gram positif

Résumé

Les industries oléicoles, en plus de leur production principale qui est l'huile d'olive, génèrent des quantités énormes de margines. Ce travail consiste à valoriser ces effluents en évaluant leur pouvoir antibactérien. La caractérisation physico-chimique des échantillons a montré des rejets acides [pH = 4,92 - 4,86], polluants [DCO = 314,40 - 313,20 g d'O₂/l ; DBO₅ = 201,25 - 224,56 g d'O₂/l] et très riches en matières organique [MS = 89 - 55 g/l] et minérale [CE = 18,10 - 07,90 mS/cm ; S = 10,60 - 04,40]. Une extraction liquide-liquide a été effectuée, en utilisant l'acétate d'éthyle. Les dosages des polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu (70,33 - 35,66 g EAG/l). L'activité antibactérienne a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis de sept souches bactériennes à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus subtilis*). Les résultats obtenus sont très encourageants et ouvrent une voie prometteuse pour l'utilisation des polyphénols des margines comme agents antimicrobiens naturels.

Mots clés : olivier, margines, pollution, extraction, polyphénols, effet antibactérien.

Devant le jury:

Président :	Mme LABANI F.Z.	(MAA)	Univ. Abbès Laghrour- Khenchela
Encadreur :	M^{elle} YAKHLEF W.	(MAA)	Univ. Abbès Laghrour- Khenchela
Examineur :	M^{elle} CHORFI K.	(MAB)	Univ. Abbès Laghrour- Khenchela