

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان
Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



MÉMOIRE

Présenté par

MERGHACHE Ahmed

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Nutrition & Pathologie

Thème

ANALYSE PHYTOCHIMIQUE ET POTENTIEL ANTIOXYDANT DES DECHETS OLEICOLES LIQUIDES DE LA REGION DE TLEMCEN

Soutenu le 30 /06/ 2022, devant le jury composé de :

Président	Khaldi Darine	Maitre assistante	Université de Tlemcen
Encadreur	Badid Naima	Maitre de Conférences	Université de Tlemcen
Examineur	Benhammou Belyagoubi Nabila	Professeur	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021 – 2022

DÉDICACES

*Louange à ALLAH le tout puissant, qui m'avoit donnée la santé, la patience, la puissance pour réaliser ce travail et qui m'a permis de voir ce jour tant attendu.
Je dédie ce travail*

À mes très chers parents :

Aucune dédicace ne pourrait exprimer toute ma gratitude et mon amour pour vous. Ce stade de ma formation représente le fruit de votre générosité, vos sacrifices et de vos encouragements. Puisse Dieu vous protéger, accorder bonheur et une longue et saine vie !

À ma sœur Sara et son mari Khaled :

Je sais à quel point c'est une chance d'avoir une sœur sur qui compter. Je vous remercie et vous souhaite bonheur, succès et prospérité à vous et votre famille.

À mes nièces Chahd et Bouthaina :

Les petites mains, le sourire, les yeux brillants sont inégalés. Vous avez procuré tant de joie et de bonheur pour notre famille. Je vous aime bien.

À toute ma famille :

À vous tous nommés Merghache, je vous dédie ce fruit en reconnaissance de l'encouragement et de votre extraordinaire gentillesse que vous me donnez au quotidien.

À mes amis :

Brahim, Yassine, Sidi Mohamed, Soheib, Riad : vous êtes des frères fiables. Je vous souhaite une longue vie pleine de réussite.

À toute la promotion de Master en Nutrition et Pathologie :

En témoignage de l'amitié qui nous unit et tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous souhaite une vie pleine de réussite et de bonheur.

REMERCIEMENTS

On remercie Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire de Master.

Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude aux membres du jury pour avoir pris le temps de lire attentivement et dévaluer notre travail :

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de M^{lle} BADID Naima, Maitre de Conférences, à l'université de Tlemcen, pour la qualité de son encadrement exceptionnel, sa patience, sa rigueur et pour sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

C'était un grand honneur de travailler avec vous.

Nos remerciements s'adressent à Mme BENHAMOU BELYAGOUBI Nabila, Professeur, pour son aide précieuse durant le pratique, son soutien moral, ses encouragements.

Enfin, je tiens à remercier Mme. KHALDI Darine, Maitre assistante, à l'université de Tlemcen d'avoir accepté d'être de présider ce jury et d'examiner notre travail.

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

TABLES DES MATIERES

	P.
Dédicaces.....	i
Remerciements.....	ii
Liste des abréviations	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	V
Liste des photos.....	Vi
Résumé.....	Vii
Abstract.....	viii
المخلص.....	Ix
Chapitre 1 : Etat actuel du sujet	
Introduction générale.....	1
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes	
1. Échantillonnage	9
2. Optimisation des techniques d'extractions	9
3. Extraction des composés phénoliques des margines	9
3.1 Extraction des composés phénoliques à partir des margines brutes.....	9
3.2 Extraction des composés phénoliques à partir des margines déshydratées.....	13
4. Analyse phytochimique	13
4.1 Dosage des phénols totaux.....	13
4.2 Dosage des tannins totaux.....	13
4.3 Dosage des tannins hydrolysables.....	15
4.4 Dosage des tannins condensés.....	15
4.5 Dosage des flavonols	15
5. Étude de l'activité antioxydante	16
5.1 Capacité antioxydante totale (CAT).....	16
5.2 Test de piégeage du radical libre DPPH.....	16
5.3 Réduction de fer.....	17
Chapitre 3 : Discussion	
Discussion	18
Conclusion et Perspectives.....	20
Références bibliographiques.....	22

LISTE DES ABREVIATIONS

AGS	: Acides gras saturés
MT	: Milliers de tonnes
OMWW	: Olive Mill Wastewaters
C O I	: Conseil Oléicole International
D S A	: Direction des services agricoles
ha	: Hectares
FNDRA	: Fonds national de développement rural et agricole
K	: Potassium
Mg	: Magnésium
Ca	: Calcium
Cl⁻	: Chlorure
PO₄³⁻	: Phosphate
SO₄²⁻	: Sulfates
Fe	: Fer
Cu	: Cuivre
Zn	: Zinc
Mn	: Manganèse
NI	: Nickel
DCO	: Demande Chimique en Oxygène
CEC	: Capacité d'échanges cationiques
CH₄	: Méthane
CO₂	: Dioxyde de carbone
H₂ S	: Sulfure d'Hydrogène
NH₃	: Ammoniac
EPS	: Électrophorèse des protéines sériques
CP	: Composés Phénoliques
HT	: Hydroxytyrosol
HDL	: High Density Lipoprotein
LDL	: Low Density Lipoprotein
RL	: Radicaux libres
DPPH	: 2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
Na₂CO₃	: Carbonates de sodium
FRAP	: Ferric Reducing Ability of Plasma

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Composition chimique des margines.....	3
Tableau 2	Activités biologiques des composés phénoliques de la margine	6

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 1 :	Processus d'extraction de l'huile d'olive et sous-produits obtenus...	2
Figure 2 :	Processus d'extraction 1 des polyphénols à partir des margines brutes.....	10
Figure 3 :	Extractions 2, 3, 4 des polyphénols à partir des margines brutes	12
Figure 4 :	Extractions 5, 6, 7, 8 des composés phénoliques à partir des margines déshydratées.....	14

LISTE DES PHOTOS

Photo	Titre	Page
Photo 1 :	Margine déshydratée.....	9
Photo 2 :	Margine brute.....	9
Photo 3 :	Phase acétate filtrée après décantation.....	11
Photo 4 :	Phase butanol filtrée après décantation.....	11
Photo 5 :	Évaporation sous vide des phases par un évaporateur rotatif.....	11

المخلص

تنتج عملية إنتاج زيت الزيتون كمية كبيرة من المخلفات السائلة تسمى المياه النباتية، وهي النفايات الضارة الرئيسية لهذه الصناعة. تمثل هذه المخلفات المهمة مشكلة تلوث بيئي مهمة في مناطق البحر الأبيض المتوسط وواحدة من أصعب النفايات للمعالجة. من ناحية أخرى، تعد هذه المنتجات الثانوية مصادر واعدة للمركبات النشطة بيولوجيًا. اشتملت هذه الدراسة على قياس المركبات الفينولية وهي متعدد الفينول والعفص والفلافونول، ثم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المياه النباتية باستخدام ثلاث اختبارات: القدرة الكلية المضادة للأكسدة، وكسح الجذور الحرة DPPH وتقليل الحديد. تظهر النتائج المذهلة ثراء المياه النباتية في متعدد الفينول، العفص المكثف، العفص القابل للتحلل المائي، العفص الكلي والفلافونول مع خصائص مضادة للأكسدة ملحوظة.

الكلمات المفتاحية: المياه النباتية - التلوث - المركبات الفينولية - العفص - الفلافونول - الأنشطة المضادة للأكسدة.

RESUME

Le processus de production d'huile d'olive génère une quantité considérable des résidus liquides appelés margines, principaux déchets nuisibles de cette industrie. Cet important résidu représente un problème de pollution environnementale important dans les régions méditerranéennes et l'un des déchets les plus difficiles à traiter. En revanche, ces sous-produits sont des sources prometteuses de composés bioactifs.

Cette étude consistait à doser les composés phénoliques à savoir les polyphénols, les tanins et les flavonols ensuite à évaluer les activités antioxydantes des margines à l'aide de trois tests : la capacité antioxydante totale, le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer. Les résultats marquants montrent la richesse des margines en polyphénols, tanins condensés, tanins hydrolysables, tanins totaux et flavonols avec des propriétés antioxydantes remarquables.

Mots clés : Margine – pollution - composés phénoliques –tanins – flavanols- activités antioxydantes.

ABSTRACT

The olive oil production process generates a considerable quantity of liquid residues called margins, the main harmful waste of this industry. This important residue represents an important environmental pollution problem in the Mediterranean regions and one of the most difficult wastes to treat. On the other hand, these by-products are promising sources of bioactive compounds.

This study consisted of measuring the phenolic compounds, namely polyphenols, tannins and flavonols, then evaluating the antioxidant activities of the vegetable waters using three tests: the total antioxidant capacity, the trapping of the free radical DPPH and iron reduction. The striking results showed the richness of margins in polyphenols, condensed tannins, hydrolysable tannins, total tannins and flavonols with remarkable antioxidant properties.

Key words: Margin - pollution - phenolic compounds –tannins – flavonols - antioxidant activities.

ETAT ACTUEL DU SUJET

INTRODUCTION GENERALE

Le Conseil Oléicole International (COI) estime une production d'huile d'olive mondiale de 3394 milliers de tonnes entre 2021-2022 (ARABLE CROPS AND OLIVE OIL., 2022) L'Algérie est le troisième pays producteur d'huile d'olive d'Afrique du Nord avec une production d'environ 80 000 tonnes d'huile d'olive entre 2017 à 2018 (COI., 2017). La superficie dédiée à la culture des oliviers est de 500 000 hectares, dont 150 000 sont cultivés en régime irrigué, soit l'équivalent de 50 millions d'oliviers dont 32,3 millions d'oliviers productifs. Un plan est mis en œuvre à travers le pays qui comprend 400 000 hectares de superficie plantée, et d'ici 2024, le secteur aura une superficie totale de 900 000 hectares (COI., 2018). Les différents programmes initiés par l'Etat, dont notamment le programme du Fonds national de développement rural et agricole (FNDRA) et d'autres programmes réalisés sur fonds propres ont permis à la superficie réservée pour l'oléiculture à Tlemcen de passer de 12 980 ha durant la saison 2012-2013 à 16 206 ha aujourd'hui avec un rendement moyen de 50 quintaux à l'hectare, comme indiqué par la direction locale des services agricoles. La même source a réalisé l'année dernière plus de 681 000 quintaux d'olives. De plus, 300 000 quintaux d'olives sont destinés à la consommation tandis que plus de 463 000 quintaux sont transformés en huile d'olive. La wilaya de Tlemcen dispose d'un potentiel considérable dans ce domaine dans des localités de production intensive où les oliviers occupent une superficie allant de 150 à 200 ha comme Maghnia, Ouled Mimoun, Remchi et Sabra. À travers les 31 huileries dont la wilaya dispose et les 19 conserveries, 8 sont de type traditionnel (D.S.A., 2021) Le processus de fabrication de l'huile d'olive génère généralement de grandes quantités de deux résidus dits déchets : l'un solide (grignons) et l'autre liquide (eaux usées du moulin à huile) « OMWW » (VISIOLI et al., 1999) (Figure 1).

Les grignons sont des résidus provenant du processus traditionnel par la première pression des olives ou du processus continu par la centrifugation, ils sont formés des peaux, des résidus de la pulpe et des fragments des noyaux où une certaine quantité d'huile dite huile de grignons est encore produite par ce sous-produit, cette quantité est variable selon la méthode d'extraction chimique (NEFZAOU, 1991) Différemment, les margines obtenues lors de l'extraction de l'huile d'olive sont constituées de l'eau contenue dans le fruit et de celle ajoutée au cours du broyage et des étapes de trituration (FIORENTINO et al., 2003). L'extraction de l'huile d'olive souvent produit 20 % d'huile, 30% de grignons et 50% de margines.

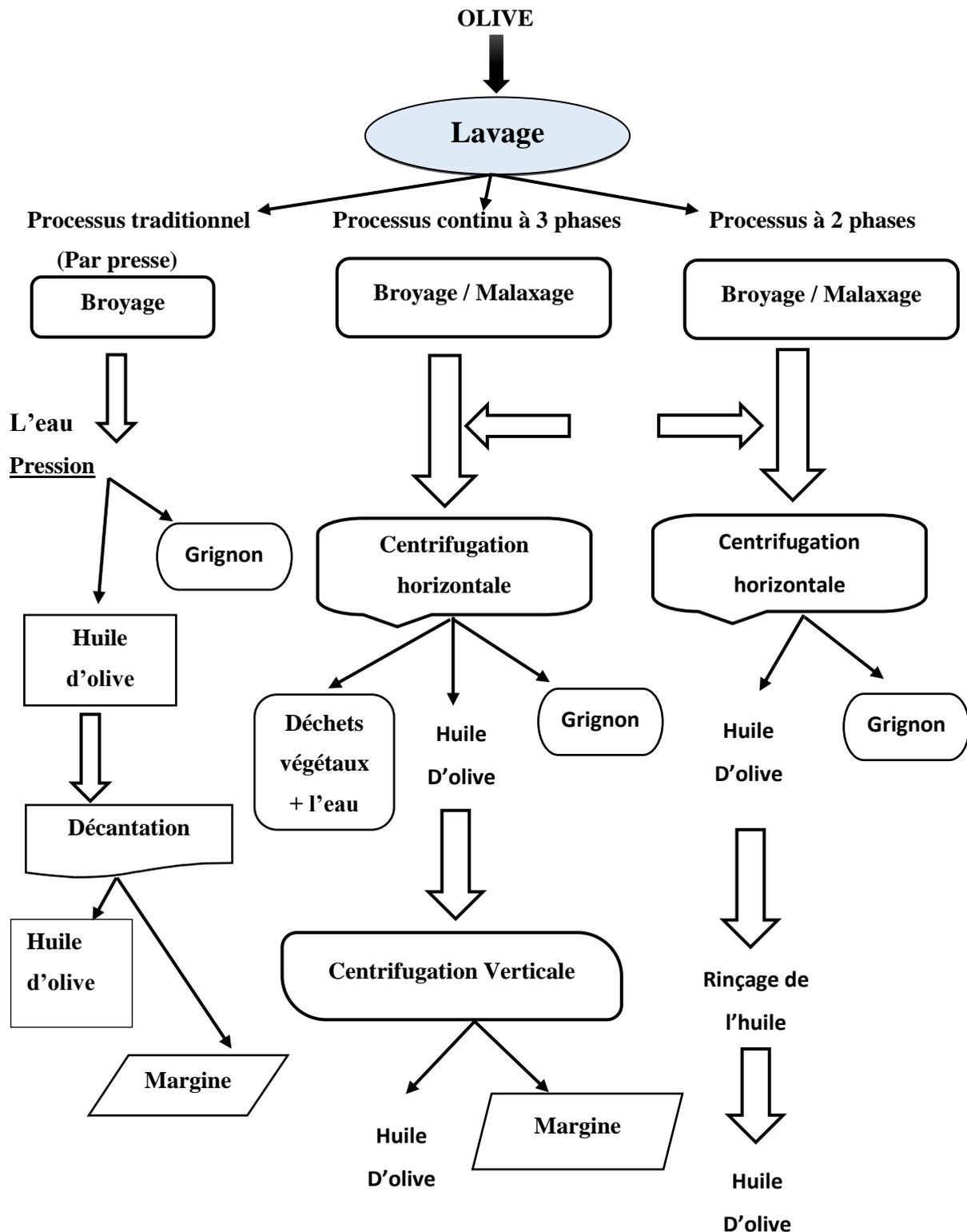


Figure 1 : Processus d'extraction de l'huile d'olive et principaux sous-produits obtenus (MORILLO *et al.*, 2008)

Le système de presse produit 0,4 à 0,5 m³ de margine à partir de 1000 kg d'olives traitées qui peut aller de 1,5 jusqu'à 2 m³/1000 kg avec le système de centrifugation de 2 à 3 phases (PARASKEVA et DIAMADOPOULOS., 2006). La margine se caractérise par sa couleur

brune à brun rougeâtre et noire due à la présence des polyphénols, d'aspect trouble, d'une odeur agréable avec un goût amer (BENYAHYA N et ZEIN K., 2003, KARRAY., 2013).

Ces effluents ont une forte charge saline et sont très acides, caractérisées par un pH de 3 à 5 et une grande conductivité électrique de l'ordre de 10 ms/cm due surtout aux ions potassium, calcium, magnésium et chlorure. La demande chimique en oxygène peut varier de 50 à 220 g/l (HANAFI et al., 2009) et le taux d'humidité est supérieur à 86% selon (OUABOU et al. 2014). De nombreux facteurs influencent sur la composition quantitative et qualitative des margines en particulier : le stade de maturation des olives, le procédé d'extraction d'huile (le broyage et la malaxation, etc.), la période de production, le stockage de fruit, la variété de l'olivier et les conditions climatiques (BENYAHYA N et ZEIN K., 2003).

Tableau 1 : Composition chimique des margines (BENYAHYA et ZEIN., 2003)

Composition chimique	Min (%)	Max (%)
Eau	83	88
Matière organique	10,5	15
Matière minérale	1,5	2
Matières grasses	0,1	1
Matières azotées totales	1,25	2,4
Polyphénols	1	1,5

La composition rendue publique par plusieurs études comporte des quantités significatives de sels minéraux dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates). Les éléments les plus répandus sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les Phosphates (14%) et le sodium (7%) (URSINOS et BORJA., 1992).

En outre, la matière organique des margines se trouve essentiellement en solution, et en moindre quantité, en suspension ou en émulsion. Sa composition est très complexe dont plusieurs composés existent avec des propriétés et des concentrations très différentes :

- Les composés cellulosiques et les pectines issues de la pulpe d'olives jouent un rôle important dans la texture des olives ; ils représentent respectivement environ 3 % et 6 % du poids de la pulpe fraîche. Mais d'autres sucres simples existent : raffinose, mannose, saccharose, glucose, arabinose et xylose (HAMD I M., 1993).
- La fraction azotée est principalement représentée par des protéines avec un pourcentage variant entre 1,2 et 2,4 %. La plupart des acides aminés sont présents dans les margines, mais les plus abondants sont les acides aspartique, glutamique, la proline et la glycine.

- En ce qui concerne les vitamines, plusieurs ont été retrouvées dans l'eau de végétation notamment la vitamine PP du groupe B à une concentration de 124 mg/kg, ainsi que les vitamines du groupe D, la vitamine E et les caroténoïdes (**AGGOUN et al., 2016**).
- La concentration d'huile résiduelle dans les margines est très variable selon les différents procédés d'extraction employés. Elle varie entre 0,02 et 1 % et peut atteindre 10,78 g/l (**URSINOS et BORJA., 1992**)
- La proportion d'acides organiques dans les margines varie entre 0,5 et 1,5 %. Les principaux acides organiques retrouvés sont les acides : fumarique, glycérique, lactique, Malique, oléique, palmitique, linoléique, maslinique et malonique (**SALVEMINI, 1985**).
- L'acide oléique est l'acide gras le plus abondant (65 %) (**NEFZAOUI A., 1991 ; TSAGARIKI et al., 2007**).

Les huiles d'olive sont riches en composés phénoliques de diverses familles (**ANGELONI C et al., 2017**). Ces derniers sont des métabolites secondaires possédant au moins un cycle aromatique portant un ou plusieurs substituants hydroxyles (OH) caractérisés par une grande complexité dans leur structure et variabilité de concentration (**LA SCALIA et al., 2017**).

Les biophénols qui proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours de fabrication d'huile d'olive, sont transférés aux différents sous-produits. En effet, 2% uniquement des composés phénoliques passe dans l'huile, 53% dans les margines et environ 45% dans les grignons. Leur faible solubilisation dans l'huile explique leur concentration élevée dans les eaux de végétation (**RODIS et al., 2002**).

En général, plus de 50 composés phénoliques ont été identifiés (**ZBAKH et al., 2012**). Les plus répandus incluent les acides phénoliques, les alcools phénoliques tels que 3,4-dihydroxyphenyl éthanol (hydroxytyrosol) et p-hydroxyphenyl éthanol (tyrosol). Parmi les flavonoïdes les plus abondants on trouve la lutéoline, la rutine et la quercétine, tandis que, les sécoiridoïdes sont révélés par la présence de l'oleuropéine et le ligustroside (**NADOUR M., 2015**).

Les composés phénoliques extraits des margines tels que l'hydroxytyrosol (HT), le tyrosol et l'oleuropéine qui se trouvent en grande concentration, sont dotés d'un large spectre d'activités biologiques (**tableau 2**). Ils possèdent des pouvoirs antimicrobiens, anti-inflammatoires et antiviraux exploités dans de nombreux domaines industriels, ainsi qu'une baisse de la glycémie. Mais l'activité antioxydante est sans doute, celle qui caractérise le mieux (**AGGOUN M., 2016**).

Les effets bénéfiques de l'HT sur l'appareil respiratoire, la peau, le système nerveux, contre le syndrome métabolique et le cancer ont été également démontrés par plusieurs travaux **(ROBLES et al., 2018)**.

En ce qui concerne le système cardiovasculaire, l'hydroxytyrosol et le tyrosol diminuent l'oxydation de lipoprotéines de faible densité (LDL). En conséquence, ils limitent la formation de plaques d'athérome dans l'athérosclérose et maintiennent une tension artérielle normale **(GRANADOS et al., 2012)**. De plus, les possibilités thérapeutiques offertes par les flavonoïdes sont exploitées depuis longtemps. Hippocrate prescrivait un baume à la propolis pour les plaies et les ulcères. Les propriétés antibactériennes de la propolis ont été attribuées plus tard aux flavonols et aux flavanones, considérés comme excellents candidats contre les champignons pathogènes humains du fait de leur pouvoir d'inhiber la germination des spores des plantes pathogènes **(CUSHNIE et LAMB., 2005)**.

Les margines sont des sous-produits de la trituration des olives, considérés comme fortement polluantes car elles contiennent de grandes quantités de matières organiques notamment les polyphénols présents dans l'eau des plantes, résistants à la dégradation biologique, ce qui affectent particulièrement la qualité des sols dans lesquelles ils sont rejetés **(SIERRA et al., 2001)**. L'industrie de l'huile d'olive dans la région méditerranéenne rejette annuellement jusqu'à 8,4 millions m³ de déchets liquides dans la nature sans aucun traitement préalable, ce fait génère un problème environnemental majeur de pollution par les eaux résiduaires des sols et de l'air.

Le plus souvent rejetées dans des récepteurs naturels et dans des cours d'eau, les margines font mal à la qualité des eaux de surface **(BEN SASSI et al., 2006)**. Les niveaux très élevés des matières organiques limitent la capacité d'autoépuration de ces eaux et la pollution peut parcourir de très longues distances. L'un des effets les plus visibles de cette pollution est la coloration des eaux naturelles due aux tanins. **(KAPELLAKIS et al., 2008)**. La diffusion d'eau végétale riche en azote peut entraîner par les nitrates la contamination des eaux souterraines des nappes phréatiques situées à proximité de la zone d'épandage ce qui affecte la qualité de l'eau potable **(BENYAHIA N et ZEIN K., 2003)**.

De plus, la marge contient de fortes concentrations de lipides et de sucres réducteurs. Les sucres stimulent la respiration microbienne ce qui réduit la disponibilité en oxygène pour les autres organismes vivants provoquant une augmentation de la population microbienne, l'eutrophisation des eaux. Par conséquent, un déséquilibre de l'écosystème aquatique, réduction des populations animales (poissons) **(IBRAHIMOGLU et YILMAZOGLU., 2018)**.

Pour ce qui est de la pollution des sols, la margine était utilisée comme un engrais organique pour réduire les coûts liés aux fertilisants industriels qui alourdissent les factures des agriculteurs, seulement, des effets néfastes ont été observés sur les propriétés des sols (SIERRA *et al* 2001).

Tableau 2 : Activités biologiques des CP (composés phénoliques) de la margine

INTERET BIOLOGIQUE	COMPOSE PHENOLIQUE	PRINCIPE ET SITE D’ACTION	REFERENCES
Anti-inflammatoire	Hydroxytyrosol	Atténue l’inflammation induite par A β (modèle animale)	PENG <i>et al.</i>, 2016
	Oleuropéine	Reduction des biomarqueurs inflammatoires (TNF- α , IL-1 α , iNOS, COX-2) après blessure de moelle épinière (modèle animale)	KHALATBARY <i>et al.</i>, 2011 KHALATBARY <i>et al.</i>, 2012
	Tyrosol	Neutralisation de la cytotoxicité induite par Cys-DA (in vitro)	VAUZOUR <i>et al.</i>, 2010
	Acide gallique	Réduire les cytokines inflammatoires	DEBOSREE G., (2015)
Antioxydant	Oleuropéine	Activité anti-radicalaire (test de DPPH)	CARRASCO-PANCORBO <i>et al.</i>, 2005
	L’acide tannique	Piégeage des radicaux libres	DEBOSREE G., 2015
	Tyrosol	Éviter la peroxydation des lipides dans les cellules Caco-2 intestinales	DEIANA <i>et al.</i>, 2010
	Hydroxytyrosol	Inhiber l’oxydation des lipides. Activer la biogenèse des appareils mitochondriaux Protéger le système immunitaire périphérique (PBMC) contre le stress oxydatif et la destruction d’ADN	ZHU <i>et al.</i>, 2010
Neuroprotectrice	Oleuropéine	Amélioration de la perméabilité de la barrière sang cerveau et l’œdème cérébral chez le rat	MOHAGHECHI <i>et al.</i>, 2011
	Tyrosol	Effet protecteur d’ischémie cérébrale transitoire chez les rats	VAUZOUR <i>et al.</i>, 2010

L’analyse chimique de la margine infiltrée dans les sols a montré que son acidité pouvait affecter les propriétés physiques et géotechniques de la couche argileuse et provoquer la

migration des polluants dans le sous-sol. Certains éléments toxiques tels que les phénols contenus dans ces margines, qui se localisent dans le sol, sont responsables de l'inhibition du développement des plantes et de certains micro-organismes (ZGHARI *et al.*, 2018). De plus, l'application des margines comme engrais organique qui contient principalement des fortes concentrations de carbone soluble et des acides conduit à la fixation de l'azote dans le sol et empêche son absorption par les plantes de même manière que les échanges cationiques du sol (LACOMELLI, 2000) entraînant la réduction de la productivité, la toxicité (PAIXAO *et al.*, 1999) et la phytotoxicité (GALLIUO *et al.*, 2018, KOMILIS *et al.*, 2005).

La décharge des margines dans les bassins d'évaporation à ciel ouvert, sur les terres ou dans les eaux naturelles et le traitement de ces effluents génère les processus de fermentation et l'émission de divers gaz, notamment le méthane, le dioxyde de carbone, le sulfure d'hydrogène et l'ammoniac (NIAOUNAKIS *et HALVADAKIS.*, 2004). Ces derniers provoquent le phénomène de contamination qui commence par le dégagement des odeurs nauséabondes même à grandes distances notamment lors du pressage des olives. Par conséquent, la pollution atmosphérique induite affecte négativement la santé humaine ainsi que le tourisme dans la région (EI-ABBASSI, 2014). Donc, les margines présentent une source de pollution pour l'environnement d'où la nécessité de leur traitement ou de leur valorisation. Dans ce contexte, ces effluents ont été l'objet d'une grande attention de la part des scientifiques, des entreprises et des organismes sociaux pour faire face à leur impact environnemental. Le but est d'étudier les meilleures stratégies et technologies de bonne valorisation ou d'éliminer le pouvoir polluant des margines.

A titre d'exemple, les technologies de traitement biologique des margines sont fondées sur les processus aérobie et anaérobie par l'utilisation des microorganismes présents depuis le départ dans l'olive (bactéries, champignons, levures) pour oxyder et décomposer les éléments organiques polluants comme le (CO₂) et le méthane (CH₄). Cependant, l'effet antioxydant des polyphénols reste le facteur limitant pour ces procédés (FOUNTOULAKIS *et al.*, 2002). Le but de ce travail est la valorisation des margines à travers les objectifs spécifiques suivants :

- Optimisation de différents types d'extractions.
- Dosage des fractions bioactives.
- Évaluation des activités biologiques à savoir : la capacité antioxydante totale (CAT) – test du piégeage du radical DPPH – Réduction du fer (FRAP) dans les fractions finales.

MATÉRIELS & METHODES

1. Échantillonnage

La margine utilisée dans cette expérimentation provient d'huilerie de Ouzidane située dans la région de « Tlemcen » lors de la campagne oléicole 2020/2021, (un procédé d'extraction moderne de centrifugation à 3 phases est utilisé). Une fois au laboratoire, les margines réceptionnées à l'état liquide ont été stockées au frais (4°C) jusqu'au moment de l'emploi pour éviter l'auto-oxydation d'échantillon et la polymérisation des composés phénoliques. En raison de sa forte teneur en humidité, le sous-produit liquide d'olive subit une étape préliminaire de séchage dans une étuve à $35 \pm 30^\circ\text{C}$. La margine obtenue est notée ci-après par MG séchée.



Photo 1 : Margine déshydratée (séchée)



Photo 2 : Margine brute

2. Optimisation des techniques d'extractions

Afin d'optimiser les techniques d'extraction vers de meilleurs rendements de fractionnement des margines brutes, des solvants de différentes polarités ont été utilisés à savoir : l'acétate d'éthyle, le n-butanol et le méthanol. Pour les margines déshydratées, sont utilisés des mélanges de solvants tels que MeOH/ED, ED/Acétonitrile/Acide formique.

3. Extraction des composés phénoliques des margines

3.1 Extraction des composés phénoliques à partir des margines brutes (Figures 2-3)

100 ml de margine est ajoutée à 100 ml d'hexane (Délipidation v/v), le mélange subit une agitation suivie d'une décantation pendant 30 min qui sépare la margine délipidée en deux phases filtrées (**Photos 2-3-4**) : le surnageant (l'hexane) et la phase aqueuse (margine) prêtes à une extraction liquide-liquide. Ce procédé est répété deux fois.

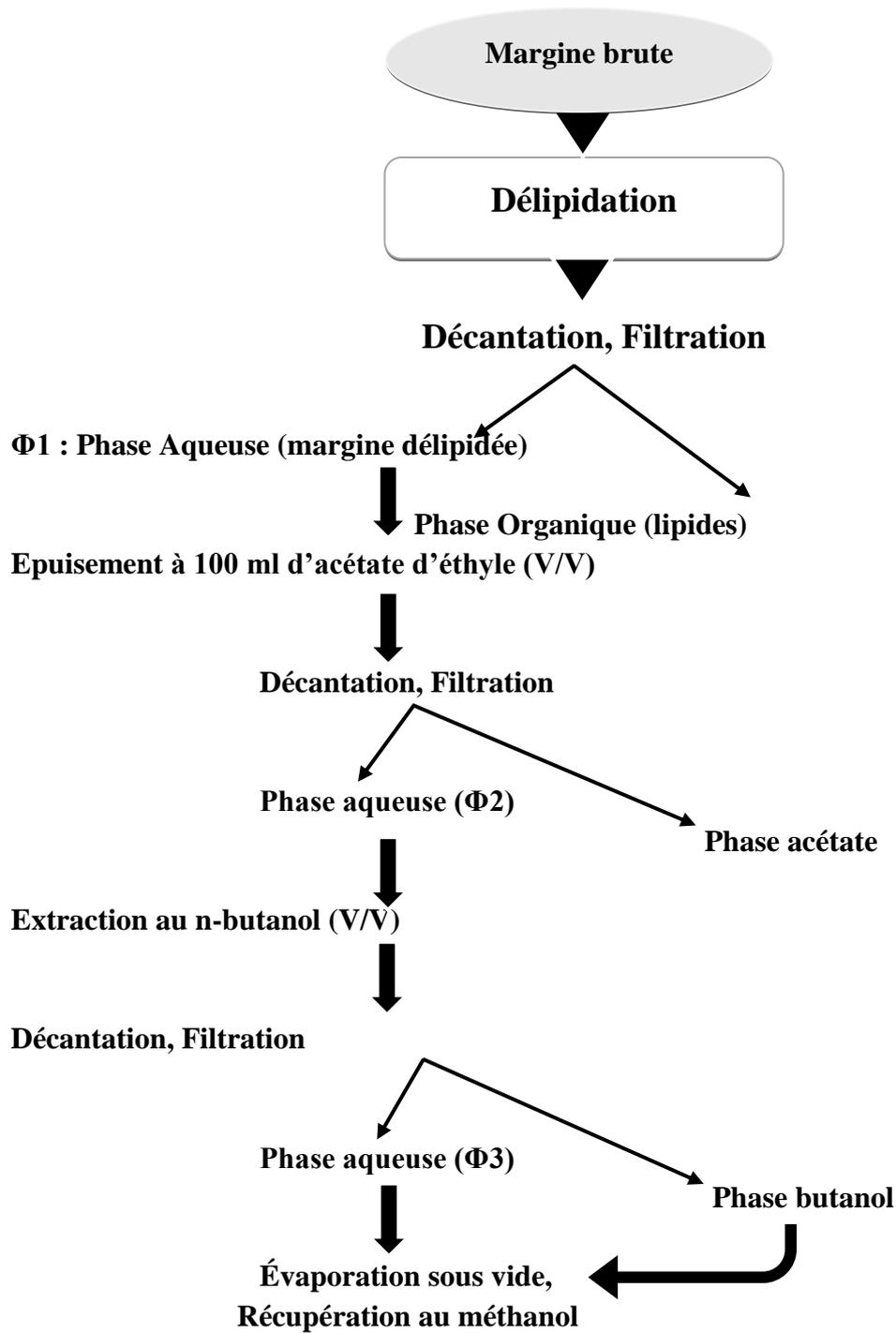


Figure 2 : Processus d'extraction 1 des polyphénols à partir des margines brutes.



Photo 3 : Phase acétate filtrée



Photo 4 : Phase butanol filtrée



Photo 5 : Évaporation sous vide des phases par un évaporateur rotatif

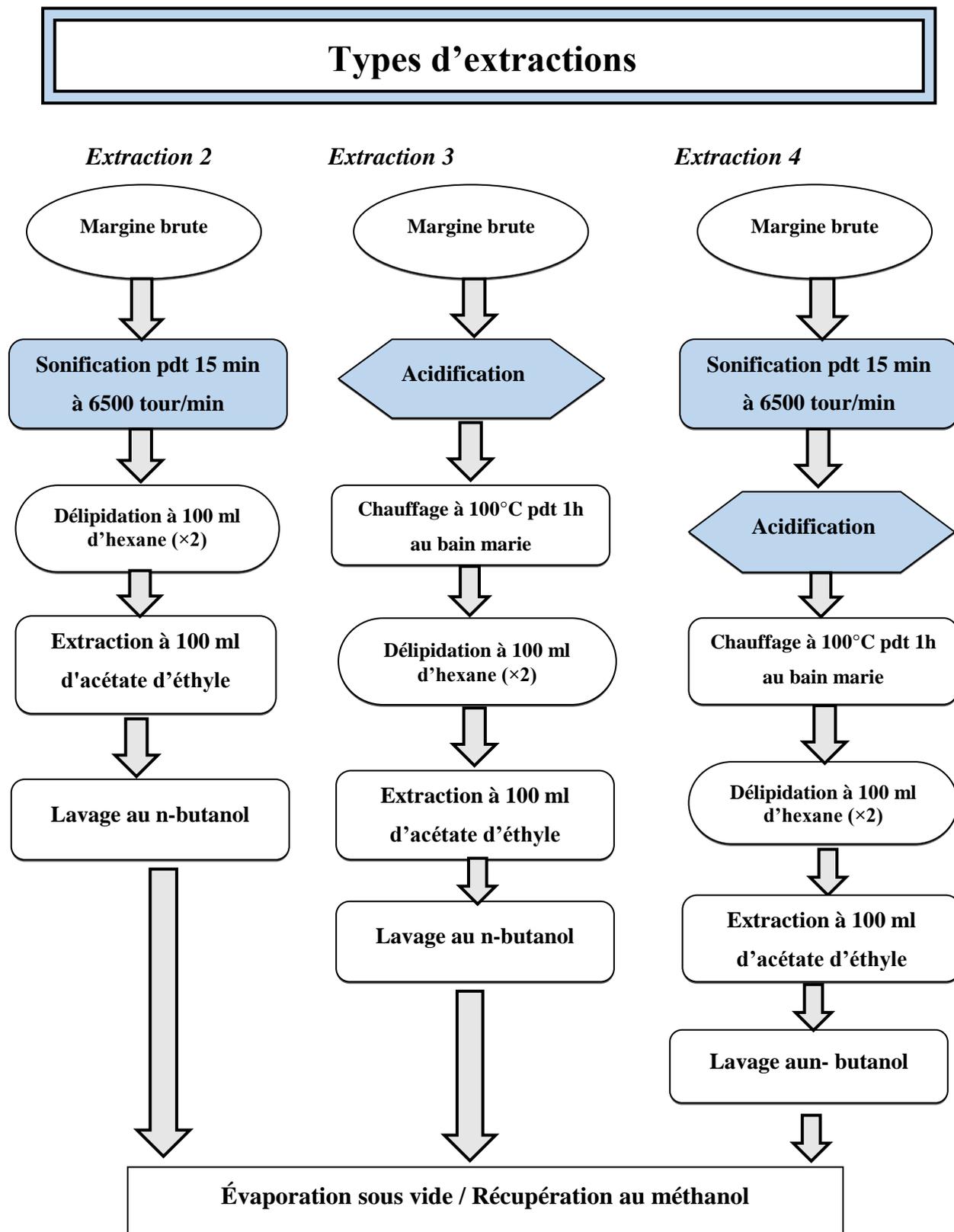


Figure 3 : Extractions 2, 3, 4 des composés phénoliques à partir des margines brutes (DE MARCO *et al.*, 2007) protocole optimisé.

L'extraction proprement dite est faite à 100 ml d'acétate d'éthyle additionnés à 100 ml de margine délipidée (v/v). L'ensemble est homogénéisé, séparé à l'aide d'une ampoule à décanter pendant 30 min en deux phases : l'acétate d'éthyle (surnagent) et le culot (margine), ce dernier subit un 2^{ème} lavage au butanol (v/v). Le mélange est agité puis décanté et filtré, chaque fraction est mise à évaporer sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif.

3.2 Extraction des polyphénols à partir des margines déshydratées (Figure 4)

La quantité de la margine (sous forme de pâte) : 10 g → 200 ml du mélange (MeOH/ H₂O).

Extraction par Méthanol / Eau (140ml / 60ml).

4. Analyse phytochimique

4.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été déterminé par le réactif de Folin -Ciocalteu selon la méthode de **SINGLETON et ROSSI. (1965)**. Le réactif est réduit lors de l'oxydation de phénol, dans un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène, l'absorption a été mesurée à 765nm.

➤ Mode opératoire

Une prise de 1000 µL du réactif du Folin-Ciocalteu dilué 10 fois est ajoutée dans chaque tube à essai dont 200 µL de l'extrait dilué a été introduite, puis 800 µL de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7.5% est ajouté. Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à une température ambiante pendant 30 min. La lecture est réalisée à 765 nm. Les résultats rapportés à une courbe d'étalonnage sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG /g MS).

4.2 Dosage des tannins totaux

Le dosage des tanins totaux est effectué en utilisant la réaction de **BATE – SMITH. (1954)** basée sur la propriété des proanthocyanidines à se transformer en anthocyanes colorées par chauffage à 100°C lors d'une hydrolyse acide en cassant les liaisons inter-flavanes (**RIBEREAU et STONESTREET. 1966**). Les différences d'absorbance sont mesurées à 550 nm par spectrophotométrie

➤ Mode opératoire

Dans 2 tubes à essai auxquels 2 ml de l'extrait dilué aux 20èmes fois est mise, 1 ml d'eau distillée et 3 ml d'HCl (12N) sont complétés. L'un des deux tubes est porté à 100°C au bain marie pendant 30 min et l'autre est gardé à l'obscurité durant le même temps. Ensuite, 5 ml d'éthanol a été ajouté dans chaque tube.

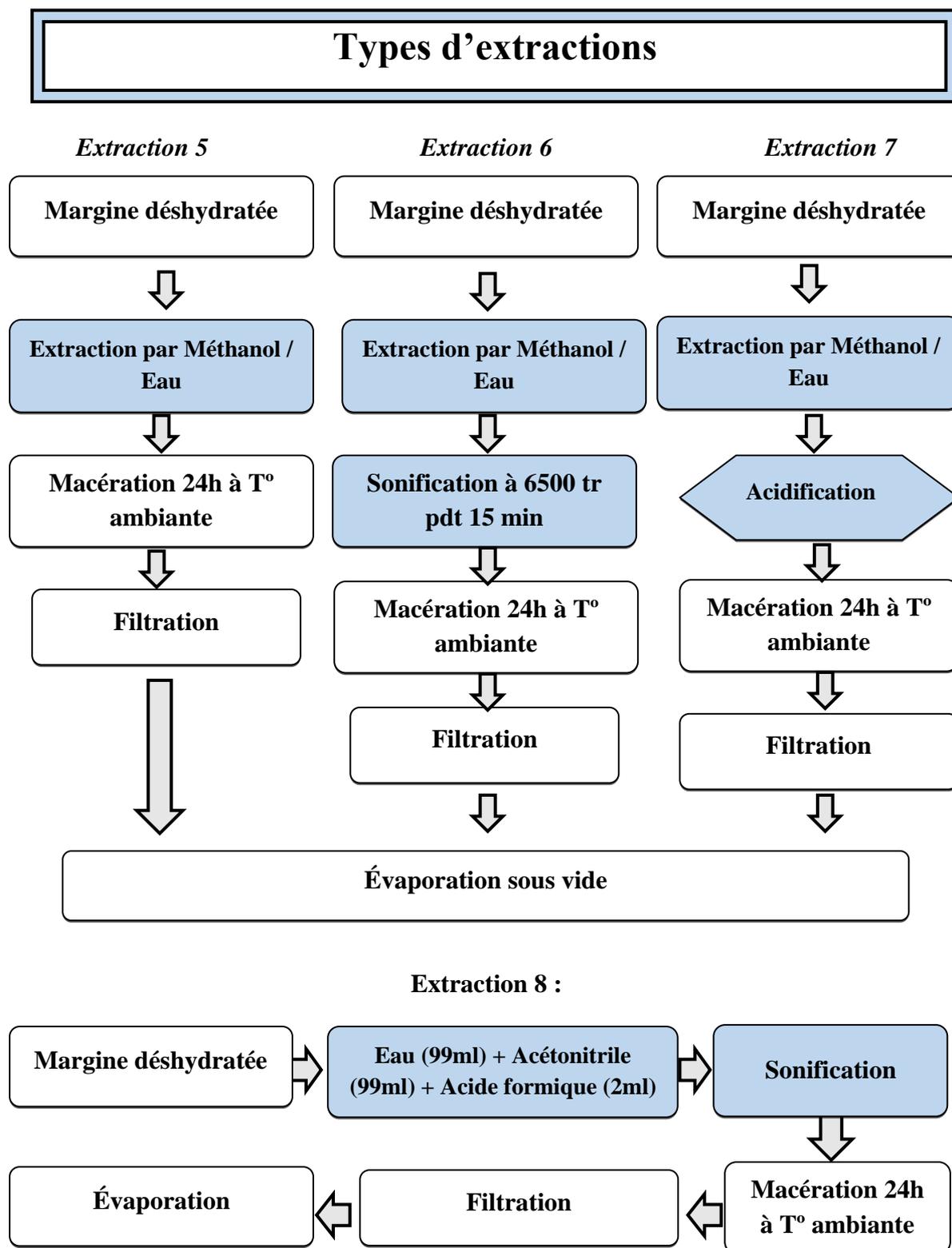


Figure 4 : Extractions 5, 6, 7, 8 des composés phénoliques à partir des margines déshydratées.

Pour finir, l'absorbance est mesurée à 550 nm dans une cuve avec un chemin optique de 1 cm. La teneur totale des tanins est donnée par la différence de DO entre le tube hydrolysé et le témoin par la relation suivante :

$$\text{Tanins totaux (g/L)} = 19.33 \times (\text{DO hydrolyse} - \text{DO témoin})$$

4.3 Dosage des tanins hydrolysables

Le rapport des tanins hydrolysables a été déterminé par le procédé de **MOLE et WATERMAN. (1987)**, basé sur la réaction avec le chlorure ferrique.

➤ Mode opératoire

Un volume de 1 ml de l'extrait est mélangé avec 3.5 ml de la solution de FeCl_3 (1.62 g dissout dans 0.01M de HCl). Ce mélange donne au complexe une coloration rouge violette d'où la formation des ions (Fe^{+3}). Après 15 secondes, l'absorbance a été mesurée à 660 nm dont les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalents d'acide gallique par gramme (g) de la matière sèche dès la courbe d'étalonnage (mg EAG/ g MS).

4.4 Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés est réalisé par la méthode décrite par **JULKUNEN T. (1985)**, basée sur la capacité de vanilline à réagir avec les tanins en présence d'HCl, l'absorbance est lue à 550 nm.

➤ Mode opératoire

Un mélange de 50 μL de l'extrait dilué avec 1500 μL de la solution vanilline/ méthanol (4%) est agité à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min à l'abri de la lumière. Ensuite, l'absorbance est mesurée à 550 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalents de la catéchine utilisée comme standard par gramme (g) de la matière sèche (mg EC/g MS).

4.5 Dosage des flavonols

Le dosage des flavonols a été réalisé en appliquant la méthode de **KUMARAN et al. (2007)**

➤ Mode opératoire

Une dose de 250 μL de l'extrait brut a été mélangée avec 1500 μL d'acétate de sodium (50 mg/ml), puis un volume de 250 μL de chlorure d'aluminium AlCl_3 (2 mg/ml) a été ajouté. Après l'homogénéisation, le mélange a été incubé à température ambiante pendant 150 min. L'absorbance a été lue à 440nm, les résultats sont exprimés en (mg) équivalents de quercétine par (g) du poids de la matière sèche (mg QE/g MS).

5. Étude de l'activité antioxydante

5.1 Capacité antioxydante totale (CAT)

La méthode de phosphomolybdène de **PRIETO et al. (1999)** a été effectuée pour examiner et déterminer quantitativement de la CAT de la margine.

➤ Mode opératoire

Un volume de 300 µL de l'extrait dilué a été ajouté à 3 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0.6M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes ont été fermés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide ascorbique comme standard. Les scores de la CAT sont exprimés en (mg) équivalents d'acide ascorbique par (g) de matière sèche (mg EAA/g MS).

5.2 Test du piégeage du radical libre DPPH

La préparation de la DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est effectuée par la dissolution de 0.25 mg du DPPH dans 1 ml d'éthanol. La préparation est gardée à l'abri de la lumière.

➤ Mode opératoire

Un volume de 50 µL de différentes dilutions (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml) de l'extrait est ajouté à 1950 µL de la solution éthanolique du DPPH nouvellement préparée. Après incubation à l'abri de la lumière pendant 30 min et à la température ambiante. La lecture des absorbances est effectuée à 515 nm dont l'acide ascorbique est utilisé comme standard antioxydant. En ce qui concerne la préparation du contrôle négatif, 50 µL d'éthanol et 1950 µL de la solution éthanolique du DPPH sont mélangés.

Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH sont calculés à partir de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (I \%)} = [(AC - AE) / AC] \times 100.$$

AC : exprime l'absorbance du contrôle négatif

AE : représente l'absorbance de l'échantillon.

5.3 Réduction de fer

Le pouvoir réducteur de l'échantillon a été déterminé selon la méthode d'OYAIZU (1986). Des dilutions au ½ (0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 mg/ml) ont été préparées.

➤ **Mode opératoire**

1250 µL d'une solution tampon (0.2 M, pH=6.6) est ajouté à 500 µL de chaque dilution, suivi par l'addition de 1250 µL de solution du ferricyanure de potassium [1% K₃[Fe (CN)₆]. Après une incubation à 50°C du mélange pendant 30 min, on rajoute 1250 µL d'acide trichloroacétique à 10 %. Une centrifugation à 3000 t/min a été réalisée pendant 10 min. Par la suite, on rajoute 1250 µL du surnagent mélangé avec 125 µL de l'eau distillée et 250 µL de solution FeCl₃ (à 0.1%) depuis peu préparée. L'absorbance a été déterminée à 700 nm dont l'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif. L'augmentation de l'absorbance dans le terrain indique l'augmentation de la réduction de fer.

La concentration EC₅₀, indiquée comme la concentration des antioxydants nécessaires à la réduction de 50% de la concentration primaire du ferricyanure de potassium, est un indice utilisé pour comparer le pouvoir réducteur de l'extrait par rapport au standard.

DISCUSSION

L'extraction des composés phénoliques des margines a permis leur obtention avec des rendements significatifs. Les résultats révélés ont montré la richesse en polyphénols, en tannins et en flavonols de l'extrait suscités obtenus par différents types d'extractions utilisant des solvants de polarités différentes. La fraction d'acétate d'éthyle reflète le pouvoir extracteur le plus puissant comparé aux autres solvants. Les résultats sont en accord avec ceux trouvés par **SOUILAH et al. (2021)**. Par ailleurs, les données de l'extraction 4 ont montré que la sonification suivie d'une acidification et la séparation ultérieure représentait la meilleure procédure pour la récupération des composés phénoliques. Ces données sont compatibles avec ceux obtenus par **RARES et al. (2019)**. Noter que le milieu acide favorise la rupture des liaisons des composés phénoliques, l'hydrolyse des phénols complexes en phénols simples et l'augmentation de leur solubilité dans le solvant organique (**DE MARCO et al. 2007**). Pour les autres extraits, les teneurs sont comparables à celles reportés par **KADI et al. (2020)** et **GUEBOUDJI et al. (2021)**. Donc les variabilités des teneurs en composés phénoliques sont dépendantes des modes d'extractions et de la polarité des solvants utilisés. En ce qui concerne les activités réalisées sur les extraits, la fraction acétate d'éthyle a révélé une capacité antioxydante totale moyenne et un pouvoir réducteur plus élevé que celui des autres extraits (n-butanol et méthanol). D'autre part, le pouvoir de piégeage du radical libre DPPH s'est révélé très élevé dans toutes les fractions. Ces résultats sont analogues à ceux publiés par **GUEBOUDJI^b et al. (2021)** et **El MOUDDEN et al. (2020)**.

Les propriétés bioactives des polyphénols présents dans les eaux résiduelles oléicoles peuvent être exploitées dans divers domaines tels que les sciences biomédicales et santé, la pharmaceutique, la technologie alimentaire, etc. Également, la récupération de ces fractions bioactives joue un rôle important dans la minimisation et/ou réduction des conséquences polluantes de l'environnement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les déchets oléicoles liquides appelés « margines » présentent une source dangereuse de pollution d'environnement pour les pays méditerranéens. Ces sous-produits issus de la production de l'huile d'olive sont difficiles à traiter à cause de leur composition en matières organiques d'où la nécessité de leur valorisation.

L'objectif primordial assigné par la présente étude englobe l'analyse phytochimique des margines et l'exploitation de leurs propriétés biologiques à savoir l'activité antioxydante.

Nos extractions ont permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires qui renferment les polyphénols, flavonols, tanins condensés, tannins Hydrolysables et les tannins totaux qui présentent un potentiel antioxydant marquant. Ces propriétés à vertus pharmacologique, biotechnologique, médicinales, des polyphénols présents dans les margines permettent la possibilité de leurs exploitations industrielles à plus larges spectres.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

AGGOUN M. A., 2016. Caractérisation de la composition en micro constituants des Margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez La vache laitière, thèse de doctorat de l'université, Frères Mentouri-Constantine, Algérie, pages 31,40.

AGGOUN M., ARHAB R., CORNU A., PORTELLI J., BARKAT M. and GRAULET B. 2016. Olive Mill Wastewaters microconstituants composition according to olive variety and extraction process. *Food Chemistry*, 209, 72–80.

AOUADI A., ARHAB R., 2020. L'effet des différentes proportions des margines "sous-produit oléicole liquide" sur la fermentation ruminale in vitro du foin de triticale.

ANGELONI C, MALAGUTI M, BARBALACE M .C, HRELIA S., 2017. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *International journal of molecular sciences*, 18 (11), 2230.

ARABLE CROPS AND OLIVE OIL (AGRIE.4). 2022. Market situation in the olive oil and table olive sectors. 2 June 2022.

BENYAHIA N et ZEIN K., 2003. Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et Solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Busines Associates (Suisse) (SBA) à Swiss Environmental Solutions for emerging Countries (SESEC II), 1-8.

BEN SASSI A, BOULARBAH A, WALKER G, BOUSSAID, A., 2006. A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process biochemistry*, 41(1), 74-78.

BRIANTE R., La CARA F., FEBBRAIO F., BARONE R., PICCIALI G., CAROLLA R., MAINOLFI P., De NAPOLI L., PATUMI M., FONTANAZZA G., NUCCI R., 2000. Hydrolysis of oleuropein by recombinant α -glucosidase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* immobilised on chitosan matrix. *Journal Biotechnology*, 77, 275–286.

CARRASCO A., CERRETANI L., BENDINI A., SEGURACARRETERO A., DEL CARLO M., GALLINA T., LERCKER G., COMPAGNONE D., GUTIERREZ A., 2005. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 8918–8925.

C.O.I. 2018. L'Algérie ratifie l'accord du C.O.I.

C.O.I. 2017. Marché oléicole. Newsletter, n° 121.

CUSHNIE T.P.T. & LAMB A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.

DEBOSREE G., 2015. Tannins from Foods to Combat Diseases, *International Journal of Pharma Research & Review* ; 4(5) :40-44.

DEIANA M., CORONA G., INCANI A., LORU D., ROSA A., ATZERI A., MELIS M. P., DESSI M.A., 2010. Protective effect of simple phenols from extra virgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3008–3016.

DE MARCO E., MARIA S., ANTONELLO P., RAFFAELE S., 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil Mill wastewaters. *Food Chem.*, 104 : 858–8.

D.S.A., 2021 : (Direction des services agricoles, Tlemcen).

EL-ABBASSI, A., KIAI H., RAITJ J., HAFIDI A., 2014. Application of ultrafiltration for olive processing wastewaters treatment. *J. Clean. Prod.* 2014 ; 65 : 432-438.

EL MOUDDEN H, EL IDRISSE Y, BELMAGHRAOUI W, BELHOUSSAINE O, EL GUEZZANE C, BOUAYOUN T, HARHAR, H, TABYAOU M., 2020. Olive mill wastewater polyphenol- based extract as a vegetable oil shelf life extending additive. *Food Processing and Preservation.* 44 (12) : 1-40.

FERNANDEZ M.J., 1983. Olives. In Rehm H.J., Reed G. (eds) *Biotechnology : food and feed production with microorganisms.* Verlag Chemie, Florida, pp,5, 379-397.

FIorentino A., Gentili A., ISIDORI M., MONACO P., NARDELLI A., PARELLA A., TEMUSSI F., 2003. Environmental effects caused by olive mill wastewaters : Toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *Journal of Agricultural Food Chem.*, 51,1005- 1009.

FOUNTOULAKIS M.S., DOKIANIS S.N., KORNAROS M.E., AGGELIS G.G, LYBERATOS G. 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Water Res.*, 36 (19), 4735-44.

GALLI E., TOMATI U. 2002. A Common policy to face the problem of olive oil mill wastes. In : *Proceedings of the 1. International Workshop on Environmental Problems in Olive Oil Production and Solutions*, 07-09 June 2002, Zeytinli/ Edremit, Balıkesir.

GALLIOU F., MARKAKIS N., FOUNTOULAKIS M.S., NIKOLAIDIS N., MANIOS T., 2018. Production of organic fertilizer from olive mill wastewater by combining Solar greenhouse drying and composting. *Waste Manage.* 2018 ; 75 :305-311.

GUEBOUDJI Z ^A., KADI K., NAGAZ K., 2021. Extraction and Quantification of Polyphenols of Olive Oil Mill Wastewater from the Cold Extraction of Olive Oil in the Region of Khenchela -Algeria.

GUEBOUDJI Z ^B., KADI K., NAGAZ K., 2021. Étude quantitative et activité antioxydante des molécules bioactives des effluents issues de l'extraction de l'huile d'olive.

GUEBOUDJI Z ^C., KADI K., NAGAZ K., ADDAD D., SECRAFI M., BENYAHYA L., LACHEHIB B., 2021. Phenolic compounds and biological activities of phenolic extract of olive oil mill wastewater issue from the cold extraction of olive oil from Khenchela (Algeria).

GUEBOUDJI Z., KADI K., MAHMOUDI M., HANNACHI H., NAGAZ K., ADDAD D., SECRAFI M., BENYAHYA L., LACHEHIB B., HESSINI K., 2022. Maceration and Liquid-liquid extractions of phenolic compounds and antioxidants from Algerian olive oil mill wastewater.

GRANADOS-PRINCIPAL S., QUILES J.L., RAMIREZ-TORTOSA C.L., OCHOA-HERRERA J., PEREZ-LOPEZ P., PULIDO-MORAN M. and RAMIREZ-TORTOSA M.C. 2012.Squalene ameliorates atherosclerotic lesions through the reduction of CD36 scavenger receptor expression in macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56 (5), 733-740.

HAMDI M. 1993. Futurs prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment : A review. *Bioprocess engineering*, 8(5-6), 209-214.

IBRAHIMOGLU., YILMAZOGLU M. 2018. Disposal of olive mill wastewater with DC arc plasma method. *Journal of Environmental Management*. 2018 ;217 : 727-734.

IMPELLIZERIE D., ESPOZITO E., MAZZOU E., PATERNITI I., DI PAOLA R., BRAMANTI P., MORITTU V. M., PROCOPIO A., BRITTI D., CUZZOCREA S., 2011. The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *Clinical Nutrition*, 30, 533–540

JULKUNEN T., 1985 « Phenolic constituents in the leaves of northern willows methods for the analysis of certain phenolics » *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 1985, Vol., page : 213.

KADI K, MRAH, R., HAMLI, S., LEKMINE, S., DIB, D., ADDAD, D., BOUKERIA, S., GUEBOUJJI, Z., HAFSAOUI, I., 2020. Evaluation of the anticoagulant activity of margins from olives extraction in the Khenchela region. *J. Fundam. Appl. Sci.* 12(2),634-649.

KHALATBARY A.R., AHMADVAND H., 2011. Effect of oleuropein on tissue myeloperoxidase activity in experimental spinal cord trauma. *Iran. Biomed. J.* 2011, 15, 164–167.

KHALATBARY A.R., AHMADVAND H., 2012. Neuroprotective effect of oleuropein following spinal cord injury in rats. *Neurol. Res.* 2012, 34, 44–51.

KAPELLAKIS I.E., TSAGARAKIS K.P., CROWTHER J.C. (2008). Olive oil history, production and By-product management. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7, 1-26.

KARRAY M.H., 2013. Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive : une voie prometteuse de la valorisation par la production de l'hydroxytyrosol naturel, thèse de doctorat de l'université de Sfax école nationale d'ingénieur de Sfax, Tunisie. : chapitre 4 la margine).

KOMILIS D.P, KARATZAS E., HALVADAKIS C.P. 2005.The effect of Olive Mill Wastewater on Seed Germination after Various Pretreatment Techniques. *J. Environ. Gérer.* 2005 ;74(4) :339-348.

KUMARAN A. KARUNAKARAN R. 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT – Food Science and Technology*, 40(2), 344–352.

LACOMELLI A. 2000. 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. Beirut –Lebanon, 4- 6 December.

LA SCALIA G., MICALE R., CANNIZZARO L. AND MARRA F. P. 2017. A Sustainable phenolic compound extraction system from olive oil mill wastewater. Journal of cleaner production.

MOHAGHEGH F., BIGDELI M. R., RASOULIAN B., HASHEMI P., Pour M. R., 2011. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood–brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomedicine*, 18, 170–175.

MOLE S., WATERMAN P.G. 1987 A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. *Oecologia* 72, 148–156 (1987).

MORILLO J. A., ANTIZAR B., MONTEOLIVA S.M., CORMENZANA R.A., RUSSEL N. J. 2008. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology Biotechnology*, 82 : 25–39.

NADOUR M., 2015. Extraction, caractérisation des polysaccharides et des polyphénols issus des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides à visée alimentaire, thèse de doctorat de l’université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie, pages 40.

NAKBI A., DABBOU S., CHAMPION S., FOUCHIER F., MEHRI S., ATTIA N., LEGER C., HAMMAMI M., 2011. Modulation of the superoxide anion production and MMP-9 expression in PMA stimulated THP-1 cells by olive oil minor components : Tyrosol and hydroxytyrosol. *Food Research International*, 44, 575–581.

NEFZAOUI A., 1991. Valorisation des sous-produits de l’olivier. In : Tisserand J.-L. (ed.), Alibés X. (ed.). *Fourrages et sous-produits méditerranéens*. Zaragoza : CIHEAM, P. 101-108 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n. 16).

NIAOUNAKIS M., HALVADAKIS CP., 2004. Olive mill waste management. Literature Review And Patent Survey. *Typhitho - George Dardanos*. Athens, Greece, pp xiv, 430.

Omar S. H., 2010. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18, 111–121.

OUABOU J. Biosci A. 2014. Traitement de la margine brute d’huile d’olive par distillation Suivi de neutralisation par chaux.

OYAIZU M. 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315.

PAIXAO S.M., MENDONCA E., ANSELMO A.M. 1999. Acute toxicity evaluation of olive oil mill wastewaters : A comparative study of three aquatic Organisms. *Environ Toxicol*. 1999 ;14(2) :263-269.

PARASKEVA P, DIAMADOPOULOS E. 2006. Technologies for olive mill wastewater (OMW) Treatment : A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 1475-1485.

PENG Y., HOU C., YANG Z., JIA L., LIU J., TANG Y., SHI L., LI Y., LONG J., 2016. Hydroxytyrosol mildly improve cognitive function independent of APP processing in APP/PS1 mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016, 60, 2331–2342.

PRIETO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M. 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex : Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341.

RARES I.B, WILDE P, WALDRON K.W, DILIP K.R., 2019. Recovery of Polyphenols from Brewer's Spent Grains.

RIBÉREAU G.P. et STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.*, 48, 188-196.

ROBLES M., PULIDO M., MORENO F.J., TORTOSA R.C., GARCIA R.C., QUILES J.L. TORTOSA R.M.C. 2018. Hydroxytyrosol : Bioavailability, toxicity, and Clinical applications. *Food Research International*, 105, 654-667.

RODIS P.S., KARATHANOS V.T. and MANTZAVINO A. 2002. Partitioning of Olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (3), 596- 601.

SCHMAUCH G., 2010. Interactions tanins-protéines en œnologie. *Ingénierie des aliments.* Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2). Français. Fftel-02824147ff.

SIERRA J., MARTI E., MONTSERRAT G., CRUANAS R., GARAN M. A., 2001. Characterisation and Evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *Sci Total Environ*, 279, 207-214.

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

SOUILAH N, BELATTAR B, BENDIF H., 2021. Biochemical properties and in vitro activities of extracts from two Asteraceae endemic species wild (Algeria).

URSINOS J.A., BORJA R. 1992. Use and treatment of olive mill wastewater : Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*, 2 : 101-106.

VAUZOUR D., CORONA G., SPENSER J.P., 2010. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, 501, 106–111.

VISIOLI, F., ROMANI, A., MULINACCI, N., ZARINI S, CONTE. D, VINCIERI, F.F., & GALLI, C. 1999. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3397–3401.

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

ZGHARI B., BENYOUCEF F., BOUKIR A., 2018. IMPACT ENVIRONNEMENTAL DES MARGINES SUR LES EAUX D'OUED OUSSEFROU : CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET EVALUATION PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CPG-SM).

ZHU L., LIU Z., FENG Z., HAO J., SHEN W., LI X., SUN L., SHARMAN E., WANG Y., WERTZ K., WEBER P., SHI X., LIU J., 2010. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase I detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 1089–1098.

الملخص

تنتج عملية إنتاج زيت الزيتون كمية كبيرة من المخلفات السائلة تسمى المياه النباتية، وهي النفايات الضارة الرئيسية لهذه الصناعة. تمثل هذه المخلفات المهمة مشكلة تلوث بيئي مهمة في مناطق البحر الأبيض المتوسط وواحدة من أصعب النفايات للمعالجة. من ناحية أخرى، تعد هذه المنتجات الثانوية مصادر واعدة للمركبات النشطة بيولوجيًا. اشتملت هذه الدراسة على قياس المركبات الفينولية وهي متعدد الفينول والعفص والفلافونول، ثم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المياه النباتية باستخدام ثلاث اختبارات: القدرة الكلية المضادة للأكسدة، وكسح الجذور الحرة DPPH وتقليل الحديد. تظهر النتائج المذهلة ثراء المياه النباتية في متعدد الفينول، العفص المكثف، العفص القابل للتحلل المائي، العفص الكلي والفلافونول مع خصائص مضادة للأكسدة ملحوظة.

الكلمات المفتاحية: المياه النباتية - التلوث - المركبات الفينولية - العفص - الفلافونول - الأنشطة المضادة للأكسدة.

RESUME

Le processus de production d'huile d'olive génère une quantité considérable des résidus liquides appelés margines, principaux déchets nuisibles de cette industrie. Cet important résidu représente un problème de pollution environnementale important dans les régions méditerranéennes et l'un des déchets les plus difficiles à traiter. En revanche, ces sous-produits sont des sources prometteuses de composés bioactifs.

Cette étude consistait à doser les composés phénoliques à savoir les polyphénols, les tanins et les flavonols ensuite à évaluer les activités antioxydantes des margines à l'aide de trois tests : la capacité antioxydante totale, le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer. Les résultats marquants montrent la richesse des margines en polyphénols, tanins condensés, tanins hydrolysables, tanins totaux et flavonols avec des propriétés antioxydantes remarquables.

Mots clés : Margine – pollution - composés phénoliques – tanins – flavanols- activités antioxydantes.

ABSTRACT

The olive oil production process generates a considerable quantity of liquid residues called margins, the main harmful waste of this industry. This important residue represents an important environmental pollution problem in the Mediterranean regions and one of the most difficult wastes to treat. On the other hand, these by-products are promising sources of bioactive compounds.

This study consisted of measuring the phenolic compounds, namely polyphenols, tannins and flavonols, then evaluating the antioxidant activities of the vegetable waters using three tests: the total antioxidant capacity, the trapping of the free radical DPPH and iron reduction. The striking results showed the richness of margins in polyphenols, condensed tannins, hydrolysable tannins, total tannins and flavonols with remarkable antioxidant properties.

Key words: Margin - pollution - phenolic compounds – tannins – flavonols - antioxidant activities.