

République Algérienne Démocratique et Populaire  
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Université Abou bekr Belkaid – Tlemcen  
جامعة أبو بكر بلقايد تلمسان  
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

**M<sup>lle</sup> Laissouf Mira Dalal**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

**En Sciences Biologiques**

**Option : Biochimie Appliquée**

## Thème

**Screening phytochimique et évaluation *in vitro* de l'activité  
antioxydante et antidiabétique des sous-produits des olives : Grignon  
et margine**

Soutenu le 14 /07/ 2024, devant le jury composé de :

<b>Président</b>	<b>Dr. Chaouche M.T.</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Tlemcen</b>
<b>Examineur</b>	<b>Dr. Medjdoub H.</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Tlemcen</b>
<b>Examineur</b>	<b>Dr. Merghache D.</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Tlemcen</b>
<b>Encadreur</b>	<b>Pr. Benariba N.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Tlemcen</b>

**Année universitaire 2023 – 2024**

## المخلص

يعتبر تصريف النفايات السائلة الناتجة عن الصناعات المنتجة لزيت الزيتون مثل ثفل الزيتون والزيتون النباتية مشكلة تلوث في دول حوض البحر الأبيض المتوسط. يساهم استغلال الجزيئات النشطة بيولوجيا في استدامة قطاع نفايات الزيتون، وبالتالي تقليل تأثيره البيئي وتعزيز تطوير تركيبات مبتكرة للتطبيقات الصيدلانية والغذائية ومستحضرات التجميل. الهدف من هذه الدراسة هو التوصيف الكيميائي النباتي وكذلك التقييم المخبري للنشاط المضاد للأوكسدة والمضاد لمرض السكر للمنتجات الثانوية لمعصرة زيت الزيتون والثفل (الطازج والمجفف) والزيت النباتي (الأسود والبنّي المسترد من). معصرة الزيتون في منطقة صبرا.

كشف الفحص الكيميائي النباتي لمستخلصات الماء والإيثانول (80/20) من الثفل الطازج والمجفف، ولأجزاء أسيتات الإيثيل والبيوتانول المستخرجة من الزيوت النباتية السوداء والبنية، عن ثراء المستخلصات بالمركبات الفينولية، على وجه الخصوص. جزء خلاص الإيثيل من الزيت النباتي البني. يتراوح مستوى إجمالي البوليفينول والفلافونويدات في هذه المستخلصات بين 638.92 ميكروجرام و68.07 ميكروجرام EAG/mg Es، وبين 78.13 ميكروجرام و4.38 ميكروجرام EC/mg Es. بالإضافة إلى ذلك، فهي تحتوي على مستوى عالٍ من العفص المكثف والذي يتراوح بين 917.29 ميكروجرام و52.90 ميكروجرام EC/مجم Es.

كشفت النتائج التي تم الحصول عليها فيما يتعلق بنشاط مضادات الأوكسدة عن وجود تأثير مضاد للجذور على DPPH وقوة تقليل محفز الحديد لجميع المستخلصات، وخاصة مستخلصات زيت الزيتون البني والأسود وأجزاء خلاص الإيثيل. تتراوح قيم IC50 المحددة لـ DPPH بين 0.402 ميكروجرام/مل و3.21 ميكروجرام/مل مقارنة بـ 8.19 ميكروجرام/مل إلى 14.11 ميكروجرام/مل لمستخلصات الماء والإيثانول من الثفل الطازج والمجفف. بالنسبة لاختبار FRAP، تتراوح قيم IC50 المحددة بين 7.47 ميكروجرام/مل و312.5 ميكروجرام/مل.

أظهر النشاط المضاد لمرض السكر الذي تم تقييمه في المختبر على الأميليز ألفا وعلى قدرة امتصاص الجلوكوز تأثيرًا مثيرًا للاهتمام على مستخلصات الزيوت النباتية مقارنة بمستخلصات الثفل، ولا سيما أجزاء أسيتات الإيثيل من الزيت النباتي، والتي تتراوح قيم IC50 فيها بين 0.232 ميكروجرام/مل إلى 4.99 ميكروجرام/مل مقارنة بمستخلصات الماء والإيثانول من الثفل الطازج والمجفف الذي يحتوي على IC50 من 1.50 ميكروجرام/مل إلى 7.58 ميكروجرام/مل. بالإضافة إلى ذلك، أظهر جزء خلاص الإيثيل من الزيت النباتي البني، بعد 3 ساعات من الحضانة مع تراكيز مختلفة من الجلوكوز (5، 10، 50، 100 ملم) قدرة امتصاص عالية للجلوكوز أعلى بكثير من المستخلصات الأخرى، تقدر بـ 16.29 ملم / ز استخراج. وهذا التأثير مشابه لتأثير حمض الجالليك (17. ملليمولار/جرام من حمض الجالليك).

يمثل تثمين نفايات الزيتون فرصة مثيرة للتنمية الصناعية المستدامة والتنافسية.

**الكلمات المفتاحية:** ثفل الزيتون والهامش، المركبات الفينولية، مضادات الأوكسدة، مضاد لمرض السكر

## Résumé

Le rejet des effluents des industries productrices d'huile d'olive tels que les grignons d'olives et les margines pose un problème de pollution dans les pays du Bassin Méditerranéen. L'exploitation des molécules bioactives contribue à la durabilité du secteur des déchets d'olives, réduisant ainsi son impact environnemental et favorisant le développement de formulations innovantes pour des applications pharmaceutiques, nutraceutiques et cosmétiques.

L'objectif de la présente étude porte à la caractérisation phytochimique ainsi que l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et antidiabétique des sous-produits des huileries d'olive, le grignon (frais et séché) et le margine (noir et marron) récupérés de l'huilerie de la région de Sebra.

Le screening phytochimique des extraits eau-éthanol (20/80) du grignon frais et séché, et des fractions acétate d'éthyle et n-butanol récupérés du margine noire et marron, ont révélé la richesse des extraits en composés phénoliques, en particulier la fraction acétate d'éthyle du margine marron. Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans ces extraits est variable entre 638,92 $\mu$ g et 68,07  $\mu$ g EAG/mg Es, et entre 78,13 $\mu$ g et 4,38 $\mu$ g EC/mg Es. De plus ils présentent un taux important de tannins condensés qui varie entre 917,29 $\mu$ g et 52,90 $\mu$ g EC/mg Es.

Les résultats obtenus concernant l'activité antioxydante ont révélé un effet antiradicalaire sur le DPPH et un pouvoir réducteur du fer promoteur pour l'ensemble des extraits, en particulier les extraits de margine d'olive marron et noire, et leurs fractions acétate d'éthyle. Les valeurs de IC<sub>50</sub> déterminées pour le DPPH sont variables entre 0,402 $\mu$ g/ml et 3,21  $\mu$ g/ml contre 8,19  $\mu$ g/ml à 14,11  $\mu$ g/ml pour les extraits eau-éthanol de grignon frais et séché. Pour le test de FRAP, les valeurs de IC<sub>50</sub> déterminés varient entre 7,47 $\mu$  g/ml et 312,5  $\mu$ g/ml.

L'activité antidiabétique évaluée *in vitro* sur l' $\alpha$ -amylase et sur la capacité d'adsorption au glucose a montré un effet intéressant des extraits de margine par rapport aux extraits du grignon, en particulier les fractions acétate d'éthyle du margine, dont les valeurs de IC<sub>50</sub> varient entre 0,232 $\mu$ g/ml à 4,99  $\mu$ g/ml par rapport aux extraits eau-éthanol de grignons frais et séché qui présentent des IC<sub>50</sub> de 1,50  $\mu$ g/ml à 7,58  $\mu$ g/ml. De plus, la fraction acétate d'éthyle du margine marron, après 3h d'incubations avec différentes concentrations de glucose (5, 10, 50, 100 mM) a présenté une haute capacité d'adsorption au glucose nettement supérieur aux autres extraits, estimée à 16,29mM/g Extrait. Cet effet est comparable à l'effet de l'acide gallique (17,75 mM/g Ac. Gallique).

La valorisation des déchets d'olive représente une opportunité stimulante pour le développement industriel durable et compétitif

**Mots clés :** Grignon et Margine d'olive, composés phénoliques, antioxydant, antidiabétique

## Abstract

The discharge of effluents from olive oil-producing industries such as olive pomace and vegetable oils poses a pollution problem in the countries of the Mediterranean Basin. The exploitation of bioactive molecules contributes to the sustainability of the olive waste sector, thus reducing its environmental impact and promoting the development of innovative formulations for pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic applications.

The objective of the present study is the phytochemical characterization as well as the *in vitro* evaluation of the antioxidant and antidiabetic activity of the by-products of olive oil mills, pomace (fresh and dried) and vegetable oil (black and brown). Recovered from the oil mill in the Sebra region.

The phytochemical screening of the water-ethanol extracts (20/80) of fresh and dried pomace, and of the ethyl acetate and n-butanol fractions recovered from black and brown vegetable oil, revealed the richness of the extracts in phenolic compounds, in particular the ethyl acetate fraction of brown vegetable oil. The level of total polyphenols and flavonoids in these extracts varies between 638.92  $\mu\text{g}$  and 68.07  $\mu\text{g}$  EAG/mg Es, and between 78.13  $\mu\text{g}$  and 4.38  $\mu\text{g}$  EC/mg Es. In addition, they have a high level of condensed tannins which varies between 917.29  $\mu\text{g}$  and 52.90  $\mu\text{g}$  EC/mg Es.

The results obtained concerning the antioxidant activity revealed an anti-radical effect on DPPH and a reducing power of the iron promoter for all the extracts, in particular the extracts of brown and black olive oil, and their ethyl acetate fractions. . The IC<sub>50</sub> values determined for DPPH vary between 0.402  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 3.21  $\mu\text{g}/\text{ml}$  compared to 8.19  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 14.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the water-ethanol extracts of fresh and dried pomace. For the FRAP test, the IC<sub>50</sub> values determined vary between 7.47  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 312.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

The antidiabetic activity evaluated *in vitro* on  $\alpha$ -amylase and on the glucose adsorption capacity showed an effect of interest on vegetable oil extracts compared to pomace extracts, in particular the ethyl acetate fractions of vegetable oil, of which the IC<sub>50</sub> values vary between 0.232  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to 4.99  $\mu\text{g}/\text{ml}$  compared to water-ethanol extracts of fresh and dried pomace which have IC<sub>50</sub>s of 1.50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to 7.58  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In addition, the ethyl acetate fraction of brown vegetable oil, after 3 hours of incubation with different concentrations of glucose (5, 10, 50, 100 mM) presented a high glucose adsorption capacity significantly higher than the other extracts, estimated at 16.29 mM/g Extract. This effect is comparable to the effect of gallic acid (17.75mM/g Ac. Gallic).

The valorization of olive waste represents an exciting opportunity for sustainable and competitive industrial development.

**Keywords:** Olive pomace and margin, phenolic compounds, antioxidant, antidiabetic

# *Dédicaces*

*Avec l'aide de Dieu le tout puissant qui m'a éclairé*

*Les chemins du savoir, j'ai pu réaliser ce modeste*

*Travail que je dédie à*

*Mes chers parents :*

***À ma très chère mère***

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

***À mon cher père***

*Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consenti pour mon éducation et ma formation*

***À mes chères sœurs***

*« Ahlem, Hanane, Assia et Amina »*

*ma grande mère **HBIBA** , que dieu lui donne long vie et bon santé*

***À mes nièces et neveux***

*Anes Ines Maissa Iyad Ilyes Miral Et Adem*

***À tous ceux qui me sont chers ma famille et mes amies***

*Pour leur amour, soutien et encouragements, qui m'ont soutenue et sur tout m'ont supporté au moment difficile, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout-puissant, vous protège et vous garde*

*Merci à tout*

**Mira DALEL**

# Remerciements

*Mes vifs et chaleureux remerciements s'adressent à mon encadrant **Mme BENARIBA Nabila**, Professeur à l'université de Tlemcen, que j'estime énormément, pour les conseils qu'elle m'a prodigués, ses encouragements, son encadrement, sa disponibilité, et pour m'avoir écouté et soutenu tout le long de ce travail. J'ai eu le grand honneur de travailler avec vous. Que vous trouvez ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.*

*Nous remercions chaleureusement les membres de jury, qui nous ont fait l'honneur de bien vouloir examiner et évaluer avec attention ce travail :*

***M<sup>r</sup>Chaouche Mohammed Tarik**, Maitre de Conférences A, et chef du département de biologie, Faculté SNV-STU à l'Université Abou BekrBelkaïd-Tlemcen, de m'avoir enseigné durant mon cursus, et de m'avoir fait honneur de présider le jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon grand respect.*

***M<sup>me</sup> Medjdoub Houria**, Maitre de Conférence A, à la faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, de m'avoir enseigné durant mon cursus, et d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je vous exprime mes sincères remerciements.*

***M<sup>me</sup> Merghache Djamila**, Maitre de conférences A, à la faculté SNV-STU, université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je vous exprime mon grand respect.*

Je remercie toutes personnes ayant contribuées à la réalisation de ce travail et surtout aux responsables des laboratoires **Mr Habi et Mme Zazoua**

Nos sincères remerciements s'adressent à **Mlle Fekhikher Z. et Mme BrixiGormat R.** doctorantes en biochimie pour leur aide, leur gentillesse et leurs précieux conseils au cours de la réalisation de la partie expérimentale du travail.

***Mira dalel***

# Table des matières

Introduction .....	1
Synthèse bibliographique .....	3
I. L'olivier .....	3
1. Description de l'olivier.....	3
1.2. La production et le secteur oléicole Algérien .....	4
1.3. Procédés d'extraction d'huile d'olive.....	5
II. Les principaux sous- produits de l'oléiculture.....	6
1. Grignons d'olive.....	6
1.1. Définitions et type de grignon .....	6
1.2. Composition chimique dugrignond'olive.....	6
1.3 Valorisation de grignons d'olive.....	10
1.1.4. Application écologique du grignon d'olive .....	11
1.1.5. Application industrielle dugrignon d'olive.....	12
1.1.6. Application cosmétique de composés phénoliques présents dans le grignon d'olive .....	12
1.1.7. Travaux alimentaires sur le grignon d'olive .....	12
2.1. Composition chimique des margines.....	14
2.2. L'incorporation d'extraits phénoliques du margine et des dérivés d'olive dans les aliments.....	15
2.3. Problématique environnementale générée par les margines.....	17
III. Les composés phénoliques du grignon et du margine .....	19
.1. les composés phénoliques de grignon d'olive .....	19
Matériel et Méthodes.....	24
I. Objectif .....	24
1. Partie Phytochimique .....	25
1.1. Matériel végétal.....	25
2. Extractions.....	25
2.1. Préparation de l'extrait eau-éthanol de grignons frais et séché.....	25
2.2. Fractionnement du margine .....	26
3. Rendement des extraits.....	26
4. Phytoscreening .....	27
5. Dosage des composés phénoliques.....	28
5.1. Dosage de polyphénols totaux.....	28
5.2. Dosage de flavonoïdes.....	29
5.3. Dosage des tanins condensés.....	31
II. Partie tests biologiques .....	32
1. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de grignon et de margine d'olive.....	32
1.1. Test de piégeage du radical DPPH .....	32

1.2.Pouvoir réducteur de fer (FerricReducing Power ; FRAP) par les extraits du grignon et du margine	34
2.Evaluation de l'activité antidiabétique des extraits de grignon et margine.....	35
2.1.Evaluation de l'effet des extraits sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.....	35
2.2.Evaluation in vitro de la capacité d'adsorption des extraits au glucose .....	36
III.Analyse statistique.....	38
Résultats et Interprétation.....	39
I.Rendement et caractéristiques des extraits de grignon et de margine d'olive.....	39
II.Screeningphytochimiques .....	39
1.Taux de composés phénoliques dans les extraits du grignon et du margine d'olive .....	41
III.Activité antioxydante des extraits de grignon et margine d'olive .....	42
1.Effet des extraits de grignon et margine sur le piégeage de radical libre DPPH.....	42
2.Effet des extraits dugrignon et du margine d'olive sur la réduction du Fer (FRP).....	45
IV.Effet antidiabétique des extraits du grignon et du margine d'olive .....	48
1.Effet des extraits sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase .....	48
2.Effet d'adsorption au glucose des extraits du grignon et du margine d'olive .....	51
Discussion .....	54
Conclusion.....	62
Références bibliographiques .....	63
Annexes.....	77



## Liste des Figures

Figure n°1 : répartition de la superficie d'olivier .....	4
Figure n°2 : Schéma des différents procédés de production d'huile d'olive, (a) procédé à presses, (b) procédé à trois phases, (c) procédé à deux phases (El-Abbassi.,2013).....	5
Figure n°3 : Différentes filières de valorisation des grignons d'olives (Ajmia et Chouchen, 2010).....	11
Figure n°4 : Applications des grignons d'olive pour des produits à haute valeur ajoutée dans l'alimentation et l'emballage (Difonzo <i>et al.</i> ,2021) .....	13
Figure n° 5: Valorisation biotechnologique du margine et du grignon (Dermeche.,2020) .....	17
Figure n°6 : Conséquences environnementales des rejets du margine dans le milieu naturel .	18
Figure n°7: Structures chimiques des principaux composés phénoliques présents dans le Grignon d'olive (Malapert <i>et al.</i> ,2018 ; Abbattista <i>et al.</i> , 2021 ; Madureira <i>et al.</i> ,2022).....	20
Figure n° 8 : Propriétés biologiques de l'hydroxytyrosol(Robles-Almazán <i>et al.</i> , 2017).....	22
Figure n° 9:(A) : Grignons frais, (B) : Grignons séché, (c) : margine noire, (D) : margine marron .....	25
Figure n° 10 : Extraction solide-liquide (décoction) du grignon d'olive dans eau-éthanol (20/80) .....	25
Figure n° 11 : organigramme explicatif des extractions.....	26
Figure n° 12 : Courbe étalonnage de l'acide gallique pour le dosage de polyphénols .....	41
Figure n° 13 : Courbe étalonnage de catéchines pour dosage de flavonoïdes (A) et dosage de Tanins (B).....	41
Figure n°14 : Effet antioxydant de l'acide ascorbique sur la réduction du DPPH exprimé en	43
Figure n° 15 : Les valeurs de IC50 déterminées pour l'acide ascorbique et les extraits de grignons et margine d'olive.....	45
Figure n° 16 : Effet du l'acide ascorbique du BHA sur la réduction du fer .....	46
Figure n° 17 : Valeurs de EC50 de l'effet de BHA et l'acide ascorbique des extraits de grignons et margines sur la réduction du fer (FRAP) .....	48
Figure n° 18 : Effet d'acarbose sur l'inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -amylase exprimé en pourcentage .....	49
Figure n° 18: Valeurs de IC50 de de l'effet des extraits du grignon et du margine d'olive et l'acarbose sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.....	51
Figure n° 19 : La capacité d'adsorption au glucose des extraits du grignon et du margine	

d'olive après 1h d'incubation..... 52

Figure n° 20 : La capacité d'adsorption au glucose des extraits du grignon et du margine

d'olive après 3h d'incubation..... **Error! Bookmark not defined.**

## Liste des Tableaux

Tableau n°1 : Composition chimique des grignons d'olives.....	7
(Medouni-Haroune <i>et al.</i> , 2018).....	7
Tableau n°2 : Les différentes formes de vitamine E présentes dans le grignon d'olive. ....	8
Tableau n°3 : La composition en acides gras du grignon d'olive, exprimée en pourcentage relatif.....	8
Tableau n°4 : Composition chimique des poudres de grignon d'olive (g/kg de matière sèche (Ribeiro <i>et al.</i> , 2021). ....	9
Tableau n°5 : Composition en matières organiques des margine (Zbakh et El abbassi, 2012).14	
Tableau n°6 : La composition en tocophérols dans les margine d'olive selon la variété d'olive et la méthode d'extraction de l'huile (Aggounet <i>et al.</i> ,2016). ....	15
Tableau n°7 : Activités biologique de certains composés phénoliques du grignon d'olive (Zbakh et Elabbassi, 2012 ; Gorzynik–Debicka <i>et al.</i> , 2018). ....	23
Tableau n°8 : Protocole du dosage de polyphénols dans les extraits du grignon et du margine d'olive.....	29
Tableau n°9 : Protocole du dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits du grignon et du margine d'olive.....	30
Tableau n°10 : Protocole du dosage des tanins condensés dans les extraits du grignon et du margine d'olive.....	31
Tableau n°11 : Mode opératoire du test de piégeage du radical DPPH par les extraits du grignon et du margine d'olive0 .....	33
Tableau n°12 : Mode opératoire pour évaluer le pouvoir réducteur du fer par les extraits du grignon et du margine d'olive. ....	34
Tableau n°13 : Evaluation de l'effet des extraits de grignon et du margine d'olive sur l'activité de l' $\alpha$ amylase. ....	36
Tableau n°14 : Mode opératoire de test in vitro de la capacité d'adsorption au glucose des extraits de grignon et margine d'olive.....	37
Tableau n°15 : Rendement et caractéristiques des extraits de grignon et de margine d'olive. ....	39
Tableau n°16 : Criblage phytochimiques des différents extraits de grignon et margine.....	40
Tableau n°17 : Taux composés phénoliques dans les extraits du grignon et du margine d'olive.....	42

Tableau n° 18 : Effet antioxydant de l'acide ascorbique sur la réduction du DPPH exprimé en.....	43
Tableau n° 19 : Effet antioxydant des extraits du grignon et du margine sur la réduction du DPPH exprimé en Pourcentage (%)......	44
Tableau n° 20 : Effet du l'acide ascorbique du BHA sur la réduction du fer. ....	46
Tableau n21:Absorbances de l'effet des extraits du grignon et du margine d'olive sur la réduction du fer des extraits sur la réduction du fer (méthode du PFRAP). ....	47
Tableau n°22 : Effet de l'acarbose sur l'inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -amylase exprimé en pourcentage.....	49
Tableau n° 23 Effet des extraits de grignons et margine sur l'activité de l' $\alpha$ amylase exprimé en pourcentage d'inhibition.....	50
Tableau n°24 : Analyse statistique de l'Annova et Tukey sur Minitab. ....	53

## Liste d'abréviations

- % : *Pourcentage.*
- µg : *Microgramme.*
- µl : *Microlitre.*
- °C : Degrés Celsius
- AC : *Acide Catéchique*
- AG : *Acide Gallique*
- APS : Algérie Presse Service
- BHA: *Butyl hydroxy Anisole*
- CO: *Carbonyle*
- COI : Conseil Oléicole International
- DCO : Demande Chimique en Oxygène
- DNSA : Acide 3,5-Dinitrosalicylique
- DOPET : dihydroxyphényléthanol
- DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
- DPV : Direction de la Production Végétale
- DW : Poids sec
- EFSA : l'autorité européenne de sécurité des aliments
- Fe<sup>2+</sup> : *Ion ferreux*
- Fe<sup>3+</sup> : *Ion ferrique*
- FeCl<sub>3</sub>: *Chlorure de fer*
- FRAP: *Ferric reducing antioxidant power*
- FW: Poids frais
- GOD: *glucose-oxydase*
- h: *heure*
- HT : Hydroxytyrosol
- K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> : *Ferricyanure de potassium*
- LDL: Low Density Lipoproteins
- LOPP : Poudre enrichie en liquide
- MF : Microfiltration
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Carbonate de sodium
- NaNO<sub>2</sub> : Nitrite de sodium

- **NaOH**: Hydroxyde de sodium
- **NF** : Nanofiltration
- **OH** : Hydroxyle
- **PBS** : tampon phosphate salé (Phosphat buffer salin)
- **PH** : Potentiel hydrogène
- **POD** : peroxydase
- **POPP** : Poudre enrichie en pulpe
- **Q** : *Quercétine*
- **RO** : Osmose inverse
- **T<sup>0</sup>**: Température
- **TCA** : *Acide trichloracétique*
- *ug EAG/mg E : Microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait*
- *ug EC/mg E : Microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait*
- *ug EC/mg E : microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait*
- **UV** : Ultraviolet

---

# **Introduction**

---

Les nations méditerranéennes se sont affirmées comme les principaux acteurs en matière de consommation, de production et d'exportation d'olives et d'huile d'olive. Leur production d'huile d'olive représente environ 90 % de la production mondiale, avec une estimation de 2874500 tonnes (COI, 2018).

Actuellement, avec la mise en avant des bienfaits de l'huile d'olive pour la santé humaine, la demande ne cesse d'augmenter, entraînant une croissance de la production. Outre l'huile d'olive en tant que produit principal, l'industrie oléicole génère d'importantes quantités de sous-produits solides appelés grignon, ainsi qu'un autre liquide appelé margine. La production mondiale de margine dépasse un volume de 30 millions de mètres cubes par an (El-abbassi *et al.*, 2017).

Chaque jour, d'importants volumes de déchets sont produits dans le monde, notamment des déchets alimentaires, des déchets de boissons, des déchets agricoles et industriels. Le processus de broyage des olives pour obtenir de l'huile d'olive génère également des quantités significatives de déchets, tels que les grignons et les margines, qui sont préjudiciables à l'environnement. Malgré leur riche composition chimique en matières organiques, leur concentration en composés polyphénoliques dont certains sont très difficilement biodégradables, ces déchets demeurent largement inexploités et non valorisés en l'absence de contrôle, le rejet non régulé de ces substances dans l'environnement peut entraîner une contamination des nappes phréatiques, la pollution des eaux de surface, le colmatage des sols et la diffusion d'odeurs désagréables. Il est donc impératif de les réutiliser pour réduire leur impact environnemental (Chaib et Ameyoud, 2022).

La valorisation des déchets alimentaires représente une opportunité stimulante pour le développement industriel durable et compétitif. La récupération des phénols contribue à la durabilité du secteur des déchets d'olives, réduisant ainsi son impact environnemental et favorisant le développement de formulations innovantes pour des applications pharmaceutiques, nutraceutiques et cosmétiques (Tundis *et al.*, 2020)

La recherche et la valorisation de molécules naturels ont toujours suscité un intérêt considérable, qui ne cesse de croître face à la méfiance grandissante des consommateurs à l'égard des produits synthétiques, qui peuvent parfois présenter des effets secondaires graves pour la santé humaine. La valorisation des sous-produits de la filière oléicole peut se révéler intéressante tant sur le plan environnemental que sur le plan économique. L'objectif est d'utiliser ces produits soit sous leur forme brute, avec un traitement minimal et peu coûteux,



soit d'en extraire les composés bioactifs applicable dans le domaine pharmaceutique (**El-abbassi *et al.*,2017**)

Dans ce contexte, l'objectif de la présente étude consiste à la caractérisation phytochimique et la recherche de l'activité antioxydante et antidiabétique des résidus solides et liquides issus de l'extraction de l'huile d'olive dans la région de Tlemcen, à savoir le grignon et le margine.

La démarche expérimentale de cette étude regroupe deux parties, la partie phytochimique consiste à la préparation des extraits eau-éthanol des grignon frais et séchés, et le fractionnement liquide-liquide des margines en utilisant acétate d'éthyle et n-butanol. Les extraits récupérés font l'objet d'un dosage des composés phénoliques. La deuxième partie de cette étude biologique, repose sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et antidiabétiques des extraits du grignon et du margine d'olive.

---

# **Synthèse bibliographique**

---

## I. L'olivier

### I.1 Description de l'olivier

L'olivier était l'un des premiers arbres fruitiers cultivés par l'Homme. Son origine a été le sujet de plusieurs débats, Son histoire se confond avec celle des civilisations qui ont vu le jour autour du bassin Méditerranéen (**Ryan et al.,1998**). L'huile d'olive fait partie intégrante de l'alimentation des populations locales, ce produit, malgré une nature et une fabrication commune, offre une grande variété au niveau gustatif. L'olivier est maintenant employé pour fabriquer de l'huile ainsi que des fruits en conserve, Les feuilles sont utilisées en phytothérapie pour leur teneur élevée en composés phénoliques tels que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol, reconnus pour leurs bienfaits en nutrition et en médecine (**Breton et al.,2012**)

Les olives de tables sont considérés comme un aliment fonctionnel important en raison de leurs hautes valeurs nutritionnelles, ils sont riches en fibre et en composés antioxydants (**Stamatoula et al., 2017**). La production de l'olive de table en Algérie se concentre à l'ouest du pays plus précisément à Mascara dans la commune de Sig. La sigoisse est la variété d'olive la plus dominante, elle occupe 25% du verger oléicole Algérien avec une production record en 2017/2018 de 318 000 tonnes (**COI, 2018**).

L'huile d'olive, dont l'histoire remonte à la civilisation grecque, est encore largement consommée aujourd'hui. Elle est la principale source de matières grasses dans les régimes crétois et méditerranéen, reconnus pour leurs bienfaits sur la santé. Sa valeur nutritionnelle est principalement due à sa composition en acides gras, essentiellement insaturés, avec une petite proportion d'acides gras essentiels (**Ryan et al.,1998**)

L'olive et son huile ont toujours été les composants clés du régime méditerranéen pendant très longtemps, en raison de leur haute qualité nutritionnelle et de leurs effets positifs sur la santé (**Storniolo et al., 2017**), issue d'un fruit sans recourir à des étapes de raffinage. En effet, selon les normes officielles, l'huile d'olive ne peut être obtenue qu'à partir du fruit de l'olivier et uniquement par utilisation de procédés physiques (**Veillet, 2010**).

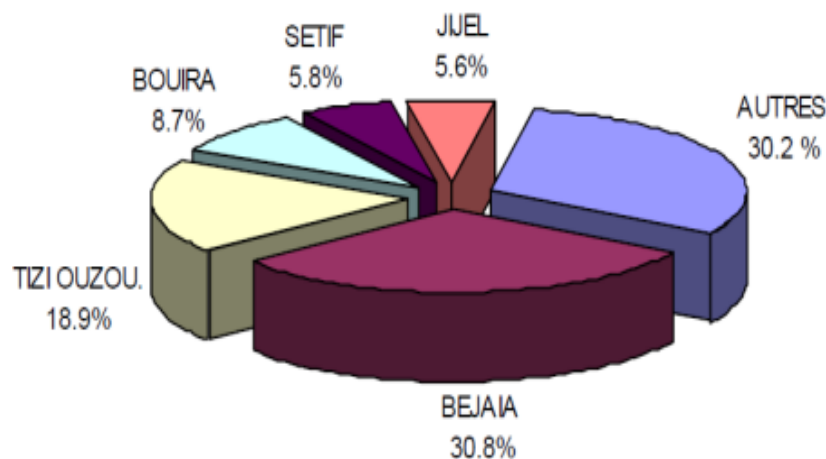
La classification botanique de l'olivier selon **Benlemlih et Ghanem (2012)** est la suivante :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Magnoliophyta
- Sous embranchement : Magnoliophytina
- Classe : Magnoliopsida

- Sous classe : Dialypetales
- Ordre : Lamiales
- Famille : Oleaceae
- Genre : *Olea*
- Espèce : *Olea europea* L.
- Sous espèces : *O. europeasubsp. Europeavar. sylvestres*  
*O.europeasubsp.Europeavar.europa*

### I.1.2. La production et le secteur oléicole Algérien

L'olivier existe principalement dans les terrains montagneux et se répartit dans trois zones (**figure n°1**):le centre nord (Tizi Ouzou, Bouira, Bejaia) avec 54,3 % de la surface totale, l'est (Jijel, Guelma, Skikda et Mila) avec 28,3 % et l'ouest qui occupe 17 % de la superficie totale (Tlemcen, Oran, Mascara) (**Aggoun, 2016**)



**Figure n°1 : répartition de la superficie d'olivier**

L'Algérie a fait beaucoup de progrès dans le but d'améliorer la quantité de production et la qualité des huiles vierges. Elle est classée au septième rang des producteurs mondiaux et au troisième rang en Afrique, derrière la Tunisie et le Maroc (**Benkhaled et al., 2021**). L'huile d'olive produite en Algérie est renommée pour sa qualité et son goût distinctifs, lesquels peuvent varier en fonction de la région de production, des méthodes de fabrication et de la source d'irrigation utilisée. En outre, en Algérie, l'huile d'olive est également utilisée à des fins médicinales et cosmétiques (**Meklatiet al., 2019 ; Benkhaled et al., 2021**).

### I.1.3. Procédés d'extraction d'huile d'olive

La culture de l'olivier a traditionnellement privilégié la production de l'huile d'olive, avec un processus d'extraction inchangé. Ce processus comporte quatre étapes principales : les opérations préliminaires, le broyage, le malaxage et la séparation des phases liquides (huile et eau) de la phase solide (grignon) (Chaouadi et Elias, 2015). L'extraction est effectuée en utilisant différents systèmes : la pression, tel que le système discontinu ou traditionnel, ou la force centrifuge, comme dans le système continu (Figure n°02).

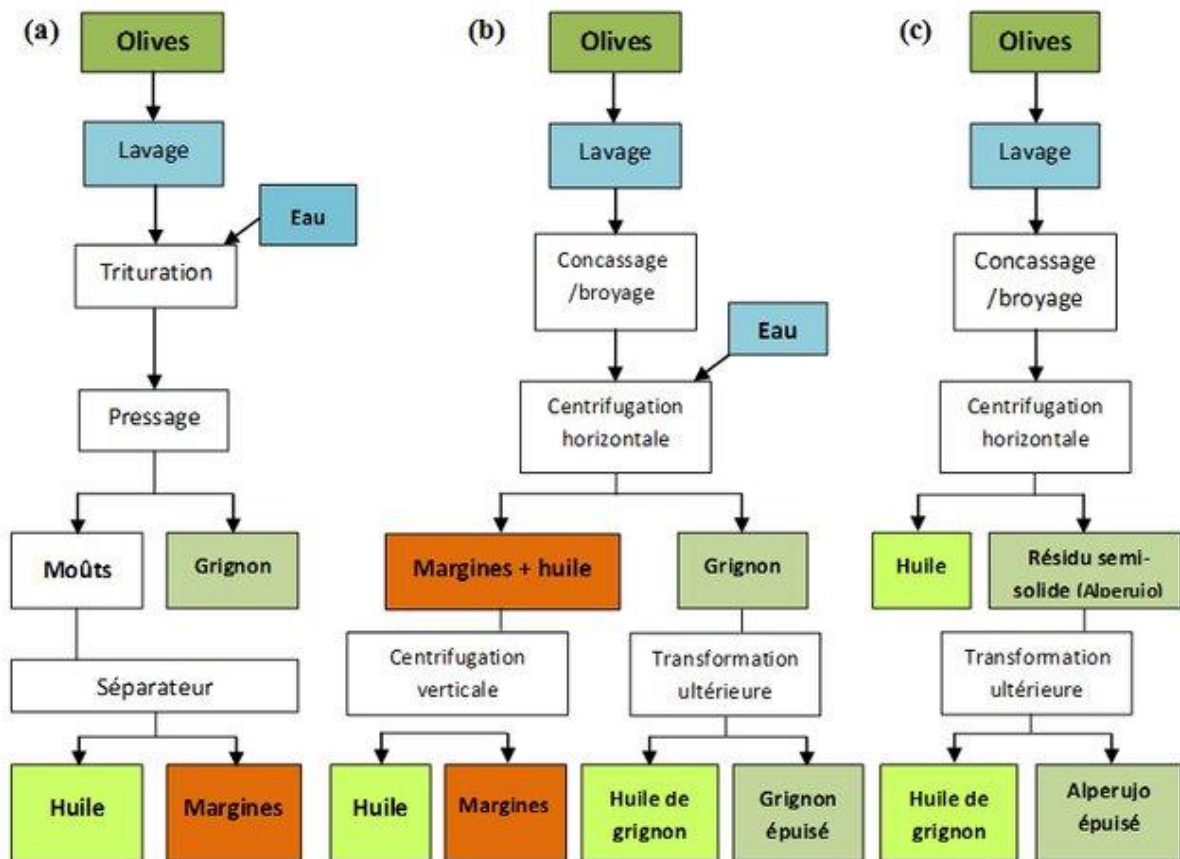


Figure n°2 : Schéma des différents procédés de production d'huile d'olive, (a) procédé à presses, (b) procédé à trois phases, (c) procédé à deux phases (El-Abbassi.,2013).

## II. Les principaux sous- produits de l'oléiculture

### II.1. Grignons d'olive

#### II.1.1. Définitions et type de grignon

Le grignon d'olive est un résidu solide de teinte brune, issu de l'extraction complète de l'huile des olives par broyage, sans recours à des traitements chimiques. Ce processus d'extraction comprend plusieurs étapes, notamment le lavage, le broyage, le malaxage de la pâte obtenue, et enfin l'extraction proprement dite (**Labsaoui.,2017**) .

Les grignons contiennent encore de l'huile appelée huile secondaire. Ils sont composés de peaux, de résidus de pulpe et des fragments des noyaux. Ces déchets contiennent en moyenne 28,5% d'eau, 41,5% de coque, 21,5% de pulpe et 8,5% d'huile (**Amic et Dalmasso, 2013**).

Selon le procédé de trituration et le traitement technologique utilisé, on distingue trois types du grignons d'olive (**Babakhouya,2010**).

- ❖ **Le grignon brut** : C'est le résidu de la première extraction de l'huile d'olive entière
- ❖ **Le grignon épuisé** : C'est le résidu obtenu après déshuilage du grignon brut par un solvant, généralement de l'hexane.
- ❖ **Le grignon partiellement dénoyauté** : Il résulte de la séparation partielle du noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation. Il est dit gras si son huile n'est pas extraite par solvant, et dit dégraissé ou épuisé si son huile est extraite par solvant.

#### II.1.2. Composition chimique du grignon d'olive

Le grignons d'olive est un matériau lignocellulosique typique composé de polysaccharides structurels (cellulose et hémicelluloses) et un hétéropolymère aromatique (lignine) ainsi que des composantes non structurales (**Gullon et al., 2018**)

Le grignon d'olive constitue une excellente source ajoutée de composés de haute valeur comme les phénols, les glucides et les protéines (**Bermúdez et al.,2019**). Il présente une composition typique de la biomasse lignocellulosique ; en ce sens, il contient de la lignine (30,0 à 41,6%), de la paroi cellulaire polysaccharides (35,3 à 49,0 %) comme cellulose, polymères pectiques et hémicelluloses (xylanes, glucoroxylanes), l'huile (7,5 à 14 %) et les minéraux (4,4 à 6 %) (**Rodrigues et al.,2015 ; Miranda et al., 2019**).

Ce sous-produit d'olive a été proposés comme une bonne source de molécules bioactives comme les antioxydants et les oligosaccharides. À cet égard, **Gullon et al., (2018)** ont signalé

que la teneur en extraits de l'élagage de l'olivier est remarquablement plus élevée que dans d'autres matériaux lignocellulosiques (**Tableau n°1**).

**Tableau n°1 : Composition chimique des grignons d'olives**

(Medouni-Haroune *et al.*, 2018)

Paramètres	Système traditionnel	Système continue	
		Système à 2 phase	Système à 3 phase
<b>Ph</b>	5,29	6,6	5 ,1-5,32
<b>Lignine (g/Kg)</b>	194,7	-	426,3
<b>Hémicelluloses (g/Kg)</b>	168,4	-	350,8
<b>Cellulose (g/Kg)</b>	114,9	-	193,6
<b>Mercure (g/Kg)</b>	-	<0,1	<0,1
<b>Cadmium (mg/Kg)</b>	-	<0,05	<0,05
<b>Arsenic (mg/Kg)</b>	-	<0,05	<0,05
<b>Zinc (mg/Kg)</b>	-	9,9-10	8-21
<b>Sodium (mg/Kg)</b>	92,1	103,8	214,3-800
<b>Calcium (mg/Kg)</b>	17148,4	3218,7	1693-4500
<b>Magnesium (mg/Kg)</b>	1189,7	511,1	800-1700
<b>Potassium (mg/Kg)</b>	11366,6	16020,2	28433,9

Les éléments principaux présents dans les grignons d'olive incluent le potassium, le calcium et le sodium (**Dermeche *et al.*, 2013 ; Christoforou et Fkaides, 2016**), Les taux des métaux lourds dans les grignons d'olive sont habituellement très bas voire insignifiants, avec des quantités de plomb, de cadmium, de chrome et de mercure inférieures à 1 mg/kg, ce qui témoigne d'une présence limitée de ces métaux dans ce résidu (**Haroune *et al.*, 2018**),

Le profil de vitamine E du grignon d'olive comprenait :  $\alpha$ -tocophérol,  $\beta$ -tocophérol,  $\alpha$ -tocotriénol et  $\gamma$ -tocophérol, L' $\alpha$ -tocophérol était la forme majoritaire (2,63 mg/100 g), tandis que les autres vitamines étaient présentes en quantités inférieures à 0,1 mg/100 g(**Tableau**

n°2), La fraction lipidique était particulièrement riche en acide oléique (75 %) suivie par les acides palmitique (10%), linoléique (9%) et stéarique (3%)(Tableau n°3)(Nunes *et al.*,2018).

**Tableau n°2 : Les différentes formes de vitamine E présentes dans le grignon d'olive.**

Composant	mg/100 g (dw)	mg/100 g (fw)
<b><math>\alpha</math>-Tocophérol</b>	7,64 $\pm$ 0,81	2,63 $\pm$ 0,28
<b><math>\alpha</math>-Tocotriénol</b>	0,29 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,01
<b><math>\beta</math>-Tocophérol</b>	0,09 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01
<b><math>\gamma</math>-Tocophérol</b>	0,13 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01

**Tableau n°3 : La composition en acides gras du grignon d'olive, exprimée en pourcentage relatif.**

Acides gras	Pourcentage relatif (%)
<b>C14:0 (myristique)</b>	0,04 $\pm$ 0,00
<b>C16:0 (palmitique)</b>	10,40 $\pm$ 0,05
<b>C17:0 (heptadécanoïque)</b>	0,13 $\pm$ 0,00
<b>C18:0 (stéarique)</b>	3,27 $\pm$ 0,01
<b>C20:0 (arachidique)</b>	0,42 $\pm$ 0,01
<b>C22:0 (béhénique)</b>	0,16 $\pm$ 0,01
<b>C24:0 (lignocérique)</b>	0,07 $\pm$ 0,01
<b>C16:1 (palmitoléique)</b>	0,68 $\pm$ 0,03
<b>C18:1n9c (oléique)</b>	75,25 $\pm$ 0,19
<b><math>\Sigma</math>SFA (acides gras saturés)</b>	14,49
<b><math>\Sigma</math>MUFA (acides gras mono-insaturés)</b>	76,25
<b><math>\Sigma</math>PUFA (acides gras poly-insaturés)</b>	9,26

La poudre de grignon d'olive enrichis en pulpe (POPP) est également riche en fibres alimentaires, principalement des fibres insolubles (69,68 g/100 g de poids sec), liées à une quantité substantielle de phénols liés (7,63 mg d'équivalents d'acide gallique/g de poids sec de



fibres) (Tableau n°4). Cette composition favorise la biodisponibilité des acides gras en diminuant les acides gras saturés de 5 à 6 % et en facilitant la biodisponibilité des acides gras

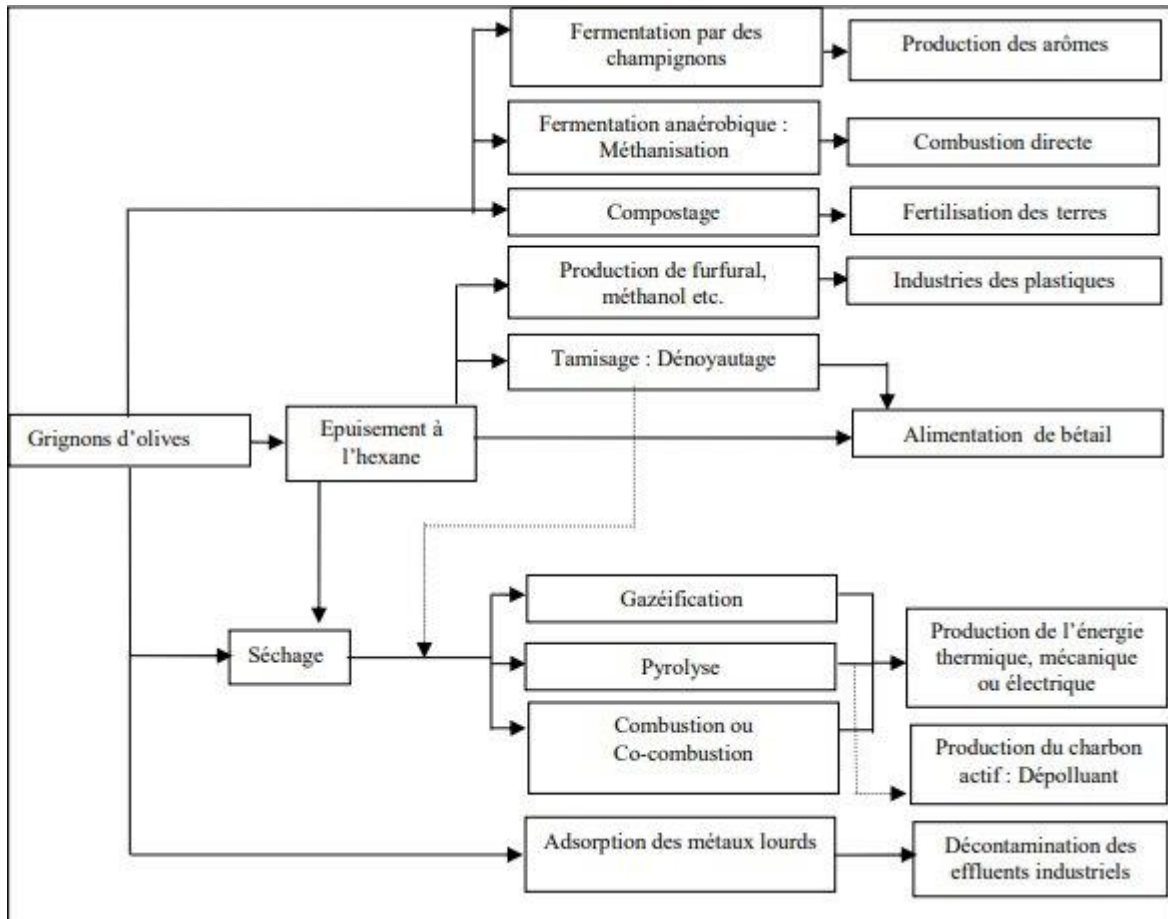
**Tableau n°4 : Composition chimique des poudres de grignon d'olive (g/kg de matière sèche (Ribeiro *et al.*, 2021).**

		Composition chimique de poudre de margine	LOPP (poudre enrichie en liquide)	POPP (poudre enrichie en pulpe),
<b>Composition</b>		Humidité	33,71 ± 1,62	36,55 ± 2,32
		Protéines	11,17 ± 1,48	118,24 ± 1,24
		Lipides	8,01 ± 0,39	119,54 ± 6,99
		Cendres	84,56 ± 6,64	31,92 ± 0,22
<b>Minéraux</b>		P	4,76 ± 0,02	1,59 ± 0,18
		Mg	1,53 ± 0,03	0,50 ± 0,07
		Ca	1,32 ± 0,01	1,65 ± 0,21
		Na	0,17 ± 0,01	-
		K	54,31 ± 1,05	17,56 ± 2,61
<b>Sucres</b>		Glucose	125,69 ± 11,10	35,29 ± 2,80
		Fructose	16,43 ± 1,43	4,07 ± 0,57
		Mannitol	141,11 ± 12,45	8,85 ± 0,45
<b>Acides Organiques</b>		Lactique	4,15 ± 0,18	1,18 ± 0,02
		Formique	10,27 ± 0,72	4,55 ± 0,36
		Acétique	2,62 ± 0,13	0,49 ± 0,01
<b>Acides aminés</b>	<b>Non essentiel</b>	Asp	-	22,11 ± 2,32
		Glu	-	21,63 ± 2,58
		Gln	-	8,98 ± 0,84
		Ala	-	5,99 ± 0,64
		Arg	-	5,75 ± 0,19
		Cys	-	8,98 ± 0,84
	<b>Essentiel</b>	His	-	21,38 ± 1,16
		Thr	-	1,60 ± 0,14
		Tyr	-	3,73 ± 0,41
		Val	-	7,11 ± 0,54
		Met	-	2,72 ± 0,05
		Trp	-	11,87 ± 0,94
		Phe	-	11,03 ± 1,32

### II.1.3 Valorisation de grignons d'olive

Le grignon d'olive, une ressource renouvelable, présente un risque de pollution en raison de sa teneur élevée en matière organique lorsqu'il n'est pas valorisé, Cependant, diverses méthodes de valorisation sont disponibles pour remédier à cette situation,

- Traditionnellement, le grignon est utilisé à l'échelle domestique ou dans les huileries pour la production de chaleur lors du processus d'extraction, De nos jours, il se trouve des applications comme combustible dans les chaudières centrales pour générer de l'énergie électrique (**Amrani,2010**).
- Les grignons peuvent servir de milieu de fermentation, pour produire une biomasse probiotique (**Mennane et al., 2010**).
- Le grignon d'olive pourrait être appliqué non seulement comme un agent de sorption physique d'huile, mais aussi à des fins de bio-augmentation comme source biologique pour les bactéries (**Dashti et al., 2015**).
- Utilisation des grignons d'olive dans l'alimentation animale après addition d'autres composantes (son, cactus, mélasse, fourrage, minéraux...)
- Pour son utilisation en tant que fertilisant, il est conseillé de soumettre le grignon d'olive à un processus de compostage afin de produire une matière organique stabilisée qui ne présente pas de toxicité pour les plantes



**Figure n°3 : Différentes filières de valorisation des grignons d'olives (Ajmia et Chouchen, 2010)**

#### **II.1.4. Application écologique du grignon d'olive**

- Les résidus d'olives ont été utilisés comme amendement pour améliorer la fertilité du sol et augmenter la quantité du carbone organique stocké dans les agrosystèmes (Majbaret *et al.*, 2018 ; Regni *et al.*, 2017).
- Les sols enrichis avec des composts de résidus d'olives combinés à divers déchets agro-industriels, présentent des niveaux plus élevés d'azote, de phosphore, de potassium et de matière organique par rapport aux sols traités avec des engrais inorganiques (Fernández-Hernández *et al.*, 2014).
- La possibilité d'utiliser les grignons d'olive comme fertilisant ou améliorant du sol a également été étudiée comme alternative aux engrais minéraux (Lacolla *et al.*, 2019).

### **11.1.5. Application industrielle du grignon d'olive**

- Valoriser les grignons d'olive consiste à les convertir en adsorbants économiques pour le contrôle de la pollution de l'eau (**Anastopoulos *et al.*, 2015**)
- les résidus d'olives conservaient leur capacité absorbante pendant plus de 10 cycles, leur capacité à adsorber divers ions métalliques pourrait accroître leur potentiel d'application dans le traitement des eaux usées industrielles (**Abdelhadi *et al.*, 2017 ; Fernández-González *et al.*, (2019)**).
- Les composés phénoliques extraits du grignon d'olive peuvent être utilisés pour fabriquer des matériaux d'emballage biodégradables (**Figure n°4**) pour divers types de produits alimentaires afin de remplacer ceux de synthèse (**Lammi *et al.*, 2018**).
- Il est également possible de récupérer les fragments de noyaux, utilisés comme combustible pour chauffer les fours ou pour produire du charbon actif.
- Les grignons d'olive ont également eu été employés pour éliminer les polluants du sol, tels que les métaux lourds et les herbicides (**Delgado *et al.*, 2007**).
- La digestion anaérobie des grignons d'olive est capable de produire du méthane de bonne qualité (**Tekin et Dalgic, 2000**).

### **11.1.6. Application cosmétique de composés phénoliques présents dans le grignon d'olive**

- Les formulations cosmétiques contenant du verbascoside, sont utilisées pour inhiber la collagénase et l'élastase, et activer les hydroxylases (**Robin et Rolland, 2004**)
- Les dermocosmétiques à base d'hydroxytyrosol, conçu pour inhiber la synthèse de la mélanine et diminuer la pigmentation de la peau, agissant ainsi comme un agent blanchissant, éclaircissant et dépigmentant (**Codina et Monjo, 2014**)

### **11.1.7. Travaux alimentaires sur le grignon d'olive**

- Le pain et les biscottes enrichis en polyphénols de grignon d'olive (200 mg de polyphénols/kg) ont montré une activité antimicrobienne plus élevée et ont prolongé leur durée de conservation de 10 à 15 jours (**Galanakis *et al.*, 2018**)
- L'ajout de résidus de marc d'olive et de pâte d'olive, individuellement ou combinés, au pain et aux pâtes a été évalué comme améliorent la qualité chimique sans compromettre les propriétés sensorielles (**Simonato *et al.*, 2019 ; Cedola *et al.*, 2020**)
- Les biscuits enrichis avec de la poudre de grignon d'olive, augmentent leur teneur en fibres alimentaires et réduisent leur indice glycémique et leur valeur énergétique. La consommation de ces biscuits a stimulé le métabolisme du microbiote intestinal

(Figure n°4), et augmente les niveaux d'acides homovanillique et 3,4-dihydroxyphénylacétique, ce qui contribue à la réduction du cholestérol LDL oxydé; les niveaux d'acides phénoliques dans les urines, indiquant une meilleure biotransformation des polyphénols dans l'intestin (Lin *et al.*, 2017 ; Conterno *et al.*, 2019).

- L'incorporation de 30% de farine de grignon d'olive dans des films à base de chitosane, qui ont permis de protéger les noix contre l'oxydation pendant 31 jours (De Moraes Crizel *et al.*, 2018).
- La fabrication de yaourts enrichis en hydroxytyrosol a pour objectif d'accroître leur activité antioxydante, tout en maintenant leurs propriétés organoleptiques et leur stabilité pendant au moins trois mois, ce qui contribue à la prévention des maladies (Villanova *et al.*, 2010).

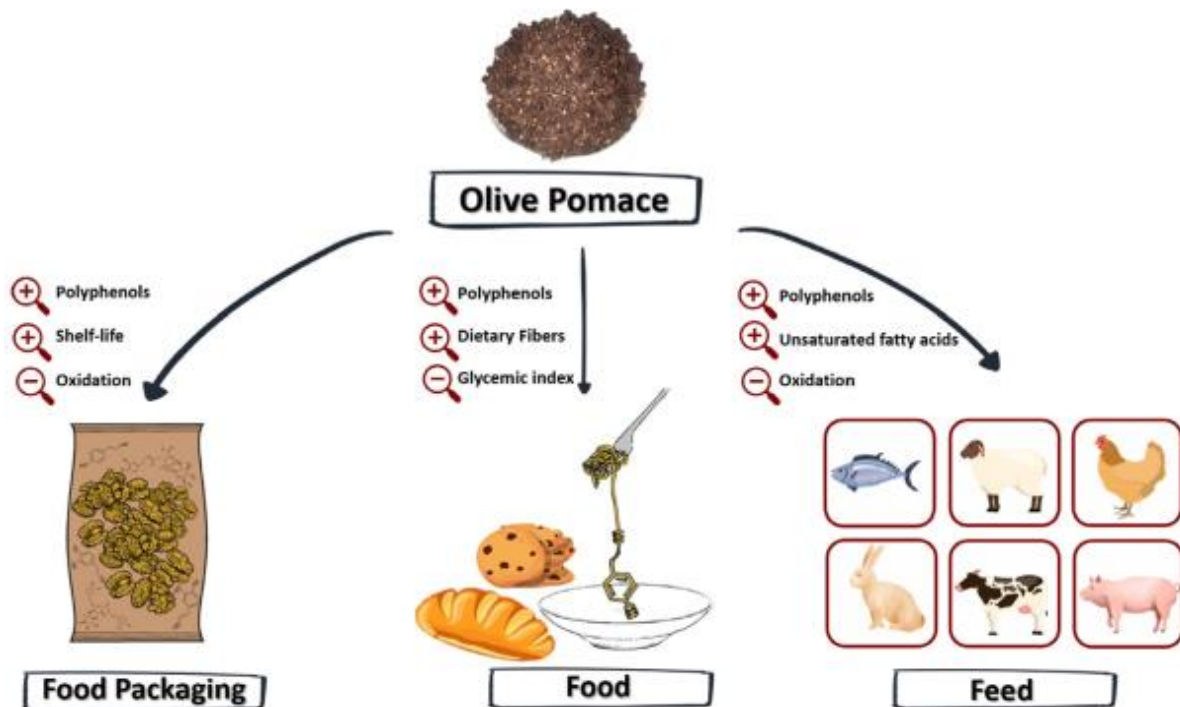


Figure n°4 : Applications des grignons d'olive pour des produits à haute valeur ajoutée dans l'alimentation et l'emballage (Difonzo *et al.*, 2021)

## II.2. Margine ou eaux de végétation

Il se présente sous forme de liquide trouble, avec une teinte variant du brun-rougeâtre au noir. Cette coloration est influencée par le niveau de dégradation des composés phénoliques et des olives dont ils sont issus. La qualité et la quantité des margine sont déterminées par divers

facteurs comme, les méthodes d'extraction basée sur le choix entre un lavage préliminaire des olives ou non, l'humidification des pâtes durant le pressage, la variété des olives, le degré de leur maturation, la période de l'extraction, ainsi que les conditions climatiques (**Ouabou et al.,2014 ; Bernou et Boucendala,2015**).

### **II.2.1. Composition chimique des margines**

Les margine se distinguent par leur forte charge organique, principalement composée de sucres tels que la raffinose, le mannose, le saccharose, le glucose, l'arabinose et la xylose, ainsi que des tanins, des polyalcools, des composés phénoliques, des acides organiques tels que l'acide fumarique, l'acide glycérique, l'acide lactique et l'acide malonique ; des lipides et des acides aminés principalement les acides : Aspartique, glutamique, proline et glycine (**Tableau n°5**). Il est caractérisé par une légère acidité, une couleur brune rougeâtre à noire et une conductivité élevée (**Jaouani et al., 2003**).

**Tableau n°5 : Composition en matières organiques des margine**

(**Zbakh et El abbassi, 2012**).

<b>Paramètres</b>	<b>Gamme des valeurs</b>
<b>Ph</b>	4,7 - 5,7
<b>Conductivité (ms/cm)</b>	5 – 41
<b>DCO (g/l)</b>	16,5 – 190
<b>DBO5 (g/l)</b>	41,3 – 46
<b>Résidus sec (g/l)</b>	11,5 - 102,5
<b>Matières organiques (g/l)</b>	16,7 - 81,6
<b>Lipides (g/l)</b>	1,64 - 9,8
<b>Polyphénols (g/l)</b>	0,002 - 11,5
<b>Sucres (g/l)</b>	1,3 - 8,79
<b>Acides organiques (g/l)</b>	0,78 – 1
<b>Azote total (g/l)</b>	0,06 - 0,95

Les margines renferment également des ressources précieuses telles que les éléments minéraux, en particulier le potassium, qui pourrait être récupéré et réutilisé comme un engrais

potentiel (**Dermeche et al.,2013**). La fraction minérale est constituée principalement de potassium, ce qui a conduit plusieurs chercheurs à tester leur pouvoir fertilisant-

Presque tous les acides aminés se trouvent dans les margine, avec une abondance particulière d'acides aspartique et glutamique, de proline et de glycine. En ce qui concerne les vitamines, plusieurs ont été identifiées dans les margine (**Tableau n°6**), notamment les vitamines du groupe B (124 mg/kg),la vitamine E (tocophérol), et les caroténoïdes, précurseurs de la vitamine A (**Aggoun et al., 2016**).

**Tableau n°6 : La composition en tocophérols dans les margine d’olive selon la variété d'olive et la méthode d'extraction de l'huile (Aggoun et al.,2016).**

		Azerraj	Chemlal	Siguisse
<b>Tocophérols</b>	α-tocophérols	28,80±11,54	21,08±10,32	39,14±13,33
	Y-tocophérol	4,35±1,34	4,35±1,19	5,58±1,54
<b>Caroténoïdes</b>	Lutéine	3,81±1,16	1,43±1,04	1,13±1,34
	B-cryptoxanthin	0,07±0,25	0,19±0,22	1,16±0,28
	9Z-B-carotene	0,50±0,13	0,21±0,12	0,13±0,15

Le métabolisme des caroténoïdes aboutit à la formation de rétinoïdes, tels que le rétinol, le rétinol et l'acide rétinolique (**Bonet et al., 2015**). Parmi eux, le rétinol et l'acide rétinolique sont les formes biologiquement actives de la vitamine A, le rétinol étant essentiel pour la vision (**Bernstein et al., 2016**). Certaines recherches indiquent que les caroténoïdes ont des propriétés antioxydantes, piégeant efficacement les radicaux libres et l'oxygène singulet (**Burri et al.,2016**).

### **II.2.2. L'incorporation d'extraits phénoliques du margine et des dérivés d'olive dans les aliments**

L'utilisation des résidus de l'industrie agroalimentaire pour produire des composés fonctionnels destinés aux aliments est un domaine prometteur nécessitant une collaboration interdisciplinaire. L'intégration des extraits de l'huile de marc d'olive dans les aliments émerge comme une tendance novatrice visant à améliorer la santé des consommateurs (**Figure n°5**). La valorisation des composés phénoliques naturels présents dans ces extraits, et en ajoutant

des composés phénoliques purs comme l'hydroxytyrosol, cette approche innovante offre des avantages en termes d'antioxydants, améliorant ainsi la qualité et la durée de conservation des aliments (**Galanakis *et al.*, 2017**).

Des extraits phénoliques du margine ont été utilisés dans un système laitier pour étudier leur influence sur la réaction de Maillard à haute température. Leur ajout, à des concentrations de 0,1 à 0,5 % (p/v), a révélé une capture des espèces carbonyles réactives, associée à un goût désagréable (**Caporaso *et al.*, 2018**).

Les directives diététiques recommandent de réduire les aliments saturés pour la santé cardio-métabolique. Les sous-produits de l'huile d'olive offrent une solution économique pour améliorer le profil en acides gras du lait, en augmentant les acides gras polyinsaturés. De plus, ils fournissent des stérols végétaux, connus pour réduire le cholestérol sanguin (**Berbel *et al.*, 2018**).

L'hydroxytyrosol, un additif alimentaire alternatif, est extrait principalement du margine, et est utilisé comme conservateur naturel pour prolonger la durée de conservation des produits alimentaires en raison de ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Malgré la diminution de la concentration des composés phénoliques lorsqu'ils sont ajoutés aux aliments, l'hydroxytyrosol conserve son activité plus longtemps, préservant ainsi ses propriétés bénéfiques pour la santé (**Ahmad *et al.*, 2020**). De plus, l'hydroxytyrosol a été utilisé sur tartinade, produits dérivés de tomates et vinaigrette (**Fernandez *et al.*, 2006**).



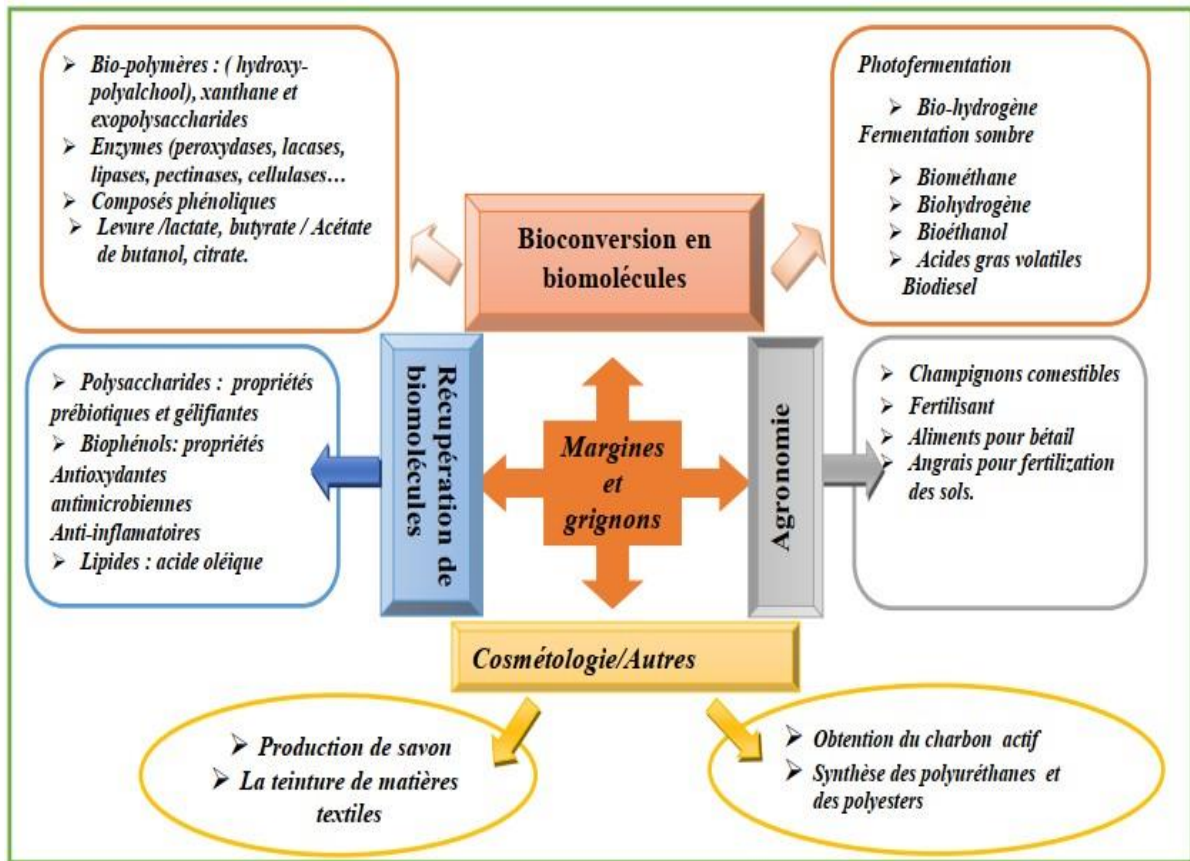
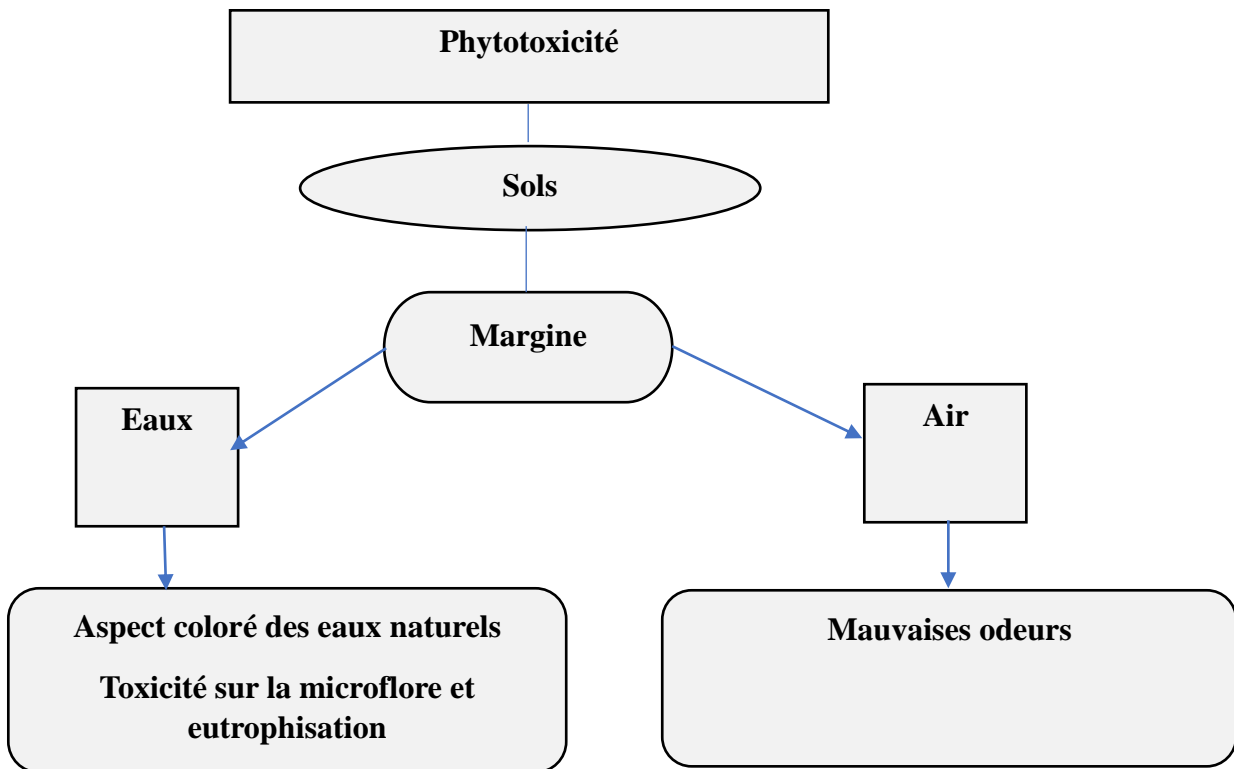


Figure n° 5: Valorisation biotechnologique du margine et du grignon (Dermeche.,2020)

### II .2.3. Problématique environnementale générée par les margines

Les pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive font face au défi de traiter leurs eaux usées, notamment les margines en raison de leur potentiel polluant, attribuable à une forte concentration en composés phénoliques notamment les tannins.

La très forte charge en demande chimique en oxygène (DCO) et surtout en demande biochimique en oxygène mesurée au bout de 5 jours (DBO5) des margines empêche l'autoépuration des eaux et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances (**Justino et al., 2012**). L'épandage direct des margines sur le sol influence significativement la croissance des plantes, l'activité microbienne et la composition physico-chimique du sol. Les mauvaises odeurs posent des problèmes de pollution de l'air (fermentation) et la coloration des eaux naturelles (**Figure n°6**).



**Figure n°6 : Conséquences environnementales des rejets du margine dans le milieu naturel**

#### II.2.4. Travaux antérieurs sur le margine

La biodégradation anaérobie *in vitro* des margines révèle leur utilisation importante par le microbiote du rumen, Les margine produisent une faible quantité de gaz et génèrent un volume réduit du méthane lors de leur fermentation *in vitro*. Cela améliore l'efficacité de la flore microbienne du rumen dans la production de biomasse tout en diminuant la production du méthane. Ces résultats permettent de recommander les margines comme additif alimentaire dans la ration des ruminants (Aggoun *et al.*,2016).

Les margine d'olive ont été traitées par une combinaison de microfiltration (MF), nanofiltration (NF) et osmose inverse (RO) afin de produire des fractions enrichies en polyphénols, Ces fractions ont été analysées par chromatographie liquide à ultra-haute performance (UHPLC) pour évaluer leur profil chimique et leurs activités potentielles, notamment antioxydantes, hypolipidémiques et hypoglycémiques. Le rétentat de RO s'est révélé être le plus riche en divers composés comme l'hydroxytyrosol, et a également montré une activité antioxydante élevée, ainsi qu'une capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique et des enzymes  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase (Tundis *et al.*,2020). Les margines

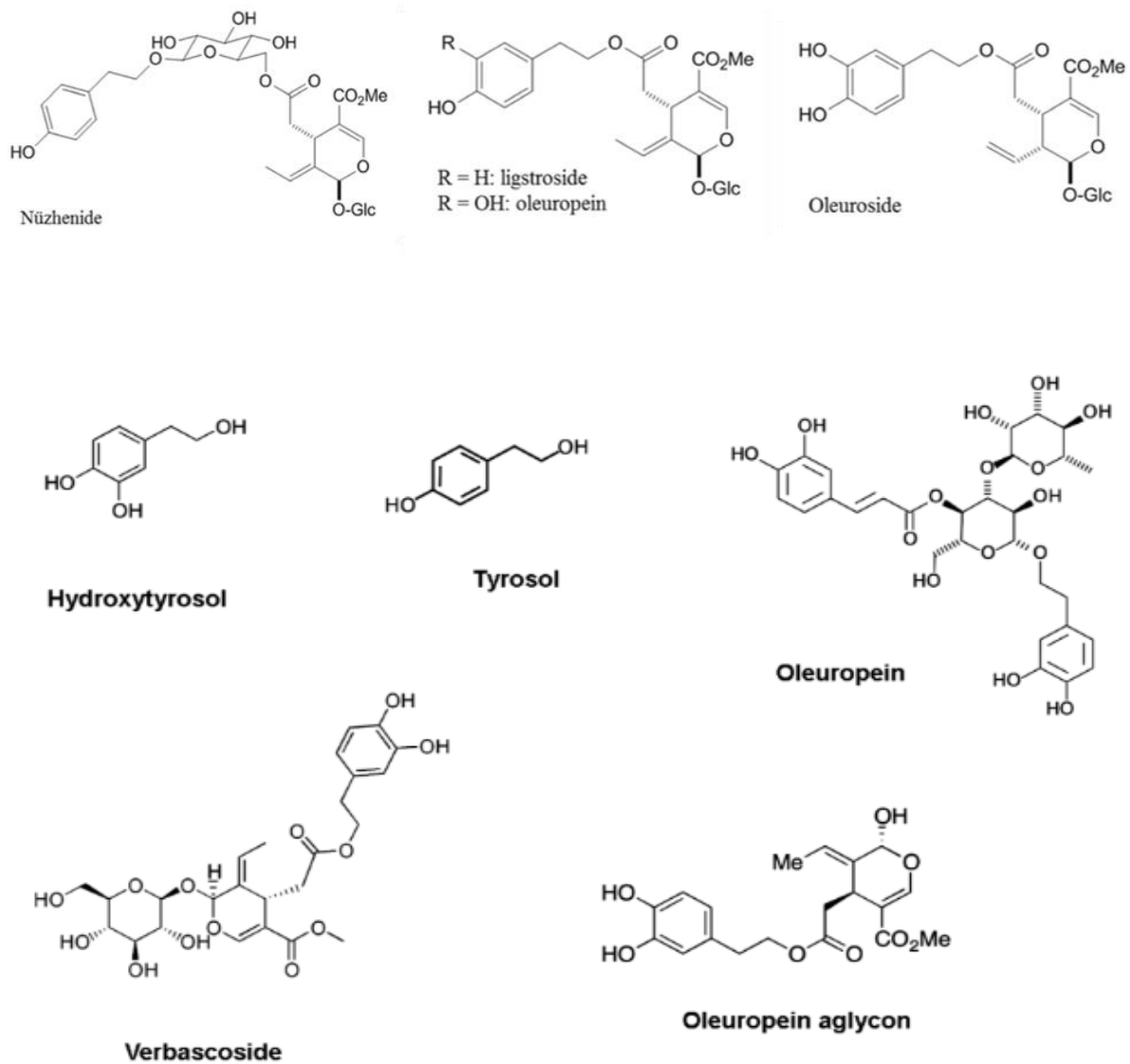
entraînent une diminution des niveaux de triglycérides et du cholestérol total *in vitro*, ces conclusions suggèrent que les margines offrent des avantages pour la santé en influençant certains paramètres biologiques, notamment les paramètres lipidiques, et en protégeant les tissus, en particulier le tissu hépatique (Messaoudi,2020).

### III. Les composés phénoliques du grignon et du margine

#### III.1. Les composés phénoliques de grignon d'olive

L'olivier est très riche en composés phénoliques, mais uniquement 2% de la teneur en phénols totaux du fruit passent dans la phase huileuse, tandis que la quantité restante est perdue dans les margines (~ 53%) et dans les grignons (~ 45%) (Rodis et al.,2002). Pendant le processus d'extraction d'huile d'olive, les composés phénoliques (ou bio phénols) migrent à partir de la pâte d'olives au cours du broyage/malaxage à aux différents sous-produits. Selon Aliakbarian et al, (2018), les polyphénols de grignon d'olive appartiennent à quatre classes : les phénols simples tels que le tyrosol et ses dérivés, les acides cinnamiques tels que l'acide p-coumarique et le verbacosite, les flavonoïdes comme la rutine et l'apigénine, et les secoiridoïdes comme l'oleuropéine et ses dérivés

Les dérivés secoiridoïdes sont des composés glycosylés qui proviennent du métabolisme secondaire des terpénoïdes, parmi eux, l'oleuropéine et le nüzhenide sont les principaux constituants du grignon d'olive (Abbattista et al., 2021). Les alcools phénoliques les plus prédominants dans le grignon d'olive sont le Tyrosol (4-hydroxyphényléthanol) et l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphényléthanol) (figure n°8)



**Figure n°7: Structures chimiques des principaux composés phénoliques présents dans le Grignon d'olive (Malapert *et al.*,2018 ; Abbattista *et al.*, 2021 ; Madureira *et al.*,2022)**

### III.2.les composés phénoliques du margine

Les margines sont riches en composés bioactifs comme l'hydroxytyrosol, qui possède des propriétés antioxydantes remarquables pouvant potentiellement affecter les taux de lipides sanguins. Les polyphénols récupérés des margines, tels que l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'oleuropéine, sont utilisés comme filtres UV actifs dans les cosmétiques (Galanakis *et al.*,2018).

Les polyphénols présents dans les margines sont principalement des anthocyanes et des tanins (Tanchevet *et al.*, 1980). Ces derniers, dotés de structures complexes, sont traditionnellement

classés en tanins hydrolysables et tanins condensés. En ce qui concerne la lignine, la couleur noire des margine est due à sa polymérisation avec des composés phénoliques (**Zbakh et el Abbassi, 2012**).

#### **IV. Les effets thérapeutiques des composés phénoliques issus du grignon d'olive et du margine**

Les principaux composés phénoliques des margine (hydroxytyrosol, tyrosol et oléuropéine) (**Figure n°9**), possèdent un large éventail d'activités biologiques, incluant des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et antivirales. L'hydroxytyrosol, un composé phénolique majeur du grignon d'olive, est remarquable pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes, Il est hautement utilisé par les industries cosmétiques et pharmaceutiques. Des recherches ont également mis en évidence son effet bénéfique dans le traitement des maladies cardiovasculaires, neurovasculaires et son potentiel anti-tumoral(**Robles-Almazan et al., 2018**). En outre, son influence sur la qualité des aliments, incluant leurs propriétés chimiques, nutritionnelles et sensorielles a été examinée (**Nunes et al., 2016**).

L'hydroxytyrosol (HT) suscite un intérêt dans les domaines alimentaire, des compléments alimentaires, pharmaceutique et de l'alimentation animale, Il figure parmi les antioxydants naturels les plus puissants (**Figure n°10**), et ses effets bénéfiques incluent des propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses, ainsi qu'un potentiel en tant que cardio- et neuroprotecteur (**Britton et al., 2019**). L'HT est capable de transmettre un atome d'hydrogène depuis leur groupe hydroxyle phénolique vers les espèces réactives de l'oxygène, potentiellement atténuant les dommages causés par les processus oxydatifs dans les cellules des mammifères (**Fernández-Bolaños et al., 2012**). Des études ont montré que l'HT améliore la régulation de l'action de l'insuline, suggérant que son activité antioxydante réduit le stress oxydatif associé à la résistance à l'insuline. De plus, il est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, ce qui lui permet de capturer les radicaux libres dans tout le système nerveux, et il prévient l'oxydation de lipoprotéine de faible densité (LDL)(**Tableau n°7**), En conséquence, il diminue la formation de plaques d'athérome dans l'athérosclérose (**granados-principal et al., 2012 ; Ziosi et al.,2018**). Les effets bénéfiques de l'HT sur la peau, l'appareil respiratoire, contre le Syndrome métabolique et le cancer ont été également rapportés (**Robles-almazan et al.,2017**).

L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) depuis 2011 recommande la consommation quotidienne de 5 mg d'Hydroxytyrosol fournis par des quantités modérées de l'huile d'olive (20g) pour maintenir une alimentation équilibrée. Cette dose est suffisante pour générer des propriétés bénéfiques pour la santé en diminuant l'oxydation des LDL, en augmentant les HDL, en maintenant une tension artérielle normale, et en évitant les processus pro-inflammatoires (Robles-almazanet *al.*,2017).

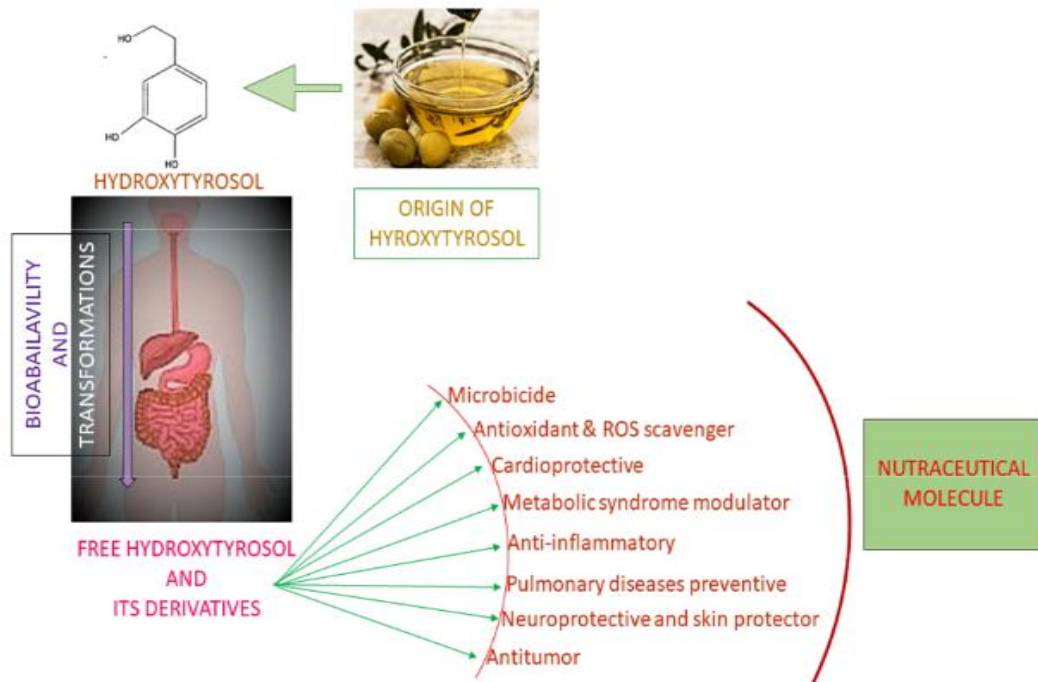


Figure n° 8 : Propriétés biologiques de l'hydroxytyrosol(Robles-Almazán *et al.*, 2017)

**Tableau n°7 : Activités biologique de certains composés phénoliques du grignon d'olive (Zbakh et Elabbassi, 2012 ; Gorzynik–Debicka *et al.*, 2018).**

<b>Composé phénolique</b>	<b>Activité biologique</b>	
<b>Hydroxytyrosol</b>	Antioxydante, cardioprotectrice, antimicrobienne et antivirale, anti-inflammatoire, et fongicide	
<b>Oleuropéine aglycone</b>	Antioxydante, anti-inflammatoire, et neuroprotectrice	
<b>Tyrosol</b>	Antioxydante, anti-inflammatoire, cardioprotectrice, et neuroprotectrice	Contre la peroxydation des lipides dans les cellules Caco-2 intestinales
<b>Oleuropéine</b>	Antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne et antivirale, anti-hypertensive, et modulation des enzymes	<p>Neutralisation des radicaux libres DPPH</p> <p>Prévention des dommages oxydatifs au myocarde</p> <p>Contre le cancer du sein</p> <p>Inhibe la prolifération des cellules cancéreuses du muscle lisse</p> <p>Hypoglycémique Chez les lapins diabétiques</p> <p>Efficace chez les patients avec hypertension stade 1</p>

---

---

# **Matériel et Méthodes**

---

---



### I. Objectif

L'objectif de notre travail consiste à l'évaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant, antidiabétique des différents extraits de grignons et de margines d'olive.

L'expérimentation de notre travail a été réalisée au niveau des laboratoires de pédagogie pôle de Biochimie, au département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen. Le protocole expérimental de cette étude, regroupe une partie phytochimique et une partie biologique.

La partie phytochimique comporte ;

- Préparation des extraits eau-éthanol à partir des grignons frais et séchés,
- Fractionnement par extraction solide- liquide du margine noire et marron en utilisant l'acétate d'éthyle et le n-butanol
- Dosage de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tannins condensés dans les extraits préparés

La partie biologique consiste à ;

- L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus en utilisant le test de piégeage du radical libre le DPPH et le test du pouvoir réducteur de fer
- Évaluation *in vitro* de l'activité antidiabétique des extraits préparés en mesurant leur effet sur l'activité de l' $\alpha$ - amylase et leur capacité d'adsorption au glucose.

## I.1 Partie Phytochimique

### I.1.1 Matériel végétal

Pendant la saison oléicole 2023/2024, nous avons récupéré d'une huilerie de la région de sabra deux sous-produits de la trituration des olives de la variété "Sigoisse", un sous-produit solide c'est le grignon récupéré à l'état frais et à l'état séché, et un sous-produit liquide c'est le margine de couleur noire et de couleur marron (Figure 19). Au laboratoire, les échantillons récupérés sont directement utilisés pour la préparation des extraits.



**Photo n° 9:(A) : Grignons frais, (B) : Grignons séché, (c) : margine noire, (D) : margine marron**

## I.2 Extractions

### I.2.1 Préparation de l'extrait eau-éthanol de grignons frais et séché

80g de grignon frais ou séché est mis en décoction avec 200 ml du mélange eau-éthanol (V/V :20 /80) à 50°C pendant une heure. Après refroidissement (figure 20), l'extrait est filtré puis évaporé à sec pour récupérer des extraits solides (Figure 20).



**Photo n° 10 : Extraction solide-liquide (décoction) du grignon d'olive dans eau-éthanol (20/80)**

### I.2.2 Fractionnement du margine

Le margine noire et marron ont subis directement une extraction liquide-liquide en utilisant d'abord l'éther de pétrole pour éliminer la chlorophylle et les lipides. La phase aqueuse est traitée deux fois par l'acétate d'éthyle (V/V), ensuite la phase aqueuse est récupérée et traitée deux fois par le n-butanol (V/V). Les phases organiques acétate d'éthyle et n-butanol récupérées sont évaporées au rotavapeur pour l'obtention des extraits secs (Figure 22).

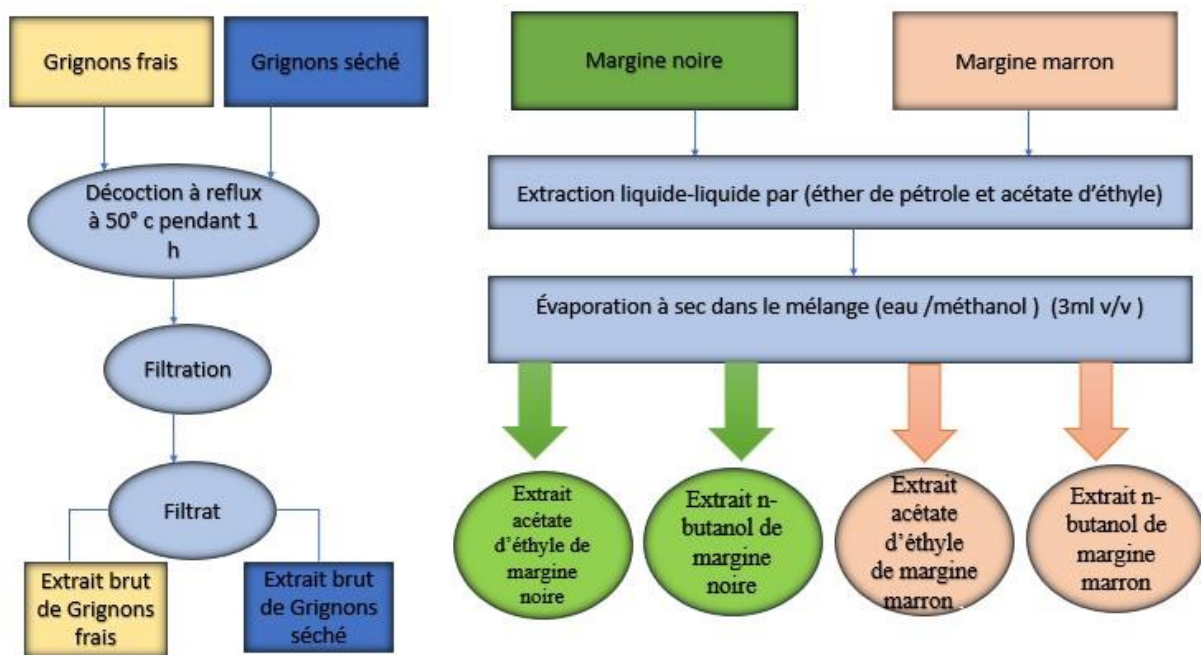


Figure n° 11 : organigramme explicatif des extractions

### I.3 Rendement des extraits

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse des extraits obtenue et la masse du matériel végétal à traiter. Le pourcentage du rendement de chaque extrait a été calculé selon la formule :

$$R(\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en pourcentage

M : Masse en gramme de l'extrait résultant

M : Masse en gramme de la matière initiale

### I.4 Phytoscreening

Les tests phytochimiques des extraits végétaux sont cruciaux, fournissant ainsi des informations sur leur composition chimique à travers des réactions colorimétriques et de précipitation (Harbone.,1998).

#### Les Tanins

Introduire dans un tube à essai 1 ml d'extrait à analyser. Ajouter 0,25ml d'une solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> à 1%. Incuber le mélange pendant 15 minutes à température ambiante. La présence de tanins est révélée par l'apparition d'une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

#### Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, déposer 1 ml de l'extrait à analyser, puis verser 1 ml d'acide chlorhydrique HCl (1%) et ajouter quelques copeaux de magnésium. La présence de flavonoïdes est révélée par l'apparition d'une coloration rose, rouge ou jaune.

#### Les quinones libres

Dans un tube à essai, mettre 1 ml de l'extrait à analyser et ajouter ensuite 0,1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (1%). Un changement de couleur jaune, rouge ou violet confirme la présence des quinones libres

#### Les terpénoïdes (Test de Slakowski)

Mélanger 0,4 ml de chloroforme avec 0,6 ml d'acide sulfurique concentré, puis ajouter 1 ml de l'extrait. La présence est signalée par la formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase

#### Les saponines (Test de mousse)

Dans un tube à essai, verser 10 ml de la solution aqueuse à analyser et agiter vigoureusement. La présence de saponosides est indiquée par la formation d'une écume persistante. Laisser le mélange reposer pendant 20 minutes, puis mesurer la hauteur de la mousse.

#### Les alcaloïdes

En plaçant 0,5 ml d'extrait dans deux tubes à essai, puis en acidifiant le milieu avec quelques gouttes de HCl (1%), on ajoute dans le premier tube 0,5 ml de réactif de Mayer et dans le

deuxième tube 0,5 ml de réactif de Wagner. La présence d'alcaloïdes est détectée par un précipité blanc ou brun dans chaque tube, respectivement

### Les composés réducteurs

Dans un tube à essai, combiner 1 ml de liqueur de Fehling (0,5 ml de réactif A et 0,5 ml de réactif B) avec 1 ml d'extrait à analyser. L'incubation du mélange pendant 8 minutes dans un bain-marie bouillant révèle la présence de composés réducteurs par l'apparition d'un précipité rouge brique

## I.5 Dosage des composés phénoliques

### I.5.1 Dosage de polyphénols totaux

#### ➤ Principe

L'oxydation des composés phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu résulte de la réaction entre l'acide phospho tungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et l'acide phospho molybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) en milieu alcalin. Cette réduction se traduit par l'apparition d'un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) de couleur bleu-verdâtre proportionnelle à la concentration en polyphénols dans le milieu, et mesurable à 700 nm (**Vermeris *et al.*,2006**)

#### ➤ Mode opératoire (**Benariba *et al.*,2013**)

**Le tableau n°8** résume le mode opératoire du dosage des polyphénols. Une courbe étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations.

**Tableau n°8 : Protocole du dosage de polyphénols dans les extraits du grignon et du margine d'olive.**

<b>Acide gallique (µg/ml)</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>	<b>400</b>	<b>500</b>	<b>900</b>	<b>100</b>	<b>Extrait</b>	<b>Blanc</b>
<b>Acide gallique (ml)</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		
<b>Extrait (ml)</b>									0,1	
<b>Eau distillée (ml)</b>										0,1
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% MI</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>1<sup>ère</sup> incubation pendant 5 min à température ambiante</b>										
<b>Folin - ciocalteu 0,2N (ml)</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>2<sup>ème</sup> incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité</b>										
<b>Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 700 nm</b>										

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (**µg EAG/mg E**) et calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphénols}] = \frac{a \cdot f}{c}$$

**a**: concentration finale des polyphénols déterminée à partir de la courbe d'étalon.

**f**: facteur de dilution (22).

**C** : concentration de l'extrait

### I.5.2 Dosage de flavonoïdes

#### ➤ Principe

Les flavonoïdes qui présentent un groupe hydroxyle (OH) libre en position 5', capable de former un complexe coloré avec le groupement carbonyle (CO) et le chlorure d'aluminium. Le

principe de ce dosage est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le réactif  $AlCl_3$ , ce qui entraîne la formation d'un complexe de couleur rose qui absorbe à 510nm (Chang *et al.*,2002).

➤ **Mode opératoire (Kumar *et al.*,2008)**

Le **tableau n°9** résume le mode opératoire du dosage des flavonoïdes. Une courbe étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations.

**Tableau n°9 : Protocole du dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits du grignon et du margine d'olive.**

<b>Catéchine (mg/ml)</b>	<b>20</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>	<b>400</b>	<b>500</b>	<b>600</b>	<b>Extrait</b>	<b>Blanc</b>
<b>Catéchine (µl)</b>	250	250	250	250	250	250	250	250		
<b>Extrait (µl)</b>									250	
<b>Eau distillé (µl)</b>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1250
<b>NaNO<sub>2</sub> 15% (µl)</b>	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
<b>1<sup>ère</sup> incubation pendant 6 min à température ambiante</b>										
<b>AlCl<sub>3</sub> 10% (µl)</b>	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
<b>2<sup>ème</sup> incubation pendant 6 min à température ambiante</b>										
<b>NaOH 4% (µl)</b>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Ajuster le volume total à 2500 µl</b>										
<b>3<sup>ème</sup> incubation à température ambiante pendant 15 min</b>										
<b>Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 510 nm</b>										

La quantité de flavonoïdes présente dans les divers extraits, exprimée en microgrammes équivalents de catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/mg E), est calculée en utilisant la formule suivante :

$$[\text{Flavonoïdes}] = \alpha * f/C$$

**a** : concentration de flavonoïdes déterminée à partir de la courbe étalon

**f** : facteur de dilution (10).

**C** : concentration de l'extrait.

### I.5.3 Dosage des tanins condensés

#### ➤ Principe

Les tanins sont des polymères qui se distinguent par la présence d'un nombre adéquat de groupes hydroxy phénoliques. Le dosage des tanins condensés se fait grâce au réactif de la vanilline. Cette approche repose sur la capacité de la vanilline à interagir avec les tanins condensés dans un environnement acide, formant ainsi un complexe de couleur rose ayant une absorption maximale à 500 nm (Sun *et al.*, 1998)

#### ➤ Mode opératoire

Le tableau n°10 résume le mode opératoire du dosage des tanins condensés. Une courbe étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations.

**Tableau n°10 : Protocole du dosage des tanins condensés dans les extraits du grignon et du margine d'olive.**

<b>Catéchine (mg/ml)</b>	<b>20</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>500</b>	<b>600</b>	<b>800</b>	<b>900</b>	<b>1000</b>	<b>Extrait</b>	<b>Blanc</b>
<b>Catéchine (µl)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50		
<b>Extrait (µl)</b>									50	
<b>Eau distillé (µl)</b>										50
<b>Vanilline 4% (µl)</b>	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
<b>Acide sulfurique (µl)</b>	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
<b>Agitation des tubes et Incubation pendant 15 minutes à température ambiante</b>										
<b>Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 500 nm</b>										

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/ mg E) selon la formule suivante :



$$[\text{Tanins}] = \alpha * f / C$$

a : concentration finale des Tanin déterminée à partir de la courbe d'étalon.

f: facteur de dilution (46).

C : concentration de l'extrait

## II. Partie tests biologiques

### II.1 Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de grignon et de margine d'olive

Dans cette étude, nous avons examiné l'effet antioxydant des extraits eau-éthanol du grignon frais et séchés et les fractions acétate d'éthyle et n-butanol du margine en utilisant le test de piégeage du radical libre DPPH et le test du pouvoir réducteur du fer (FRP).

#### II.1.1 Test de piégeage du radical DPPH

##### ➤ Principe

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante. Ce radical en solution est coloré en violet, en présence d'un antioxydant (donneurs de proton) il subit une réduction pour former une liaison moléculaire stable, le produit réduit présente une coloration qui vire vers le jaune. Dont l'intensité de la couleur et l'absorbance sont inversement proportionnelles à la capacité de réduction des radicaux libres présents dans le milieu réactionnel. Cette mesure est effectuée au spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 515 nm (Popovici *et al.* 2009)

##### ➤ Mode opératoire (Benariba *et al.*, 2013)

Le protocole expérimental pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits du grignon et du margine d'olive est résumé dans le tableau ci-dessous

**Tableau n°11 : Mode opératoire du test de piégeage du radical DPPH par les extraits du grignon et du margine d'olive**

Acide ascorbique (µg/ml)	5	10	25	50	100	Extrait	Control négatif
Acide ascorbique (µl)	25	25	25	25	25		
extraits (µl)						25	
Méthanol (µl)							25
DPPH 0,0025 mg/ml (µl)	975	975	975	975	975	975	975
<b>Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité</b>							
<b>Mesure de l'absorbance à 517 nm</b>							

Les résultats obtenus sont la moyenne des trois essais pour chaque concentration testée de chaque extrait. Le pourcentage de réduction du DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$\text{DPPH}\% = \frac{((A)_{\text{control}} - (A)_{\text{échantillon}})}{(A)_{\text{control}}} \times 100$$

**DPPH%** : Pourcentage de réduction du DPPH.

**A<sub>control</sub>** : Absorbance du tube contrôle négatif.

**A<sub>échantillon</sub>** : Absorbance de l'extrait.

La valeur de IC<sub>50</sub> qui indique la concentration du substrat responsable de la réduction de 50 % de la forme radicalaire du DPPH, a été déterminée à partir de l'équation courbes de régression du DPPH (%) en fonction de la concentration (C). Une valeur de IC<sub>50</sub> plus faible indique une activité antioxydante plus élevée de l'échantillon.

## II.1.2 Pouvoir réducteur de fer (Ferric Reducing Power ; FRAP) par les extraits du grignon et du margine

### ➤ Principe

Ce dosage consiste à réduire le fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) présent dans le ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  de couleur jaune en fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ), qui en présence de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) forme un complexe de couleur bleu-vert ayant une absorbance maximale à 700 nm (Ouldyeou et al., 2018).

### ➤ Mode opératoire selon (Karagozler et al., 2008)

Le tableau n°12 résume le mode opératoire du test du pouvoir réducteur du fer en utilisant le ferricyanure de potassium. L'acide ascorbique et le BHA ont été utilisés comme contrôles positifs à différentes concentrations.

**Tableau n°12 : Mode opératoire pour évaluer le pouvoir réducteur du fer par les extraits du grignon et du margine d'olive.**

<b>BHA ou acide ascorbique (µg/ml)</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>Extrait</b>	<b>Blanc</b>
<b>BHA/acide ascorbique (µl)</b>	50	50	50	50	50	50	50		
<b>Extrait (µl)</b>								50	
<b>Eau distillée (ml)</b>									50
<b>PBS (0,2N ; pH=6,6) (µl)</b>	125	125	125	125	125	125	125	125	125
<b><math>K_3Fe(CN)_6</math> 1% (µl)</b>	125	125	125	125	125	125	125	125	125
<b>Incubation dans l'étuve pendant 20 min à 50°C</b>									
<b>Refroidissement des tubes à température ambiante</b>									
<b>TCA 10% (µl)</b>	125	125	125	125	125	125	125	125	125
<b>Surnagent après addition du TCA (µl)</b>	250	250	250	250	250	250	250	250	250
<b>Eau distillé (µl)</b>	250	250	250	250	250	250	250	250	250
<b><math>FeCl_3</math> 0.1% (µl)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>Mesure des DO à 700 nm</b>									

La concentration efficace moyenne correspondante à une absorbance égale à 0,5 (EC<sub>50</sub>), est déterminée à partir de l'équation de la courbe de régression linéaire des absorbances en fonction des concentrations des extraits. Plus la valeur de EC<sub>50</sub> est faible plus l'extrait est efficace.

### II.2 Evaluation de l'activité antidiabétique des extraits de grignon et margine

Dans cette étude nous avons mesuré *in vitro* l'effet antidiabétique des extraits de grignon et de margine, en utilisant le test de l'activité de l' $\alpha$ -amylase et le test d'adsorption au glucose.

#### II.2.1 Evaluation de l'effet des extraits sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

##### ➤ Principe

Le test d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase évalue la capacité des extraits à inhiber cet enzyme responsable de l'hydrolyse des polysaccharides en sucres simples, offrant ainsi une approche *in vitro* pour évaluer le potentiel antidiabétique à réguler la glycémie.

L'évaluation de l'activité de l' $\alpha$ -amylase repose sur le dosage des sucres réducteurs libérés lors de la dégradation de l'amidon en sucres simples. L'oxydation des groupements aldéhydes et cétones des sucres réducteurs dans le milieu, en milieu alcalin et chaud, la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) de couleur jaune-orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge-orange qui absorbe à 540 nm. L'intensité de la coloration varie selon la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel (**Benfeld., 1955**)

##### ➤ Mode opératoire (Laoufi et al.,2017)

Le mode opératoire du test *in vitro* de l'activité de l' $\alpha$ -amylase est résumé dans le **tableau n°18** l'acarbose testé à différentes concentrations a été utilisé comme inhibiteur de l' $\alpha$ -amylase.

**Tableau n°13 : Evaluation de l'effet des extraits de grignon et du margine d'olive sur l'activité de l' $\alpha$  amylase.**

Tube extrait	Tube blanc extrait	Tube contrôle	Tube blanc contrôle
100 $\mu$ l Extrait	100 $\mu$ l Extrait	100 $\mu$ l PBS	100 $\mu$ l PBS
100 $\mu$ l enzyme	100 $\mu$ l PBS	100 $\mu$ l Enzyme	100 $\mu$ l PBS
<b>Incubation pendant 10 min à 37° C dans l'étuve</b>			
100 $\mu$ l amidon	100 $\mu$ l amidon	100 $\mu$ l amidon	100 $\mu$ l amidon
<b>Incubation pendant 15 min à 37° C dans l'étuve</b>			
300 $\mu$ l DNSA	300 $\mu$ l DNSA	300 $\mu$ l DNSA	300 $\mu$ l DNSA
<b>L'enzyme subit une dénaturation au bain-marie pendant 8 minutes à 100°C, suivie d'un choc thermique dans un bain de glace pendant 3 minutes.</b>			
500 $\mu$ l eau distillé	500 $\mu$ l eau distillé	500 $\mu$ l eau distillé	500 $\mu$ l eau distillé
<b>Mesure l'absorbance à 540 nm</b>			

L'inhibition de l' $\alpha$ -amylase est exprimé en pourcentage d'inhibition calculé à selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition de l}'\alpha\text{-amylase (\%)} = \frac{(DO \text{ control}) - (DO \text{ échantillon})}{(DO \text{ control})} \times 100$$

(%) : Pourcentage d'activité d' $\alpha$ -amylase.

DO control : Densité optique du tube contrôle.

DO éch : Densité optique de tube échantillon.

Les valeurs de IC<sub>50</sub>, représentant la concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique, sont dérivées des équations des courbes de régression du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits.

## II.2.2 Evaluation *in vitro* de la capacité d'adsorption des extraits au glucose

### ➤ Principe

Ce test repose sur la mesure de la capacité des extraits de plante à former des complexes de glycosylation avec le glucose, ce qui peut nous renseigner sur le mécanisme par lequel les

extraits peuvent avoir un effet hypoglycémiant (antidiabétique). Le glucose non adsorbé (libre) dans le milieu réactionnel est déterminé par la glucose-oxydase-peroxydase GOD-POD (Roussel *et al.*, 2020).

➤ **Mode opératoire (Roussel et al., 2020)**

Une gamme de concentration de glucose (5 ; 10 ; 50 et 100 mMol) a été incubée avec une seule concentration de chaque extrait (10 mg/ml) à 37°C pendant 1h et pendant 3h afin de favoriser la glycosylation. Pour ce test nous avons utilisé deux contrôle positif l'acide gallique et l'acarbose à une concentration 1 et 2 g/ml, respectivement. Le mode opératoire de ce test est résumé dans le **tableau n°14**.

**Tableau n°14 : Mode opératoire de test in vitro de la capacité d'adsorption au glucose des extraits de grignon et margine d'olive.**

<b>Glucose (mM)</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>Etalon</b>	<b>Banc</b>
<b>Glucose (µl)</b>	100	100	100	100		
<b>Extrait (µl)</b>	100	100	100	100		
<b>Agitation des tubes</b>						
<b>Incubation pendant 1h et 3 h à l'étuve à 37°C</b>						
<b>Dosage enzymatique du glucose (GOD-POD) kit Spinreact</b>						
<b>Extrait-glucose (µl)</b>	10	10	10	10		
<b>Etalon (µl)</b>					10	
<b>Réactif (GOD-POD)</b>	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Incubation pendant 15 min à température ambiante</b>						
<b>Mesure de l'absorbance à 510 nm</b>						

Le taux de glucose libre exprimé en mMol/g d'extrait est déterminé à partir de la formule suivante :

$$\text{Le glucose libre (mM/g extrait)} = \frac{(C_i - C_f)}{\text{Masse de l'extrait (g)}} * \text{Volume du milieu (L)}$$

**C<sub>i</sub>** : Concentration initiale du glucose.

**C<sub>f</sub>** : Concentration finale du glucose.

**C<sub>f</sub> (mM)** =  $[(DO_{\text{échantillon}}/DO_{\text{étalon}}) \times 100] \times 0,0555$  mM (SPINREACT).

**DO<sub>échantillon</sub>** : Densité optique du tube échantillon.

**DO<sub>étalon</sub>** : Densité optique du tube étalon

### III. Analyse statistique

Tous les résultats expérimentaux de cette étude représentent la moyenne de trois essais. Ces résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$ erreur-standard sur Excel 2021. Les moyennes et les IC<sub>50</sub> des échantillons ont été comparées par analyse de variance ANOVA et test de Tukey en utilisant le logiciel Minitab.16. Le seuil de signification des résultats est pris à la probabilité  $p < 0,05$ .

- Peu significative (\*) :  $P \leq 0,05$
- Significative (\*\*) :  $P \leq 0,01$
- Très significative (\*\*\*) :  $P \leq 0,001$
- Hautement significative (\*\*\*\*) :  $P \leq 0,0001$

---

# Résultats et Interprétation

---



**I. Rendement et caractéristiques des extraits de grignon et de margine d'olive**

Selon les résultats obtenus et mentionnés dans le **tableau n°**, nous avons constaté que les extraits eau-éthanol grignon frais et séché ont donné un meilleur rendement par rapports aux fractions acétate d'éthyle et n-butanol de margines, ils ont affiché 5,28% et 3,21%, respectivement. Tandis que le rendement des extraits du margine est très faible et varie entre 0,08 et 0,72%.

Les extraits de margine frais et séché sont récupérés sous forme de poudre soluble dans le mélange eau-éthanol, alors que les fractions du margine noire et marron ont été récupéré sous forme de pâte soluble dans le mélange eau-méthanol.

**Tableau n°15 : Rendement et caractéristiques des extraits de grignon et de margine d'olive.**

	<b>Aspect et couleur</b>	<b>Solubilité</b>	<b>Rendement (%)</b>
<b>Extrait eau -éthanol de grignon frais</b>	Poudre marron noirâtre	Eau-éthanol	5,28
<b>Extrait eau-éthanol de grignon séché</b>	Poudre marron noirâtre	Eau-éthanol	3,21
<b>Fraction n-butanol de margine noire</b>	Pâte huileuse marron noirâtre	Eau –méthanol	0,72
<b>Fraction n-butanol de margine marron</b>	Pâte huileuse marron noirâtre	Eau –méthanol	0,36
<b>Fraction acétate d'éthyle de margine noire</b>	Pâte huileuse marron noirâtre	Eau –méthanol	0,61%
<b>Fraction acétate d'éthyle de margine marron</b>	Pâte huileuse Jaune claire	Eau –méthanol	0,08%

**II. Screening phytochimiques**

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur les extraits du grignon et du margine sont résumées dans le **tableau n°16**. Ces résultats nous montrent que ces extraits contiennent plusieurs composés, appartenant aux différentes familles chimiques de métabolites secondaires. Selon les résultats obtenus, on remarque que l'ensemble des extraits ont révélé

un test positif pour les tanins, flavonoïdes, sucres réducteurs, alcaloïdes et quinones libres. Les terpénoïdes sont présents uniquement dans les extraits eau-éthanol du grignon frais et séché.

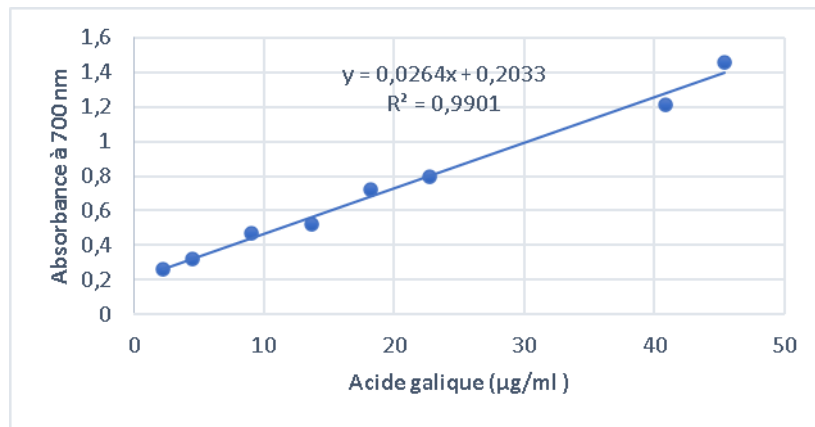
**Tableau n°16 : Criblage phytochimiques des différents extraits de grignon et margine.**

	<b>Eau-éthanol grignon frais</b>	<b>Eau-éthanol grignon séché</b>	<b>n-butanol margine noire</b>	<b>n- butanol margine marron</b>	<b>Acétate d'éthyle margine noire</b>	<b>Acétate d'éthyle margine marron</b>	
<b>Tanins</b> (Coloration verdâtre)	++	+	+++	+	+++	++	
<b>Flavonoïdes</b> Coloration jaune	+++	+	++	++	+	+++	
<b>Test de l'indice de mousse</b>	-	-	-	-	-	-	
<b>Terpénoïdes</b> (Anneau marron )	+	+	-	-	-	-	
<b>Sucre réducteurs</b> (Précipité rouge brique)	+++	-	++	++	+++	+++	
<b>Alcaloïdes Mayer</b>	++	-	++	++	+	+	
<b>Alcaloïdes Wagner</b> (Précipité marron)	++	+	++	-	+	+	
<b>Quinones</b>	Virage jaune (-)	Virage jaune (+)	Virage rouge (++)	-	Virage rouge (+++)	Virage Rouge (+++)	

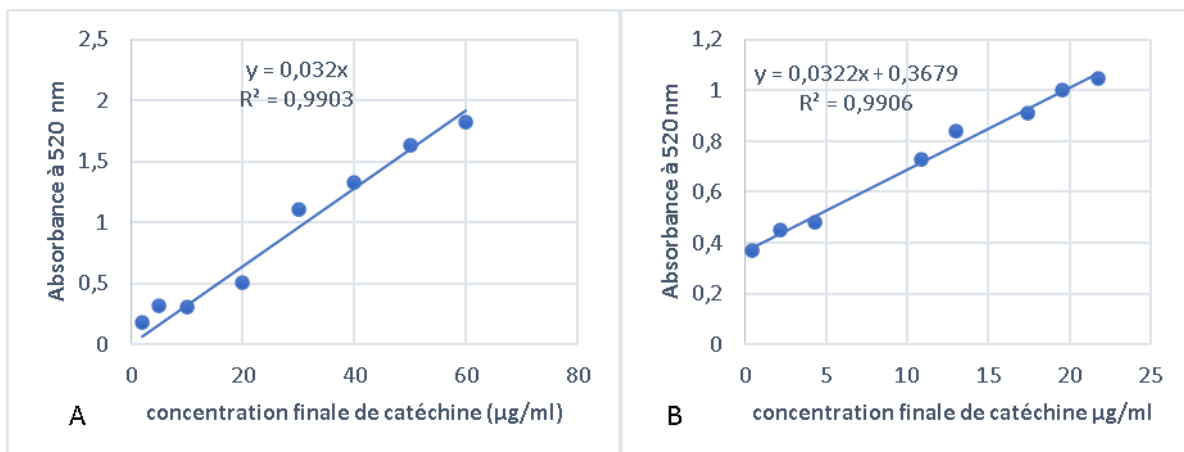
+++ : forte présence, ++ : présence moyenne, + : moyenne présence, - : absence

## II.1 Taux de composés phénoliques dans les extraits du grignon et du margine d'olive

Le taux de polyphénols, de flavonoïdes et des tanins dans les différents extraits a été déterminé à partir des équations de la régression linéaire des courbes étalon en utilisant l'acide gallique et la catéchine, respectivement (**Figure 12**).



**Figure n° 12 : Courbe étalonnage de l'acide gallique pour le dosage de polyphénols**



**Figure n° 13 : Courbe étalonnage de catéchines pour dosage de flavonoïdes (A) et dosage de Tanins (B)**

**Le tableau n°17 regroupe** les résultats obtenus concernant le taux des composés phénoliques dans les extraits de grignon et margine

Suivant les résultats on constate que le taux en polyphénols totaux le plus élevé a été enregistré dans les fractions acétate d'éthyle du margine marron et du margine noire avec un taux de 638,92 et 505,56 µg EAG/mg E, respectivement. Suivi par la fraction n-butanol du margine noire et marron, 222,25 et 163,92 µg EAG/mg E, respectivement. Les extraits eau-éthanol du grignon frais et séché renferme de faibles teneurs 72,23 et 68,07 µg EAG/mg E.

Toujours les fractions acétate d'éthyle renferment les teneurs élevées en flavonoïdes 50 et 78,13 EC/mg E, et en tanins condensés 688,71 et 917,29 EC/mg E, suivis par les fractions n-butanols et les extraits des grignons frais et séchés d'olive.

**Tableau n°17 : Taux composés phénoliques dans les extraits du grignon et du margine d'olive.**

	<b>Polyphénols</b> (ug EAG/mg E)	<b>Flavonoïdes</b> (ug EC/mg E)	<b>Tannins</b> (ug EC/mg E)	<i>p-globale</i>
<b>Eau-éthanol grignon frais</b>	68,07±0,117 F	11,56±0,156 E	69,69±0,061 E	<i>p</i> ≤0,0001
<b>Eau-éthanol grignon séché</b>	72,23±0,093 E	4,38±0,032 F	52,90±0,072 F	
<b>n-butanol margine noire</b>	222,25± 0,023 <sup>c</sup>	18,75±0,003 c	360,14±0,192 c	
<b>n-butanol margine marron</b>	163,92±0,003 D	15,63±0,006 D	145,86±0,167 D	
<b>Acétate d'éthyle margine noire</b>	505,56±0,077 B	50±0,018 B	688,71±0,097 B	
<b>Acétate d'éthyle margine marron</b>	638,92±0,006 A	78,13±0,009 A	917,29±0,019 A	

### III. Activité antioxydante des extraits de grignon et margine d'olive

Pour cette étude nous avons réalisé deux tests : le test de piégeage du radical libre DPPH et le test de réduction de fer (FRP)

#### III.1 Effet des extraits de grignon et margine sur le piégeage de radical libre DPPH

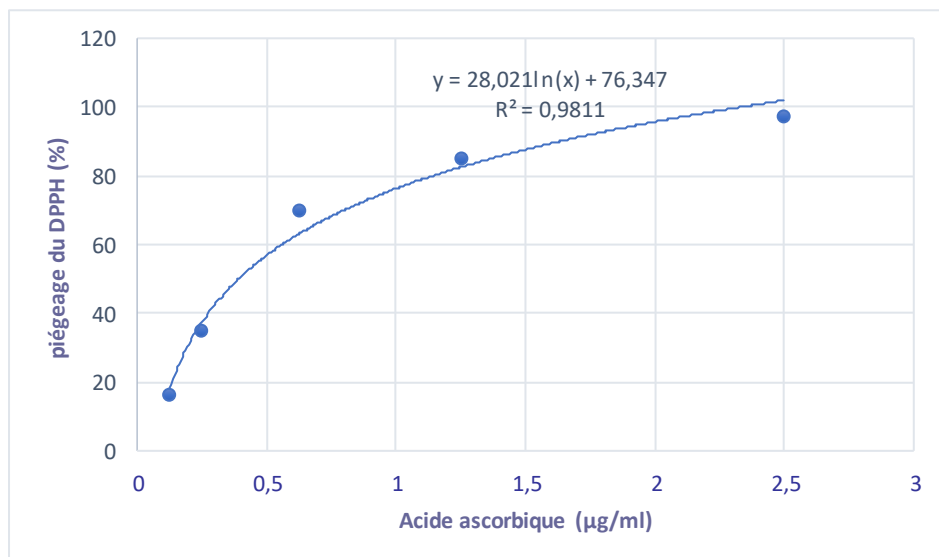
Les résultats obtenus de l'effet du piégeage du radical DPPH par l'acide ascorbique et par les extraits du grignon et margine sont représentés dans le **tableau n°19 et n°20**.

Selon les résultats obtenus, nous avons calculées à partir de l'équation de la régression logarithmique (**Figures n°15 et (1 et 2 (annexe))**) la concentration correspond à 50% du piégeage du DPPH (IC<sub>50</sub>) pour les six extraits et l'acide ascorbique.

Dans le **tableau n°18**, on remarque une augmentation du pourcentage de réduction du radical DPPH proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'acide ascorbique, ce dernier à la concentration 2,5µg/ml arrive à réduire 97,1% du DPPH avec une IC<sub>50</sub>de0,390 µg/ml.

**Tableau n° 18 : Effet antioxydant de l'acide ascorbique sur la réduction du DPPH exprimé en.**

Extrait	Acide Ascorbique (µg/ml)					IC <sub>50</sub> (µg/ml)
	0,125	0,25	0,625	1,25	2,5	
<b>A. Ascorbique</b>	16,43 ±0,003	34,78 ±0,045	70,05 ±0,034	85,02 ±0,038	97,1 ±0,006	0,390 ±0,039



**Figure n°14 : Effet antioxydant de l'acide ascorbique sur la réduction du DPPH exprimé en pourcentage**

**Le tableau n° 19**, montre que les différents extraits du grignon et du margine présentent un effet antiradicalaire proportionnel à la concentration de chaque extrait. Les extraits eau-éthanol du grignon frais et séché à faible concentration 0,625 µg/ml révèlent une réduction du DPPH de 28,70 % à 12,56%, tandis que les fractions acétate d'éthyle du margine noire et

marron ainsi que les fractions n-butanol à cette même concentration arrivent à une réduction qui varie entre 52,47% et 67,14 %.

La comparaison des valeurs de IC<sub>50</sub> nous à permis de distinguer l'effet antiradicalaire puissant de ces extraits notamment les fractions acétates d'éthyles du margine noire et marron qui ont affiché des valeurs intéressantes 0,521 et 0,402 µg/ml, respectivement. Ces valeurs sont très proches de IC<sub>50</sub> déterminé pour l'acide ascorbique (0,390 µg/ml). De même les fractions n-butanol du margine noire et marron ont présenté des valeurs intéressantes de IC<sub>50</sub> 3,21 et 2,31µg/ml. L'extrait eau-éthanol du grignon frais et séché ont également affiché des valeurs remarquables 8,19 et 14,11 µg/ml (**figure n° :15**)

**Tableau n° 19 : Effet antioxydant des extraits du grignon et du margine sur la réduction du DPPH exprimé en Pourcentage (%).**

	Concentration des extraits (µg/ml)								IC <sub>50</sub> (µg/ml)
	0,625	2,25	4,5	6	10	25	50	75	
<b>Grignons frais</b>	-	-	36,11 ±0,044	41,67 ±0,006	51,85 ±0,017	84,72 ±0,015	89,35 ±0,013	92,59 ±0,013	8,19 ±0,011
<b>Grignons séché</b>	-	-	15,46 ±0,018	30,43 ±0,021	36,23 ±0,006	67,63 ±0,019	85,02 ±0,013	98,07 ±0,003	14,11 ±0,010
<b>n-butanol margine noire</b>	30,09 ±0,009	32,87 ±0,029	55,09 ±0,009	-	-	93,06 ±0,018	94,44 ±0,013	95,37 ±0,009	3,21 ±0,069
<b>n-butanol margine marron</b>	34,98 ±0,018	46,50 ±0,027	52,47 ±0,004	-	-	94,24 ±0,022	97,12 ±0,003	-	2,31 ±0,027
	Concentration finale de l'extrait (µg/ml)							IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	0,125	0,25	0,625	2,25	4,5	6			
<b>Acétate d'éthyle de margine noire</b>	22,38 ±0,012	34,29 ±0,072	55,24 ±0,038	77,62 ±0,015	94,69 ±0,003	95,17 ±0,007	0,521 ±0,055		
<b>Acétate d'éthyle de margine marron</b>	23,81 ±0,013	37,62 ±0,024	67,14 ±0,017	87,14 ±0,021	96,62 ±0,007	98,55 ±0,003	0,402 ±0,021		

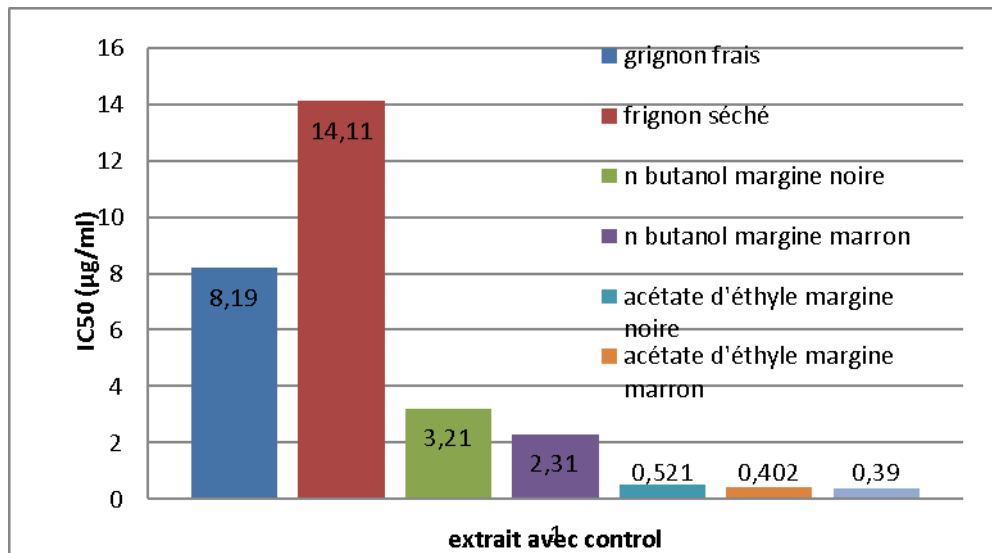


Figure n° 15 : Les valeurs de IC50 déterminées pour l'acide ascorbique et les extraits de grignons et margine d'olive

### III.2 Effet des extraits du grignon et du margine d'olive sur la réduction du Fer (FRP)

Le potentiel antioxydant des extraits de Grignons et Margines en termes de réduction du fer a été évalué en utilisant le BHA (Butyl Hydroxy Anissole) et l'acide ascorbique comme contrôles positifs. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau n°21,22** et **figure n° 16** et **figure 3 (annexe)**

Le potentiel antioxydant des extraits du grignon et du margine en termes de réduction du fer a été évalué en utilisant le BHA (Butyl Hydroxy Anissole) et l'acide ascorbique comme contrôles positifs. Les résultats obtenus sont présentés dans **la figure n°17**

On observe que le l'acide ascorbique affiche un pouvoir réducteur du fer remarquable dont la concentration efficace moyenne (EC<sub>50</sub>), qui correspond à une absorbance de 0,5, arrive à 17,30 µg/ml. Le BHA (Butyl Hydroxy Anissole) qui arrive à 25,25 µg/ml.

Tableau n° 20 : Effet de l'acide ascorbique du BHA sur la réduction du fer.

	Concentration (µg/ml)							EC <sub>50</sub> (µg/ml)
	1	2	4	8	17	33	67	
<b>Absorbance A. ascorbique (700 nm)</b>	0,01 ±0,003	0,08 ±0,012	0,1 ±0,012	0,29 ±0,007	0,47 ±0,021	0,89 ±0,052	1,97 ±0,033	17,30 ±0,036
<b>Absorbance BHA (700 nm)</b>	0,05 ±0,003	0,07 ±0,003	0,11 ±0,003	0,22 ±0,008	0,41 ±0,007	0,68 ±0,013	1,28 ±0,104	25,25 ±0,010

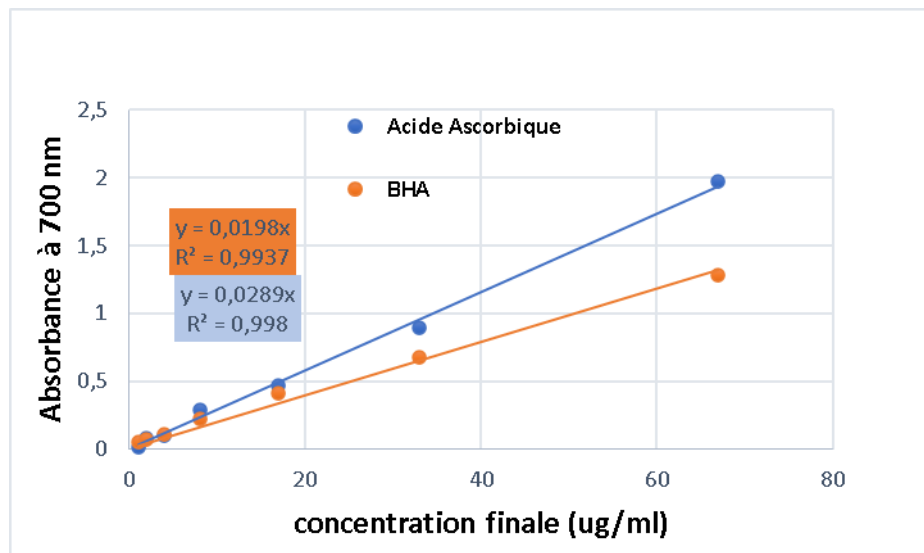


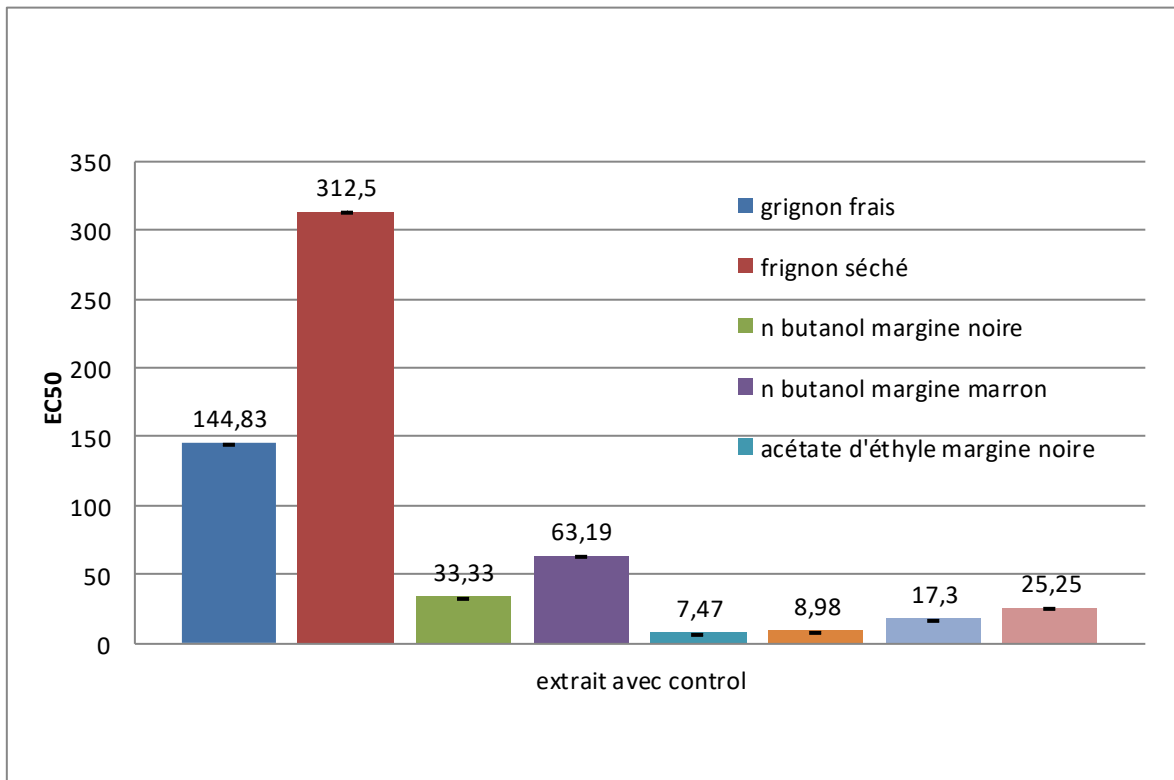
Figure n° 16 : Effet de l'acide ascorbique du BHA sur la réduction du fer

Dans le cas des extraits nous avons observé que les fractions acétates d'éthyles du margine noire et marron ont assuré une réduction du fer plus intéressante que l'effet des molécules de référence, dont les valeurs de EC<sub>50</sub> obtenus respectivement sont 7,47 et 8,98 µg/ml. Les fractions n-butanols ont également enregistré un effet réducteur très intéressant exprimé en valeur EC<sub>50</sub> de 33,33 et 63,19 µg/ml. Les extraits du margine frais et séchés ont montré un faible effet par rapports aux autres extraits, les EC<sub>50</sub> observées sont 144,83 et 312,5 µg/ml, respectivement.



Tableau n 21 : Absorbances de l'effet des extraits du grignon et du margine d'olive sur la réduction du fer des extraits sur la réduction du fer (méthode du FRP).

	Concentration finale des extraits (µg/ml)									Ec <sub>50</sub>
	4	8	15	30	40	67	167	333	500	
Grignon frais	0,05 ±0,003	0,11 ±0,012	0,04 ±0,010	0,11 ±0,003	0,14 ±0,012	0,32 ±0,009	0,52 ±0,012	0,75 ±0,012	-	144,83 ±0,010
Grignon Séché	0,02 ±0,003	0,04 ±0,009	0,04 ±0,006	0,06 ±0,003	0,10 ±0,003	0,11 ±0,009	0,34 ±0,012	0,53 ±0,004	0,76 ±0,015	312,5 ±0,013
n-butanol de margine noire	0,10 ±0,003	0,15 ±0,006	0,24 ±0,020	0,44 ±0,021	0,53 ±0,024	1,04 ±0,003	-	-	-	33,33 ±0,022
n-butanol de margine marron	0,07 ±0,003	0,08 ±0,007	0,13 ±0,17	0,17 ±0,003	0,23 ±0,035	0,52 ±0,009	0,74 ±0,009	1,42 ±0,009	2 ±0,003	63,19 ±0,022
	Concentration finale des extraits (µg/ml)								Ec <sub>50</sub>	
	0,03	1,7	2,5	4,2	8	15	30			
Acétate d'éthyle de margine noire	0,01 ±0,003	0,17 ±0,007	0,26 ±0,015	0,33 ±0,007	0,52 ±0,009	-	2 ±0,003	7,47 ±0,008		
Acétate d'éthyle de margine marron	0,01 ±0,003	0,02 ±0,003	0,05 ±0,007	0,17 ±0,003	0,50 ±0,006	0,86 ±0,003	1,67 ±0,009	8,98 ±0,005		



**Figure n° 17 : Valeurs de EC50 de l'effet de BHA et l'acide ascorbique des extraits de grignons et margines sur la réduction du fer (FRP)**

#### IV. Effet antidiabétique des extraits du grignon et du margine d'olive

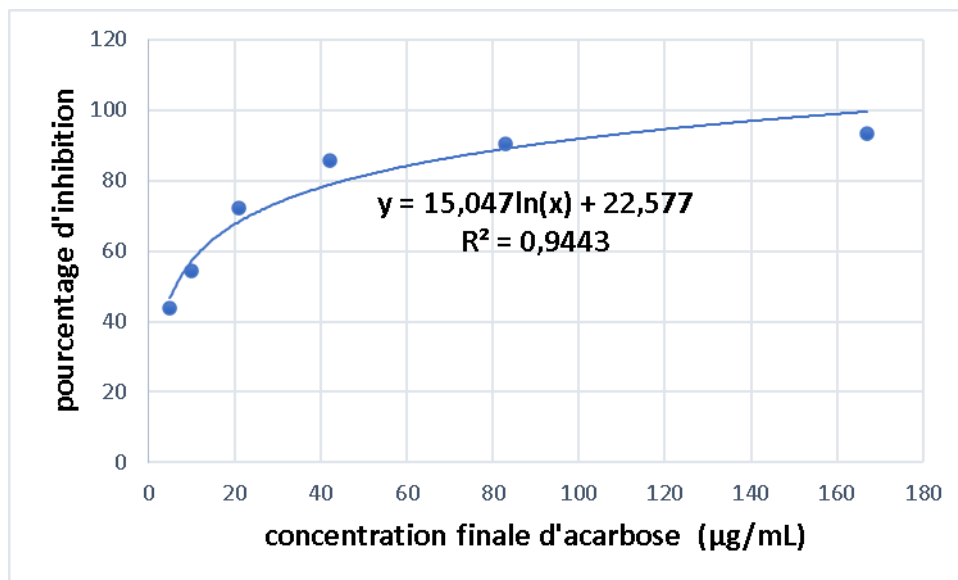
Dans cette étude, nous avons utilisé deux tests *in vitro*, le test de l'inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -amylase et le test de la capacité d'adsorption au glucose.

##### IV.1 Effet des extraits sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

L'acarbose a été utilisé comme molécule de référence pour contrôler l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase. Les pourcentages obtenus sont illustrés dans le tableau n°22. Cette molécule se distingue par son effet inhibiteur, présentant des taux élevés même à des concentrations très faibles dans ce test, à une concentration de 167  $\mu$ g/ml l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase est de 93,47%. De plus, son IC<sub>50</sub> est de 6,19  $\mu$ g/ml, ce qui confirme son potentiel inhibiteur.

**Tableau n°22 : Effet de l'acarbose sur l'inhibition de l'activité de l'α-amylase exprimé en pourcentage.**

	Concentration finale d'acarbose (µg/ml)						IC <sub>50</sub>
	5	10	21	42	83	167	
<b>Le pourcentage d'inhibition de l'α-amylase</b>	43,99 ±0,048	54,3 ±0,007	72,16 ±0,006	85,57 ±0,006	90,38 ±0,003	93,47 ±0,003	6,19 ±0,027



**Figure n° 18 : Effet d'acarbose sur l'inhibition de l'activité de l'α-amylase exprimé en pourcentage**

les résultats de l'effet des extraits sur l'activité de l'α-amylase sont présentés dans le **tableau n°23 et figure n° 18**, Selon ces résultats nous avons remarqué que l'ensemble des extraits du grignon et du margine ont montré un effet inhibiteur de l'amylase très prometteur, en particulier la fraction n-butanol du margine marron qui présente l'inhibition la plus remarquable de l'α-amylase (IC<sub>50</sub>= 0,232µg/ml), suivie par les fractions acétate d'éthyle du margine et margine noire, 0,73 et 0,95 µg/ml, respectivement. La fraction n-butanol du margine marron et l'extrait eau-éthanol du grignon frais ont affiché des valeurs intéressantes de IC<sub>50</sub> 1,50 et 4,99 µg/ml, suivi par l'extrait eau-éthanol du grignon séché 7,58 µg/ml

Tableau n° 23 Effet des extraits de grignons et margine sur l'activité de l' $\alpha$  amylase exprimé en pourcentage d'inhibition.

	Concentration finale de l'extrait ( $\mu\text{g/ml}$ )								Ic50
	0,2	0,3	0,7	1	1,7	8	17	30	
Grignon frais	-	-	-	-	51,09 $\pm 0,006$	56,52 $\pm 0,015$	60,87 $\pm 0,012$	64,49 $\pm 0,003$	1,50 $\pm 0,006$
Grignon séché	-	25,66 $\pm 0,006$	30,53 $\pm 0,020$	-	-	51,81 $\pm 0,003$	57,25 $\pm 0,012$	59,06 $\pm 0,003$	7,58 $\pm 0,012$
	Concentration finale de l'extrait ( $\mu\text{g/ml}$ )							Ic50	
	0,2	0,3	0,7	1	1,7	4			
N-butanol de margine noire	38,05 $\pm 0,031$	39,82 $\pm 0,029$	-	43,95 $\pm 0,003$	46,31 $\pm 0,007$	-	4,99 $\pm 0,005$		
N-butanol de margine marron	47,49 $\pm 0,003$	51 $\pm 0,020$	59,29 $\pm 0,006$	60,77 $\pm 0,012$	61,95 $\pm 0,031$	-	0,232 $\pm 0,012$		
Acétate d'éthyle de margine noire	37,46 $\pm 0,012$	39,82 $\pm 0,020$	-	52,21 $\pm 0,024$	61,06 $\pm 0,016$	67,28 $\pm 0,003$	0,73 $\pm 0,026$		
Acétate d'éthyle de margine marron	32,42 $\pm 0,012$	34,51 $\pm 0,030$	39,32 $\pm 0,017$	50 $\pm 0,003$	-	73,77 $\pm 0,012$	0,95 $\pm 0,010$		

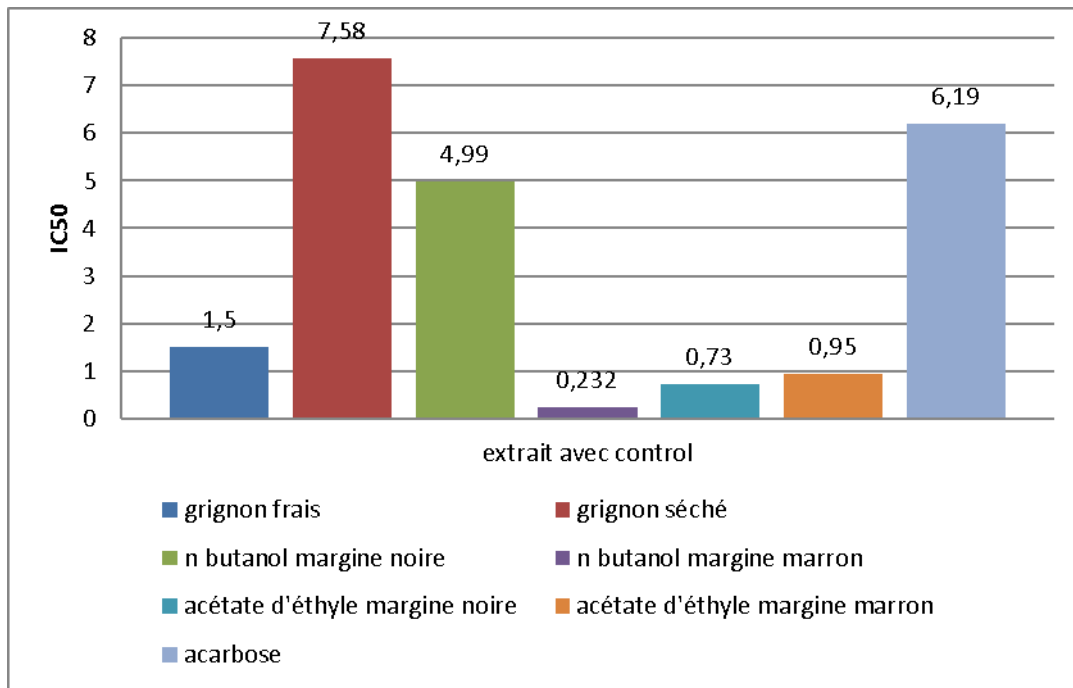


Figure n° 18: Valeurs de IC50 de de l'effet des extraits du grignon et du margine d'olive et l'acarbose sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

#### IV.2 Effet d'adsorption au glucose des extraits du grignon et du margine d'olive

Pour évaluer l'activité antidiabétique des extraits du grignon et du margine, nous avons testé *in vitro* l'effet de différentes concentrations de chaque extrait sur la capacité d'adsorption au glucose. L'acide gallique et l'acarbose ont été utilisés comme contrôles positifs. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure n° 19 et n°20.

L'ensemble des extraits du grignon et du margine d'olive à faible concentration du glucose pendant 1h et 3h révèlent une faible adsorption du glucose. Tandis que à forte augmentation ces extraits montrent une légère augmentation d'adsorption au glucose à l'exception de la fraction acétate d'éthyle du margine marron qui a affiché une forte adsorption et qui arrive à 16,29 mM/g d'extrait. L'effet de cette fraction est comparable à l'effet du contrôle positif l'acide gallique qui assure une adsorption de 17,75 mM/g.

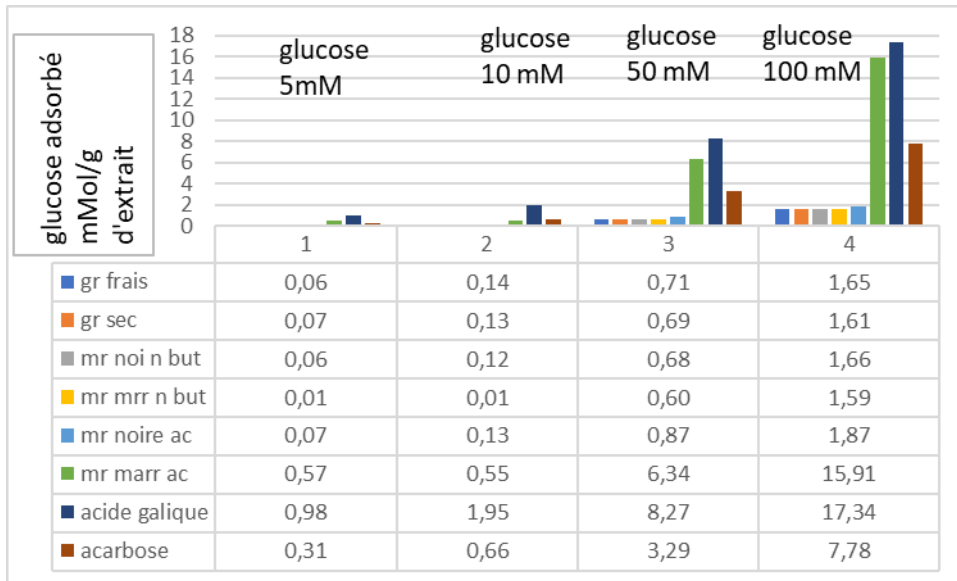


Figure n° 19 : La capacité d'adsorption au glucose des extraits du grignon et du margine d'olive après 1h d'incubation

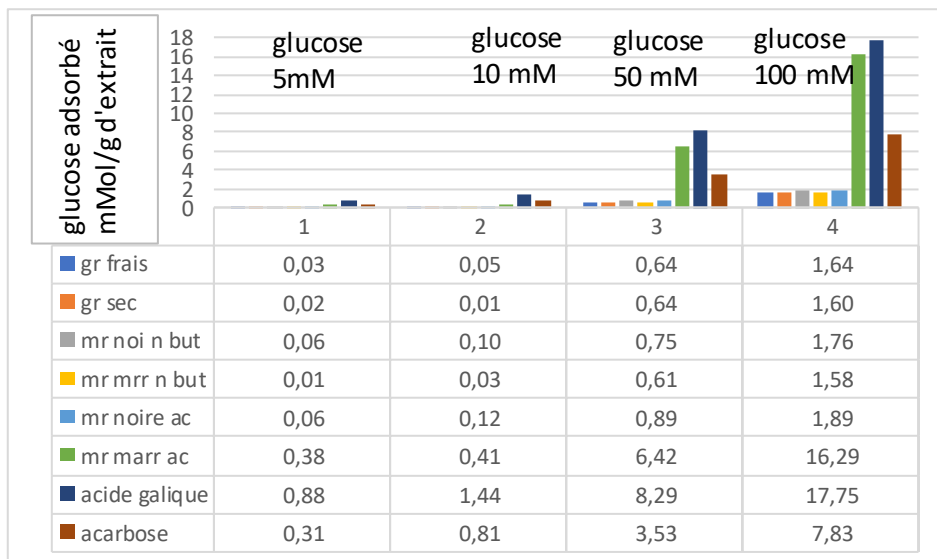


Figure n° 20 : La capacité d'adsorption au glucose des extraits du grignon et du margine d'olive après 3h d'incubation.

Analyse statistique des résultats statistique

D'après le test de l'Anova à deux variables sur minitab.16 tous les extrait présentent une différence hautement significative  $p\text{-value} = 0.0001 \leq 0.05$ .

Tableau n°24 : Analyse statistique de l'Anova et Tukey sur Minitab.

	IC <sub>50</sub> DPPH	EC <sub>50</sub> FRAP	IC <sub>50</sub> (l' $\alpha$ -Amylase)
<b>Grignon frais</b>	8,19±0,011****B	144,83±0,010****B	1,50±0,006****D
<b>Grignon séché</b>	14,11±0,010****A	312,5±0,013****A	7,58±0,012****A
<b>N butanol margine noire</b>	3,21±0,069****C	33,33±0,022****D	4,99±0,005****C
<b>n-butanol margine marron</b>	2,31±0,027****D	63,19±0,022****C	0,232±0,012****G
<b>Acétate d'éthyle margine noire</b>	0,521±0,055****E	7,47±0,008****H	0,73±0,026****F
<b>Acétate d'éthyle margine marron</b>	0,402±0,021****F	8,98±0,005****G	0,95±0,010****E
<b>Acide ascorbique (DPPH)</b>	0,390±0,039****F	-----	-----
<b>Acide ascorbique (FRAP)</b>	-----	17,30±0,036****F	-----
<b>BHA (FRAP)</b>	-----	25,25±0,010****E	-----
<b>Acarbose (l'<math>\alpha</math>- Amylase)</b>	-----	-----	6,19±0,027****B

---

---

# Discussion

---

---



La présente étude a pour objectif est d'évaluer *in vitro* le pouvoir antioxydant et antidiabétique des extraits du grignon et du margine d'olive variété Sigoisse, provenant de la région de Sabra, située dans la wilaya de Tlemcen.

Les extraits eau-éthanol du grignon frais et séché ont été récupérés sous forme de poudre solide de couleur marron noirâtre, avec de meilleurs rendements 5,28 % et 3,21 %, respectivement. Nos résultats concordent avec ceux de **Gómez-Cruz *et al.*, (2020)** qui ont constaté que le mélange eau-éthanol contribue à la création d'un milieu modérément polaire, ce qui permet d'obtenir la meilleure efficacité d'extraction ainsi que le meilleur rendement pour les grignons. En effet la sélection des solvants est un facteur crucial dans l'extraction de composés bioactifs, parmi les solvants : éthanol, acétone et l'acétate d'éthyle ont été largement utilisé en raison de leur faible toxicité et leur autorisation par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA)

Les résultats obtenus confirment ceux de l'étude menée par **De Bruno *et al.*, (2018)** sur le grignon d'olives, qui ont démontré que le mélange eau-éthanol améliore l'efficacité d'extraction par rapport à l'éthanol seul. **Chewet *et al.*, (2011)** ont rapporté que l'ajout d'une petite quantité d'eau à un solvant organique crée généralement un milieu plus polaire, augmentant ainsi l'efficacité d'extraction des polyphénols. Ils ont également observé que le système de solvants binaires était plus efficace et avantageux pour l'extraction des composés phénoliques à partir de matrices végétales, par rapport aux systèmes mono-solvants

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la richesse du grignon d'olive en diverses classes de métabolites secondaires ce qui est confirmé par plusieurs chercheurs **Ducom *et al.*, (2019)**, et **Ribeiro *et al.*, (2020)**. Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, de turbidité ou de coloration, et sont proportionnelle à la quantité de la substance recherchée.

Les teneurs des margine en composés phénoliques (CP) différent significativement entre les échantillons étudiés, les résultats obtenus ont montré que le taux en polyphénols totaux le plus élevé a été enregistré dans l'extrait acétate d'éthyle du margine marron et du margine noire avec un taux de 638,92 et 505,56  $\mu\text{g EAG/mg E}$ , respectivement. De même l'extrait acétate d'éthyle du margine marron à révéler une teneur considérable en flavonoïdes  $78,13 \pm 0,009 \text{ EC/mg E}$  et en tanins condensés  $917,29 \text{ EC/mg E}$

Nos résultats viennent renforcer l'analyse de **Gueboudji *et al.*, (2021)** qui ont révélé un taux de polyphénols dans l'extrait d'acétate d'éthyle de  $902,7 \mu\text{g EAG/mg d'extrait}$ . De plus, la

teneur totale en flavonoïdes a été déterminée en suivant une courbe d'étalonnage établie à partir de la quercétine, révélant un taux de 78,8 µg EQ/mg d'extrait d'acétate d'éthyle. Cela souligne que la complexité de la fraction phénolique du margine d'olive est caractérisé par une grande complexité dépend de degré de maturité des olives, ainsi que les conditions climatiques et les procédés technologiques utilisés pour séparer les phases huileuses et aqueuses.

La comparaison de nos résultats avec la bibliographie nous a permis de remarquer que nos valeurs sont supérieures à celle de **Tlilani et Bensaida., (2019)** qui ont déterminé une teneur en polyphénols totaux pour l'extrait du margine d'olive 185,3µg EAG/mg E et une teneur en flavonoïdes de 97,8µg EQ/mg E

D'après les résultats obtenus par **Gueboudji et al., (2021)** l'extraction des composés phénoliques du margine par macération en utilisant du méthanol comme solvant d'extraction a révélé une richesse en composés phénoliques avec une teneur de l'ordre de 641µg EAG/mL, ainsi qu'une teneur de 20,52 µg EQ/mL pour les flavonoïdes, et de 90,47 µg EAC/mL pour les tanins.

**Obeidet al., (2005)** ont démontré que l'acétate d'éthyle possède un pouvoir d'extraction élevé par rapport aux autres solvants. C'est un solvant très sélectif pour les molécules de faible (180 Da) et moyen (13 kDa) poids moléculaire. De plus, l'acétate d'éthyle s'avère un extracteur de la fraction monomérique entière du margine.

Certains facteurs influencent la composition des déchets d'olive en composés phénoliques, tels que les engrais apportés, la date de récolte d'olive, le degré de maturité des fruits, la nature de sol, les conditions climatiques, la conservation dumargine, le volume d'eau ajoutée, les pratiques culturelles et de la modalité de l'extraction de l'huile d'olive (**Prazeres et al., 2021**).

Selon **El-Abbassiet al., (2017)** la quantité et la qualité des composés phénoliques sont affectées par la perte d'un pourcentage de ces composés qui restent piégés dans les phases d'hexane et d'acétate d'éthyle lors de l'extraction liquide-liquide. De nombreuses recherches ont exploré la récupération des polyphénols du margine d'olive en utilisant une variété de techniques telles que l'extraction par solvant, l'adsorption, la séparation par membrane, les extractions par fluide supercritique, le traitement par ultrasons et les processus chromatographiques (**Soberón et al., 2019**). Ces méthodes visent à obtenir soit un composé

phénolique spécifique dans sa forme pure, soit un mélange de phénols sous forme de produit brut (Alonso-Riaño *et al.*, 2020).

L'activité antioxydante d'un composé se réfère à sa capacité à résister à l'oxydation. De nombreuses méthodes sont actuellement utilisées pour évaluer cette activité. Le radical DPPH est couramment utilisé pour analyser l'activité antiradicalaire de divers extraits végétaux. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle a été l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation entre la structure et l'activité antioxydante des composés phénoliques.

L'activité antioxydante des extraits de la fraction acétate d'éthyle du margine noire et marron augmente proportionnellement à l'augmentation de la concentration de l'antioxydant. Ils présentent une forte activité antiradicalaire en assurant de faibles valeurs de IC<sub>50</sub> 0,521 et 0,402 µg/ml, respectivement.

(Bourmad., (2011) a déterminé que les extraits acétate d'éthyle de margine rouge issue du procédé industriel et du margine noire issue du procédé traditionnel de variété chemlal exercent une meilleure activité antioxydante, puis qu'ils agissent à des doses comparables à celles des antioxydants de références (BHT, acide Ascorbique, α-tocophérol). Ils sont plus puissants que le BHT et l'α-tocophérol avec une IC<sub>50</sub> de 104 et 123,83 mg/L, et un pouvoir antiradicalaire de 0,97 et 0,80 mg/L, respectivement supérieurs à celle de l'acide ascorbique et du BHT 116,24 et 139,9 mg /L et pouvoir antiradicalaire (PAR) de 0,89 et 0,71 mg/L respectivement

Selon Karray., (2013) l'extrait acétate d'éthyle des margines hydrolysées présentait une plus grande activité antiradicalaire (IC<sub>50</sub> = 45 µg/ml) que l'extrait acétate d'éthyle des margine brutes et de l'oléuropéine. Cela est dû à la conversion de l'oléuropéine et d'autres composés verbascosides en hydroxytyrosol qui s'avère un antioxydant exceptionnel ayant une forte capacité d'élimination et d'absorption radicalaire. Cette situation pourrait être attribuée à la synergie entre l'hydroxytyrosol et d'autres composés phénoliques simples, tels que l'acide caféique et l'acide p-coumarique, qui peuvent également être libérés lors de l'hydrolyse enzymatique. Il est bien connu dans la littérature que parmi les composés phénoliques présents dans les margine, l'hydroxytyrosol et l'acide caféique présentent des propriétés antioxydantes élevées.

Nos résultats de l'activité du piégeage des radicaux libre viennent de renforcer ceux trouvés par Gueboudjiet *al.*, (2021) sachant que les résultats obtenus pour le test DPPH du margine 168,57 µg/mL, est inférieur à celle de l'acide ascorbique (174,69 µg/mL)

Tous ces auteurs ont montré que les polyphénols naturels sont des capteurs puissants des radicaux libres.

L'activité du piégeage du DPPH peut s'expliquer par les concentrations élevées en composés phénoliques tels que l'hydroxytyrosol et les acides caféïques. Cette activité antioxydante prononcée est due à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques, notamment l'oléuropéine et surtout l'hydroxytyrosol, le composé phénolique le plus représentatif dans les déchets d'olive, avec des concentrations allant de 10 à 238mg/100 g (Nunes *et al.*, 2020)

L'activité antiradicalaire dépend généralement du nombre et de la position des groupements hydroxyles par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels. La structure des composés phénoliques joue un rôle crucial dans leur capacité à piéger les radicaux libres, qui sont des agents pathogènes dans de nombreuses maladies (Abramovič *et al.* 2018)

En ce qui concerne l'activité réductrice du fer, les résultats de l'absorbance obtenus des extraits et les molécules de référence (BHA et l'acide ascorbique) révèlent un pouvoir réducteur du fer proportionnel à l'augmentation de la concentration avec une EC<sub>50</sub> de 25,25 et 17,30 µg/mL, respectivement.

Dans nos extraits nous avons observé que les fractions acétates d'éthyles du margine noires et marrons sont plus efficaces et supérieures aux molécules de référence, avec des valeurs de EC<sub>50</sub> qui varient respectivement entre 7,47 et 8,98 µg/ml.

Le pouvoir réducteur de l'olivier est principalement lié à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques essentiellement l'oléuropéine et l'hydroxytyrosol qui peuvent servir comme donneur d'électron (ADDAB *et al.*, 2020)

Nos résultats concordent avec ceux de Gueboudji *et al.*, (2023), qui ont observé que les extraits du margine obtenus par extraction liquide-liquide (11,56 µg/ml) présentaient une activité antioxydante bien plus élevée que celle du Trolox (17,06 µg/ml) et du BHT (20,05 µg/ml).

Plusieurs études ont montré que l'activité antioxydante dépend de la concentration totale en polyphénols, des structures antioxydantes, ainsi que du temps de réaction (Abramovič *et al.* 2018)

L'augmentation du glucose sanguin postprandial résulte de l'hydrolyse des glucides par les enzymes  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase. L' $\alpha$ -amylase salivaire transforme les glucides en

disaccharides et oligosaccharides, puis l' $\alpha$ -glucosidase les convertit en monosaccharides comme le glucose, qui est ensuite absorbé dans le sang (**Mwakalukwa et al.,2020**)

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet des extraits du grignon et du margine d'olive sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase étant donné que les olives ont été associées à diverses activités biologiques telles que des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, il est plausible que ces activités puissent indirectement contribuer à atténuer le stress oxydatif associés au diabète.

Nos résultats indiquent que la fraction n-butanol de margine marron présente une inhibition ( $IC_{50}$ = 0,232  $\mu$ g/ml) nettement supérieure à celle d'autres extraits, et nettement supérieur à celle de l'acarbose ( $IC_{50}$ =6,19  $\mu$ g/ml suivi par la fraction acétate d'éthyle du margine marron et noire qui atteint un pourcentage de 67,28 et 73,77 à une faible concentration de 4  $\mu$ g/ml avec une  $IC_{50}$  de 0,73et 0,95respectivement.

Les margine d'olive et leur fractions enrichies en polyphénols obtenus par nanofiltration (NF) et reverse osmotique (RO) ont été examinées comme des agents potentiels pour inhiber les enzymes telles que l' $\alpha$ -amylase, l' $\alpha$ -glucosidase et la lipase *in vitro*. La fraction d'osmose inverse a montré une inhibition de l'enzyme avec une valeur de  $IC_{50}$  de 65,3 $\mu$ g/ml suivi par la fraction de nanofiltration avec une  $IC_{50}$  de 122,6 $\mu$ g/ml proche à l'acarbose 50,1 $\mu$ g/ml. En effet la fraction de l'osmotique inverse est celle qui présente le plus haut contenu en composés bioactifs, en particulier, la teneur en hydroxytyrosol dans cette fraction était environ cinq fois plus élevée que dans l'alimentation, et d'autres composés tels que le tyrosol, l'oléuropéine, la verbascoside, l'acide vanillique et la lutéoline (**Tundis et al.,2020**)

**Hadrich et al., (2015)** ont exploré les effets inhibiteurs de l'hydroxytyrosol et de l'oléuropéine sur l'activité des enzymes  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase, impliquées dans la digestion des glucides et la régulation de la glycémie. Leurs résultats suggèrent que ces composés pourraient offrir une stratégie thérapeutique prometteuse pour contrôler l'hyperglycémie. Leur étude a révélé que l'hydroxytyrosol, en particulier, a montré une forte activité inhibitrice sur l' $\alpha$ -glucosidase, avec une ( $IC_{50}$  de 150  $\mu$ M, tandis que son effet sur l' $\alpha$ -amylase était plus modéré. Cette efficacité était supérieure à celle de l'acarbose ( $IC_{50}$  de 400  $\mu$ M), utilisé comme contrôle positif

L'hydroxytyrosol a montré des effets antidiabétiques similaires à ceux de l'insuline sur diverses cellules cibles, comme les hépatocytes, les adipocytes et les cellules musculaires, selon les résultats des études *in vitro* et *in vivo* d'une revue récente, comme il offre une

protection contre le stress oxydatif, l'hyperlipidémie et l'hyperglycémie dans des modèles animaux (**Vlavcheski et al., 2019**).

L'hydroxytyrosol possède une structure polaire qui lui permet d'interagir fortement avec les enzymes ( $\alpha$ -glucosidase). Il est prévu que l'interaction entre l'enzyme et les conjugués phénoliques glycosidiques soit plus intense qu'avec les molécules non glycosidiques. Selon **Hadrich et al., (2015)** les résultats indiquent que l'acide gallique, l'acide vanillique, la quercétine et l'acide p-coumarique, isolés des feuilles d'olivier, sont des inhibiteurs puissants. Les pourcentages d'inhibition, respectivement de 67,7%, 71,9%, 73,5% et 62,5%, montrant une inhibition incompétitive. La nature incompétitive de cette inhibition suggère que ces composés se lient à un site distinct du site actif de l'enzyme, probablement après que l'enzyme a formé un complexe avec le substrat. Cette forme d'inhibition est particulièrement intéressante car elle peut offrir une régulation plus fine de l'activité enzymatique et potentiellement réduire les effets secondaires associés à l'inhibition complète de l'enzyme.

Cependant les extraits d'*Olea europaea* montrent une faible activité antidiabétique par rapport au standard l'acarbose justifié par la présence de Tannins, une des principales classes de composés phénoliques comprend des molécules qui inhibent diverses enzymes hydrolytiques, telles que les  $\alpha$ -amylases, les  $\alpha$ -glucosidases et les lipases, de manière non spécifique. Cette inhibition est probablement due à leur forte capacité à se lier aux protéines et aux glucides, grâce à de multiples liaisons hydrogène et interactions hydrophobes entre les tanins et les protéines. Cette interaction entraîne le blocage des sites catalytiques des enzymes, inhibant ainsi leur activité (**Aparecida et al., 2019**).

Nos résultats renforcent l'intérêt des extraits du margine d'olive en tant que source prometteuse de composés essentiels pour les formulations antidiabétiques, les compléments alimentaires ou le développement de nouveaux médicaments contre le diabète. Ainsi, il convient de souligner l'importance du margine (et ces métabolites) pour les recherches futures, ainsi que pour la prévention et/ou le traitement du diabète de type 2

Nous avons également vérifié *in vitro* l'activité antidiabétique par le test de la capacité d'adsorption au glucose. Il est observé que l'extrait acétate d'éthyle du margine marron, à une concentration de 1 mg/ml, présente un taux élevé d'adsorption de 16,29 mM/g à une concentration du glucose de 100 mM/g après 3 heures d'incubation, similaire à l'acide gallique qui révèle un taux d'adsorption de 17,75 mM/g à cette même concentration de

glucose, et significativement plus élevé que celui de l'acarbose, qui a enregistré un taux d'adsorption de 7,83 mM/g.

Divers chercheurs ont utilisé la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour identifier les composés phénoliques présents dans les margine d'olive après une extraction liquide-liquide, notamment Un groupe de polyphénols dérivé de l'acide cinnamique, tels que l'acide cinnamique, l'acide p-coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique. Un autre groupe dérivé de l'acide benzoïque : acide benzoïque, acide p-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide vanillique, acide vétratrique, acide gallique, acide syringique et des dérivés du  $\beta$ -3,4-dihydroxyphényléthanol, tels que le tyrosol, l'hydroxytyrosol et le 3,4-dihydroxyphénylglycol (**El-Abbassiet *al.*,2017**)

L'acide quinique a été identifié comme le composé le plus abondant par extraction liquide-liquide du margine et d'autres composés comprennent l'acide quinique, la catéchine, l'acide caféique, la rutine, l'hyperoside (quercétine-3-O-galactoside), le lutéoline-7-O-glucoside, la naringine, l'acide 4,5-di-O-caféoylquinique, le quercétrine, l'apigénine-7-O-glucoside, l'acide salvioquinique, le kaempférol, la quercétine, la naringénine, l'apigénine et le cirsiol (**Gueboudji *et al.*,2023**)

Selon l'analyse de docking moléculaire des propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME), l'acide gallique et la quercétine sont également de puissants inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase et peuvent être utilisés comme alternative pour la régulation de l'hyperglycémie postprandiale (**Abdelli *et al.*,2021**)

Notre travail est original car aucune recherche scientifique n'a été entreprise auparavant sur l'effet d'adsorption des déchets d'olive sur le glucose. Cette lacune dans la littérature scientifique nous a incités à explorer cette question et à évaluer l'effet potentiel des extraits de déchets d'olive sur l'adsorption du glucose. Nos résultats contribuent ainsi à enrichir les connaissances dans ce domaine et ouvrent la voie à de nouvelles pistes de recherche sur les applications thérapeutiques des déchets d'olive dans le domaine de la santé métabolique, notamment dans le contexte du diabète et des troubles liés au métabolisme des glucides.

On conclut que la fraction acétate d'éthyle du margine marron a un effet d'adsorption au glucose proportionnel à la concentration du glucose qui est similaire à l'acide gallique. Ce dernier est un acide benzoïque identifier par plusieurs chercheurs et il a un fort potentiel d'adsorption et inhibition des enzymes clés ( $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase) liés à la digestion

des glucides et à l'élévation des niveaux de glucose sanguin. Cette similitude dans les effets suggère que l'extrait du margine marron pourrait être prometteur dans la régulation de la glycémie, notamment en inhibant l'absorption des glucides et en réduisant ainsi les pics de glycémie postprandiale. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces observations et explorer le potentiel thérapeutique de cet extrait dans le contexte de la gestion du diabète et des troubles métaboliques associés.

Selon **Dib et Sahki., (2014)** une étude a été réalisée sur le pouvoir d'adsorption du margine sur la DEAE-cellulose. Ils ont constaté que l'ensemble des analyses indiquaient que l'adsorption par la cellulose n'était pas sélective, comme le montrent les spectres RMN et IR qui ne présentent pas de différences notables entre les échantillons du margine et de cellulose avant et après adsorption. L'étude a également révélé qu'un seul facteur influence l'adsorption des composés phénoliques : le volume du margine utilisé ( $V_m$ ), en interaction avec le rapport massique.



---

# **Conclusion**

---

L'industrie de l'huile d'olive est très importante dans les pays méditerranéens. L'extraction de l'huile d'olive génère d'énormes quantités de déchets, ce qui peut avoir un impact considérable sur les environnements terrestres et aquatiques en raison de leur forte phytotoxicité.

Dans le but de valorisation des déchets et le développement de stratégies durables, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation de pouvoir antioxydant et antidiabétique des extraits du grignon et du margine d'olive issue de variété algériennes : sigoisse provenant de la région de sabra de la wilaya de Tlemcen.

L'étude comparative entre les extraits a révélé la richesse des extraits du grignon et du margine en polyphénols totaux, en flavonoïdes, et en tannins condensés, en particulier les fractions du margine noire et marron. Cette teneur élevée en composés phénoliques a assuré un pouvoir antiradicalaire, réducteur du fer, et inhibiteur de l' $\alpha$ -amylase très prometteur pour les extraits du margine et du grignon d'olive

Ces résultats confirment l'intérêt de la valorisation de déchets d'olive, vu leur teneurs considérables en divers composés phénolique piégeant les radicaux libres qui sont à l'origine de nombreux effets nocifs pour l'organisme.

Des recherches supplémentaires sur les applications potentielles devraient être accordées afin de ;

- Isoler le principe actif de margine d'olive et identifier les composés bioactifs responsables des activités antioxydantes et antidiabétiques observées.
- Développer des formulations à base d'extraits de grignons et margines pour des applications cosmétiques, alimentaires ou pharmaceutiques.
- Évaluer les effets des extraits sur des modèles animaux afin de confirmer leur potentiel thérapeutique.
- Développer des méthodes d'extraction vertes et efficaces pour garantir une récupération plus élevée de ces composés et la coopération entre l'industrie et les chercheurs afin de générer une valeur ajoutée durable à ces sous-produits.

---

---

## **Références bibliographiques**

---

---

A

**Abbattista, R., Ventura, G., Calvano, C. D., Cataldi, T. R., & Losito, I.** (2021). Bioactive compounds in waste by-products from olive oil production: Applications and structural characterization by mass spectrometry techniques. *Foods*, 10(6), 1236

**Abdelhadi, S. O., Dosoretz, C. G., Rytwo, G., Gerchman, Y., & Azaizeh, H.** (2017). Production of biochar from olive mill solid waste for heavy metal removal. *Bioresource Technology*, 244, 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.013>

**Abdelli, I., Benariba, N., Adjdir, S., Fekhikher, Z., Daoud, I., Terki, M., ... & Ghalem, S.** (2021). In silico evaluation of phenolic compounds as inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(3), 816-822.

**Abramovič H, Grobin B, PoklarUlrih N, Cigić B** (2018): Relevance and standardization of in vitro antioxidant assays: ABTS, DPPH, and Folin–Ciocalteu. *Journal of Chemistry* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4608405>

**Aggoun, M., Arhab, R., Cornu, A., Portelli, J., Barkat, M., & Graulet, B.** (2016). Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process. *Food chemistry*, 209, 72-80.

**Aggoun-Arhab, M., Barkat, M., & Graulet, B.** (2016). *Caractérisation de la composition en microconstituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).

**Aggoun-Arhab.** (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 l'Université Frères Mentouri Constantine

**Ahmed P.M., Fernandez P.M., Figueroa L.I.C. And Pajot H.F.** (2020). Exploitation alternatives of olive mill wastewater: production of value-added compounds useful for industry and agriculture. *Biofuel. Res. J.*, 22, 980-994.

**Ajmia., Chouchene ;**(2010) : étude expérimentale et théorique de procédés de valorisation de sous-produits oléicoles par voies thermiques et physico-chimiques. Thèse de doctorat. UNIVERSITE DE HAUTE-ALSACE.

**Aliakbarian B, Sampaio FC, De Faria JT, Gpitangui C, Lovaglio F, CasazzaAA, Converti A et Perego P**, (2018). Optimization of Spray Drying Microencapsulation of Olive Pomace Polyphenols Using Response Surface Methodology and Artificial Neural Network. *LWT - Food Science and Technology*. 93: 220–228.

**Alonso-Riaño P, Sanz Diez MT, Blanco B, Beltrán S, Trigueros E, Benito-Román O** (2020) Water ultrasound-assisted extraction of polyphenol compounds from brewer's spent grain: Kinetic study, extract characterization, and concentration. *Antioxidants* 9:265. <https://doi.org/10.3390/antiox9030265>

**Amic A. Et Dalmasso C.** (2013) - Unité de valorisation complète de déchets oléicoles par lombricompostage : Production de produits à haute valeur ajoutée : lombricompost, savon, collagène et lombrics. Thèse de Doctorat. Université Aix-Marseille (AMU), 32p

**Amrani, F.** (2010). *Etude de l'effet des radiations micro-ondes sur l'extraction par solvant de l'huile à partir de grignon d'olive* (Doctoral dissertation, Thèse de magister. UMMTO).

**Anastopoulos, I., Massas, I., & Ehalotis, C.** (2015). Use of residues and by-products of the olive-oil production chain for the removal of pollutants from environmental media: A review of batch biosorption approaches. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 50(7), 677–718. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1011964>

**Aparecida Braga, M., Silva de Abreu, T., Cardoso Trento, M. V., Henrique Andrade Machado, G., Lopes Silva Pereira, L., Assaid Simão, A., & Marcussi, S.** (2019). Prospection of enzyme modulators in aqueous and ethanolic extracts of *Lippia sidoides* leaves: genotoxicity, digestion, inflammation, and hemostasis. *Chemistry & Biodiversity*, 16(3), e1800558.

### B

**Babakhouya, N.** (2010). *Récupération des métaux lourds par l'utilisation des adsorbants naturels* (Doctoral dissertation, Boumerdès).

**Ben Lemlih, M., & Ghanem, J.** (2012). Polyphénol d'huile d'olive trésor santé. *Macro-pietteur éd., Embourg (Belgique)*.

**Benariba N, Djaziri R, Bellakhdar W, Belkacem N, Kadiata M, Malaisse WJ, Sener A** ; (2013). Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seed extracts. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 3(1):35-40

**Benfeled, P** (1955), Amylase, and. Meth. Enzymology; 1: 149-158

**Benkhaled, A., Bellahouel, S., Bellahouel, A,** (2021). Olive oil in Algeria: From traditional uses to Modern Application. In N.M.Sequeira and P.R. Preetha (Eds), olive and olive oil in Health and Disease Prevention, 513-523p Academic Press. Doi: 10.1016/B978—12-81 8732-6.00040-6

**Berbel, J., &Posadillo, A.** (2018). Review and analysis of alternatives for the valorisation of agro-industrial olive oil by-products. Sustainability, 10(1), 237.

**Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Alaiz, M., Vioque, J., Giron-Calle, J., & Fernandez-Bolaños, J.** (2019). Polyphenols associated to pectic polysaccharides account for most of the antiproliferative and antioxidant activities in olive extracts. Journal of Functional Foods, 62, Article 103530

**Bernou Abla, Boucendala Meriem.** (2015). Essai de traitement des effluents d'huilerie d'olives par l'adsorption et combinaison avec le procédé Fenton. Mémoire de master. Université A.M.Oulhadj –Bouira

**Bernstein P.S., Li B., Vachali P.P., Gorusupudi A., Shyam R., Henriksen B.S. and Nolan J.M.** (2016). Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoids-based nutritional interventions against ocular disease. Progress in Retinal and Eye Research, 50, 34-66.

**Bodini S.F., Cicalini A.R. & Santori F.** (2011). Rhizosphere dynamics during phytoremediation of olive mill wastewater. Bioresource Technology, 102, 4383–4389

**Bonet M.L., Canas J.A., Ribot J., Palou A.** (2015). Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity. Archives of Biochemistry and Biophysics, 572, 112-125.

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

**Breton, C. M., Warnock, P., & Bervillé, A. J.** (2012). Origin and history of the olive. In Olive Germplasm-The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy. IntechOpen

**Britton, J., Davis, R., & O'Connor, K. E.** (2019). Chemical, physical and biotechnological approaches to the production of the potent antioxidant hydroxytyrosol. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 5957-5974.

Burri B.J., La Frano M.R. & Zhu C. 2016. **Absorption, metabolism, and functions of  $\beta$ -cryptoxanthin.** *Nutrition Reviews*, 74, 69-82.

C

**Caporaso, N., Formisano, D., & Genovese, A.** (2018). Use of phenolic compounds from olive mill wastewater as valuable ingredients for functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(16), 2829-2841

**Cedola, A., Cardinali, A., D'Antuono, I., Conte, A., & Del Nobile, M. A.** (2020). Cereal foods fortified with by-products from the olive oil industry. *Food Bioscience*, 33, 100490. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100490>

**Chaib, F., & Ameyoud, S.** (2022). La contribution à la valorisation de la margine d'huilerie par la technique de la distillation (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

**Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C.** (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3):178-182.

**Chaouadi H. Et Elias A.** (2015) *-Production et extraction de l'huile d'olive en Algérie.* JEHOM, Université M'Hamed Bougara Boumerdès / CRAPC, 41-43p.

**Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Aida, W. W., & Ho, C. W.** (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), 1427.

**Christoforou Elias et Fokaides Paris A,** (2016). A review of olive mill solid wastes to energy utilization techniques. *Waste Management*, 49, pp. 346-363. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.012>.

**Clodoveo M. L., Hbaieb R. H., Kotti F., Mugnozza G. S. And Gargouri M.** (2014). Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 13, 135-154.

**Codina, E. G. & Monjo, E. G.** (2014). Patent ES2462565 A1. Usodermocosmético del hidroxitirosol para aclarar la piel y composiciones que lo comprenden. Issued March 4, 2015.

-**Conseil Oléicole international** (2018)

**Conterno, L., Martinelli, F., Tamburini, M., Fava, F., Mancini, A., Sordo, M., ... & Tuohy, K.** (2019). Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. *European journal of nutrition*, 58, 63-81.

### D

**Danellakis D., Ntaikou I., Kornaros M. & Dailianis S.** (2011). Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.*, 101, 358–66.

-**Dashti N., Ali N., Khanafer M., Al-Awadhi H., Sorkhoh N., Radwan S.** (2015). Olive pomace harbors bacteria with the potential for hydrocarbon biodegradation, nitrogen fixation and mercury-resistance: Promising material for waste-oil-bioremediation. *J. Environ. Manage.* 155 : 49-57

**De Bruno A, Romeo R, Francesca LF, Sicari A, Piscopo A, Poiano M** (2018). L. Antioxidant activity shown by olive pomace extracts, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 53:8.

**De Bruno, A., Romeo, R., Fedele, F. L., Sicari, A., Piscopo, A., & Poiana, M.** (2018). Antioxidant activity shown by olive pomace extracts. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 53(8), 526-533.

**De Moraes Crizel Tainara, de Oliveira Rios Alessandro, D. Alves Vítor, Bandarra Narcisa, Moldão-Martins Margarida, & Hickmann Flôres Simone.** (2018). Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. *Food Hydrocolloids*, 74, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.007>

**Delgado-Moreno, L., Sánchez-Moreno, L., & Peña, A.** (2007). Assessment of olive cake as soil amendment for the controlled release of triazine herbicides. *Science of the total environment*, 378(1-2), 119-123.



**Dermeche S., Nadour M., Larroche C., Moulti-Mati F And Michaud P.** (2013). Olivemillwastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48, 1532–1552

**Dermeche, S. (2020).** *Valorisation des sous-produits oléicoles par bioconversion* (Doctoral dissertation, Université Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou).

**Dib, F., & Sahki, A.** (2014). *Traitement des margines par adsorption sur DEAE-cellulose* (Doctoral dissertation, UMMTO).

**Difonzo, G., Troilo, M., Squeo, G., Pasqualone, A., & Caponio, F.** (2021). Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods—a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(1), 15-26.

**Ducom, G., Gautier, M., Pietraccini, M., Tagutchou, J. P., Lebouil, D., Dumont, N., & Gourdon, R.** (2019). Caractérisation de grignons d'olives en vue d'une valorisation thermochimique par gazéification. *Environnement, Ingénierie & Développement*.

### E

**El-Abbassi, A. (2013).** *Valorisation des margines par isolement des polyphénols avec des procédés membranaires de séparation* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des sciences Semlalia, Marrakech, Maroc)

**El-Abbassi, A., Saadaoui, N., Kiai, H., Raiti, J., & Hafidi, A.** (2017). Potential applications of olive millwastewater as biopesticide for crops protection. *Science of the Total Environment*, 576, 10-21.

**El-Abbassi, A., Saadaoui, N., Kiai, H., Raiti, J., & Hafidi, A.** (2017). Potential applications of olive millwastewater as biopesticide for crops protection. *Science of the Total Environment*, 576, 10-21.

### F

**Fernández-Bolaños JG, López Ó, Ángeles López-García M, Marset A, López-García M, Azucena M** (2012) Biological properties of hydroxytyrosol and its derivatives. In: *Olive oil-constituents, quality, health properties and bioconversions*, pp 375–396

**Fernandez-Bolanos, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Guillén, R., & Jiménez, A.** (2006). Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas y Aceites*, 57(1), 95–106

**Fernández-González, R., Martín-Lara, M. Á., Blázquez, G., Pérez, A., & Calero, M.** (2019). Recovering metals from aqueous solutions by biosorption onto hydrolyzed olive cake. *Water*, 11(12), 2519. <https://doi.org/10.3390/w11122519>

**Fernández-Hernández, A., Roig, A., Serramiá, N., Civantos, C. G. O., & Sánchez-Monedero, M. A.** (2014). Application of compost of two-phase olive millwaste on olive grove: Effects on soil, olive fruit and olive oil quality. *Waste Management*, 34(7), 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.03.027>

## G

**Galanakis Charis M., Tsatalas Philippos, Galanakis Ioannis M.** (2018). Implementation of phenols recovered from olive mill wastewater as UV booster in cosmetics. *Industrial Crops and Products*, 111, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.058>

**Galanakis, C. M., Yüçetepe, A., Kasapoğlu, K. N., & Özçelik, B.** (2017) 8 High-Value Compounds from Olive Oil Processing Waste. In book: *Edible Oils Extraction, and Processing*.

**Gila A., Beltran G., Bejaoui M.A., Sanchez S., Nopens I. And Jimenez A.** (2016). Modeling the settling behavior in virgin olive oil from a horizontal screw solid bowl. *J. Food Eng.*, 168, 148-153.

**Gómez-Cruz, I., Cara, C., Romero, I., Castro, E., & Gullón, B.** (2020). Valorisation of exhausted olive pomace by an eco-friendly solvent extraction process of natural antioxidants. *Antioxidants*, 9(10), 1010.

**Gorzynik-Debicka, Paulina Przychodzen, Francesco Cappello, Alicja Kuban Jankowsk, Antonella Marino Gammazza, Narcyz Knap, Michal Wozniak, and Magdalena Gorska-Ponikowska,** (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. P ;4-10

**Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Ochoa-Herrera, J., Perez-Lopez, P., Pulido-Moran, M., & Ramirez-Tortosa, M.** (2012). Squalene ameliorates atherosclerotic lesion through the reduction of CD 36 scavenger receptor expression in macrophages. *Molecular nutrition & food research*, 56(5), 733-740.

**Gueboudji, Z., Kadi, K., & Nagaz, K.** (2021). Étude quantitative et activité antioxydante des molécules bioactives des effluents issues de l'extraction de l'huile d'olive. *International Journal of Natural Resources and Environment*, 3(2), 16-21.

**Gueboudji, Z., 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. *Genetics & Biodiversity Journal*, 5(2), 116-122.

**Gueboudji, Z., Kadi, K., Mahmoudi, M., Hannachi, H., Nagaz, K., Addad, D., ... & Hessini, K.** (2023). Maceration and liquid-liquid extractions of phenolic compounds and antioxidants from Algerian olive oil mill wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(2), 3432-3439.

**Gullon, Beatriz, Gullon, P., Eibes, G., Cara, C., De Torres, A., Lopez-Linares, J. C., ... Castro, E.** (2018). Valorisation of olive agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds. *Science of the Total Environment*, 645, 533-542

### H

**Hadrich, F., Bouallagui, Z., Junkyu, H., Isoda, H., & Sayadi, S.** (2015). The  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory of hydroxytyrosol and oleuropein. *Journal of oleo science*, 64(8), 835-843.

**Harborne J.B.** (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman & hall thomson science (uk). London, 203-234.

### J

**Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthournhout, M., & Penninckx, M. J.** (2003). Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and microbial technology*, 33(6), 802-809.

**Justino, C. I., Pereira, R., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A., Panteleitchouk, T. S., & Duarte, A. C.** (2012). Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology*, 21, 615-629.

### K

**Karagozler, A., Erdag, B., Calmaz- Emek, Y. (2008).** Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorys toechastate*, Food Chemistry, (111): 400-407

**Karray, M. H. (2013).** Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive : une voie prometteuse de valorisation par la production de l'hydroxytyrosol naturel (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat. 181p).

**Kumar Sunil, Dinesh Kumar, Manjusha Kamal Saroha, Nidhan Singh, Bhoodev Vashishta.**

**(2008).** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis*(L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharm.* 58 : 215-220.

### L

**Labdaoui D. (2017)** Impact socio-économique et environnemental du modèle d'extraction des huiles d'olives à deux phases et possibilités de sa diffusion dans la région de Bouira (Algérie) *Thèse de Doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganam.* 143p

**Lacolla, G., Fortunato, S., Nigro, D., De Pinto, M. C., Mastro, M. A., Caranfa, D., ... & Cucci, G. (2019).** Effects of mineral and organic fertilization with the use of wet olive pomace on durum wheat performance. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 8, 245-254.

**Lammi, S., Le Moigne, N., Djenane, D., Gontard, N., & Angellier-Coussy, H. (2018).** Dry fractionation of olive pomace for the development of food packaging biocomposites. *Industrial Crops and Products*, 120, 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.052>

**Laoufi, H., Benariba, N., Adjdir, S., & Djaziri, R. (2017).** In vitro  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Ononis angustissima* extracts. *Journal of applied pharmaceutical science*, 7(2), 191-198.

**Lin ShaoLing, L. S., Chi WenWen, C. W., Hu JiaMiao, H. J., Pan Qiang, P. Q., Zheng BaoDong, Z. B., & Zeng ShaoXiao, Z. S. (2017).** Sensory and nutritional properties of Chinese olive pomace based high fibre biscuit.

### M

**Madureira, J., Margaça, F. M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C., Verde, S. C., & Barros, L.** (2022). Applications of bioactive compounds extracted from olive industrywastes: A review. *ComprehensiveReviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 453-476.

**Majbar Z., Lahlou, K., Ben, Abbou M., Ammar, E., Triki, A., Abid, W., Nawdali, M., Bouka, H., Taleb, M., El Haji, M., & Rais, Z.** (2018). Co-composting of Olive Mill Waste and Wine-ProcessingWaste: An Application of Compost as SoilAmendment. *Journal of Chemistry*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/7918583>

**Malapert, A., Reboul, E., Loonis, M., Dangles, O., & Tomao, V.** (2018). Direct and rapid profiling of biophenols in olive pomace by UHPLC-DAD-MS. *Food analyticalmethods*, 11, 1001-1010.

**Medouni-Haroune, lamia., Zaidi, Farid., Medouni-Adrar, s onia., &Kecha, Mouloud** (2018). Olive pomace: From an olive millwaste to a resource, an overview of the new treatments. *J. Crit. Rev.*, 5(6), 1-6.

**-Meklati, B.Y., Giampaoli, P., Desai, D,** (2019). Olive growing and olive oil production in Algeria. *Olives and olive oil in the global market*. Intechopen. Doi :10.5772/intechopen.83498

**-Mennane Z., Tada S., Aki I., Faid M., Hassani S., Salmaoui S.** (2010). Caractérisation physicochimique et microbiologique des grignons d’olive de 26 huileries traditionnelles de la région de Beni Mellal (Maroc). *Technologies de laboratoire*. 5, N°19

**Messaoudi, D.** (2020). *Effets des margines et de leur extrait phénolique sur les dyslipidémies (étude in vivo) et sur l'activation plaquettaire* (Doctoral dissertation, Université Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou).

**-Miranda, I., Simoes, ~ R., Medeiros, B., Nampoothiri, K. M., Sukumaran, R. K., Rajan, D., ...Ferreira-Dias, S.** (2019). Valorization of lignocellulosicresidues from the olive oilindustry by production of lignin, glucose and functionalsugars. *BioresourceTechnology*, 292, Article 121936

**Mwakalukwa, R., Amen, Y., Nagata, M., & Shimizu, K.** (2020). Postprandial hyperglycemialoweringeffect of the isolated compounds from olive millwastes–An inhibitoryactivity and kineticsstudies on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzymes. *ACS omega*, 5(32), 20070-20079.

N

**Nunes, M. A., Costa, A. S., Bessada, S., Santos, J., Puga, H., Alves, R. C., ... & Oliveira, M. B. P.** (2018). Olive pomace as available source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. *Science of the total environment*, 644, 229-236.

**Nunes, M. A., Pimentel, F. B., Costa, A. S., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P.** (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 139-148.

O

**Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K.** (2005). Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9911-9920.

**Ouabou, E., Anouar, A., & Hilali, S.** (2014). Élimination des polluants organiques présents dans la margine d'huile d'olive par filtration sur colonne d'argile et sciure de bois d'eucalyptus. *Journal of Applied Biosciences*, 75, 6232-6238.

**Ouldyyerou k. et al.** (2018) , *Journal of Advanced Research in Science and Technology* , 5(1), 670-679.

P

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

**Prazeres A, Afonso A, Guerreiro R, Jerónimo E** (2021) Contamination reduction of real olive oil mill wastewater using innovative acid and basic chemical precipitation processes. *Int J Environ Sci Technol* 18:799–808

R

**Regni, L., Nasini, L., Ilarioni, L., Brunori, A., Massaccesi, L., Agnelli, A., & Proietti, P.** (2017). Long term amendment with fresh and composted solid olive mill waste on olive grove affects carbon sequestration by prunings, fruits, and soil. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2042. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02042>

- Ribeiro TB, Oliveira AL, Costa C, Nunes J, Vicente AA, Pintado M** (2020). Total and Sustainable Valorisation of Olive Pomace Using a Fractionation Approach. *Appl. Sci.* 10(19): 6785.
- Ribeiro, T. B., Campos, D., Oliveira, A., Nunes, J., Vicente, A. A., & Pintado, M.** (2021). Study of olive pomace antioxidant dietary fibre powder throughout gastrointestinal tract as multi-source of phenolics, fatty acids and dietary fibre. *Food research international*, 142, 110032.
- Ribeiro, T. B., Oliveira, A., Coelho, M., Veiga, M., Costa, E. M., Silva, S., ... & Pintado, M.** (2021). Are olive pomace powders a safe source of bioactives and nutrients? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(5), 1963-1978.
- Robin, J.-R. & Rolland, Y.** (2004). Patent WO 2004/069218 A1. Use of verbascoside as a stimulant agent for the production of thermal shock proteins by the cells of the skin. Issued August 19, 2004. Rodrigues, F., da Mota Nunes, M. A., & Oliveira, M. B. P. P. (2017)
- Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL, Mc R-T** (2018) Hydroxytyrosol: bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res Int* 105:654–667. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.053>
- Robles-Almazan M., Pulido-Moran M., Moreno-Fernandez J., Ramirez-Tortosa C., Rodriguez-Garcia C., Quiles J.L. and Ramirez-Tortosa M.** (2017). hydroxytyrosol: bioavailability, toxicity, and clinical applications. *food research international*, s0963-9969(17)30822-0.
- Robles-Almazan, M., Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., Rodriguez-Garcia, C., Quiles, J. L., & Ramirez-Tortosa, M.** (2018). Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Research International*, 105, 654-667.
- Rodis P. S., Karathanos V. T., Mantzavinou A.,**(2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 596-601.
- Rodríguez, G., Lama, A., Trujillo, M., Espartero, J. L., & Fernández-Bolaños, J.** (2009). Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3, 4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT-Food Science and Technology*, 42(2), 483-490.

**Roussel, T. N. G., Laure, N. J., & Enyong, O. J.** (2020). Antioxidant and Glucose Lowering Effects of Hydroethanolic Extract of *Baillonellatoxisperma* Pulp. *Journal of Food Research*, 9(2).

**Ryan, D., & Robards, K.** (1998). Critical Review. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123(5), 31R-44R.

### S

**Simonato Barbara, Trevisan Sara, Tolve Roberta, Favati Fabio, & Pasini Gabriella.** (2019). Pasta fortification with olive pomace: Effects on the technological characteristics and nutritional properties. *LWT*, 114, 108368. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108368>

**Soberón LF, Carelli AA, González MT, Ceci LN** (2019) Method for phenol recovery from “alperujo”: Numerical optimization and predictive model. *Eur Food Res Technol* 245 :1641–1650

**-Stamatoullab.c., tassou cc., panagou E. zet Nychas G,**(2017) fermentation oleicole de table a l'aide de culture initiales avec potentiel multifonctionnel.

**Sun B., Ricardo-da-Silva J. M., Spranger I.** (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267-4274.

### T

**Tanchev S., Joncheva N., Genov N. And Codounis M.** (1980). Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna*, 4, 5-73.

**Tekin, A. R., & Dalgıç, A. C.** (2000). Biogas production from olive pomace. *Resources, Conservation and Recycling*, 30(4), 301-313.

**Tlilani Zineb, Bensaida Oumeima.**(2019). Etude de l'activité antioxydante, anti Alzheimer et anti diabétique d'huile d'olive et de la margine.

**Tundis, R., Conidi, C., Loizzo, M. R., Sicari, V., & Cassano, A.** (2020). Olive mill wastewater polyphenol-enriched fractions by integrated membrane process: A promising source of antioxidant, hypolipidemic and hypoglycaemic compounds. *Antioxidants*, 9(7), 602.

### V



**Veillet, S.** (2010, June). Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation. Avignon.

**Vermerris, W. and Nicholson, R.** (2006). Phenolic Compounds and Their Effects on Human Health. In: Phenolic Compound Biochemistry, Springer, Dordrecht, 235-255.

**Villanova, L., Villanova, A., Villanova, L., Merendino, A., Fasiello, G. & Cisale, F.** (2010). US Patent 2010/0297330 A1 Yoghurt containing hydroxytyrosol and other biophenols with a preventive nutritional activity beneficial to human beings. November 25, 2010.

**Vlavcheski, F., Young, M., & Tsiani, E.** (2019). Antidiabetic effects of hydroxytyrosol: In vitro and in vivo evidence. *Antioxidants*, 8(6), 188.

### Z

**Zbakh H. And El Abbassi A.** (2012). Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages : A review. *Journal of Functional Food*, 4, 53-65.

**Ziosi P, Paolucci C, Santarelli F, Tabanelli T, Passeri S, Cavani F, Righi P** (2018) A two-step process for the synthesis of hydroxytyrosol. *ChemSusChem* 11 :1–10.

---

---

# **Annexes**

---

---

## 1. Préparation des réactifs :

- **Solution de l' $\alpha$ -amylase :**

L'enzyme utilisé est l' $\alpha$ -amylase de pancréas porcin (PPA) sous forme lyophilisées, 3 mg de PPA sont solubilisés dans 10 ml de solution tampon phosphate (0.02M, pH=6.9 ; NaCl 0.006 M), L'activité optimale de cette enzyme est à pH 6,9 et à 37 C°.

- **Solution de substrat :**

Le substrat employé est de l'amidon soluble, dissous dans une solution tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9) à une concentration de 0,5%.

- **Réactif 3,5-Di Nitro Salicylique Acide (DNSA)**

- ✓ **Solution A**

1.6 g de NaOH est dissous dans 20 ml d'eau distillé préchauffé jusqu'au 60° c puis ajouté 30 g de tartrate double de sodium et de potassium

- ✓ **Solution B**

1 g de DNSA est solubilisé dans 40 ml d'eau distillée préchauffer à 60°C

- ✓ **Ensuite mélanger solution A + solution B**

La solution résultante prend une teinte orange, et son volume est ajusté à 100 millilitres avec de l'eau distillée. Ce réactif est ensuite conservé à l'abri de la lumière.

- **Solution tampon phosphate (0,02M ; pH=6,9)**

On prépare la solution tampon à partir d'une solution A monobasique  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (M=119,98g/l) et la solution B dibasique  $\text{NaHPO}_4$  (M=141,96g/l)

- 1,68g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  solubilisé dans 700ml d'eau distillée.

- 1,136gde  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  solubilisé dans 400ml d'eau distillée.

- Par la suite, les solutions A et B sont mélangées afin d'obtenir une concentration de 0,02 M et un pH de 6,9.

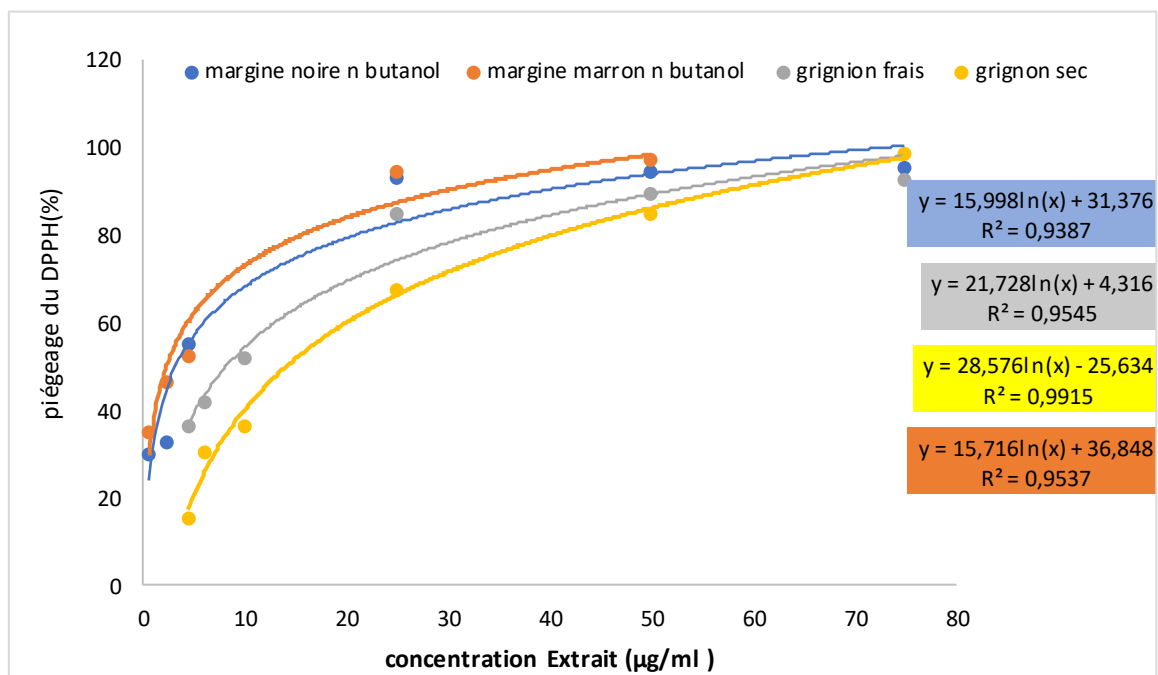
- **Solution d'acarbose**

L'acarbose, un inhibiteur de l'alpha-glucosidase, est un médicament qui ralentit la dégradation des glucides dans l'intestin, utilisé pour traiter le diabète de type 2.

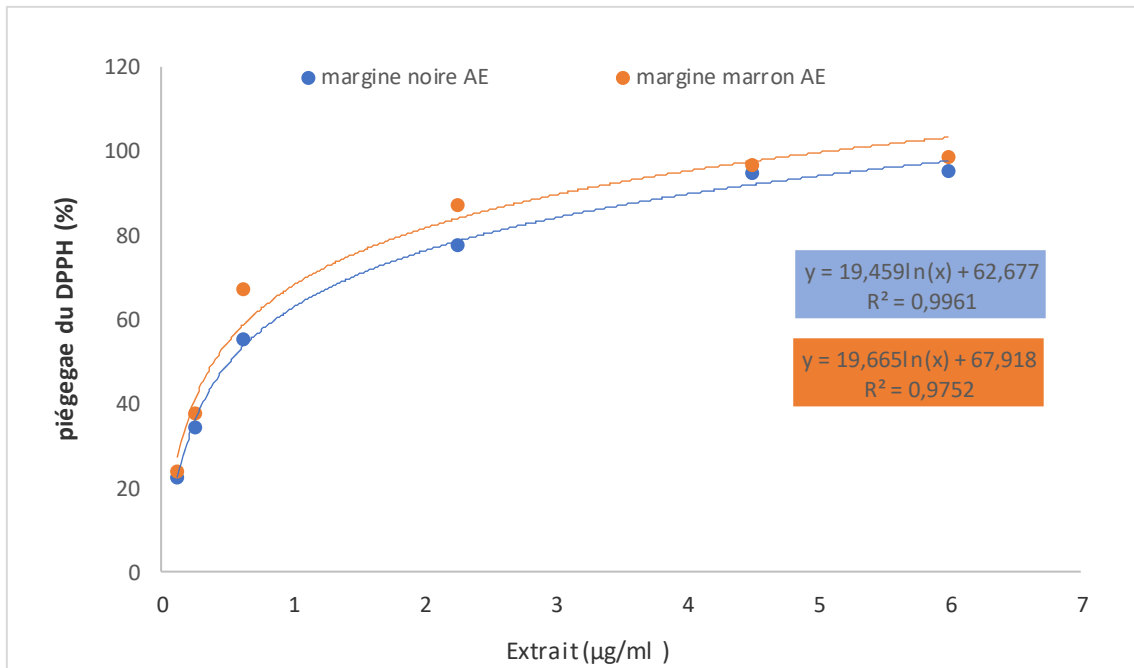
Dans cette étude, l'acarbose a été utilisée comme référence positive pour évaluer son effet sur l'activité de l'α-amylase en comparaison avec les extraits testés. Un comprimé de 50 mg est dissous dans 25 ml de PBS sous agitation pour obtenir une concentration de 2 mg/ml, puis des dilutions sont réalisées (6; 12,5; 25; 50; 100; 500;1000 et 2000µg/ml).

- **Solution des extraits de grignons et margines**

Des concentrations variables des extraits de grignons et margines sont préparées dans une solution tampon phosphate (0,02 M ; pH 6,9) pour évaluer leur impact sur l'activité enzymatique de l'α-amylase. Les concentrations utilisées sont (0.5 ;1 ;2 ;3 ;5 ;12 ;25 ;50 et 90 ug/ml)



**Figure n° 21 : (annexe): Effet antioxydant des extraits du grignon et les fractions n-butanol margine sur le piégeage du DPPH exprimé en pourcentage (%)**



**Figure n° 2:(annexe) : Effet antioxydant des fractions acétate d'éthyle du margine noire et marron sur le piégeage du DPPH exprimé en pourcentage (%).**

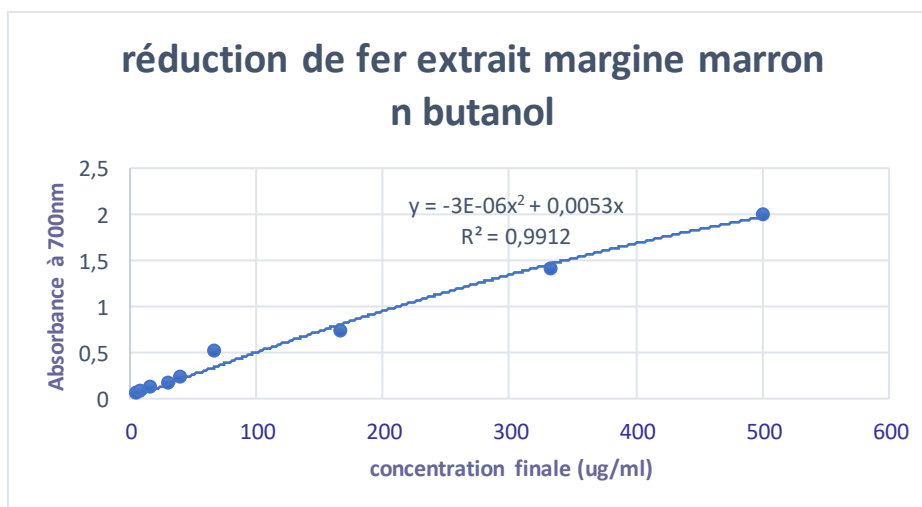
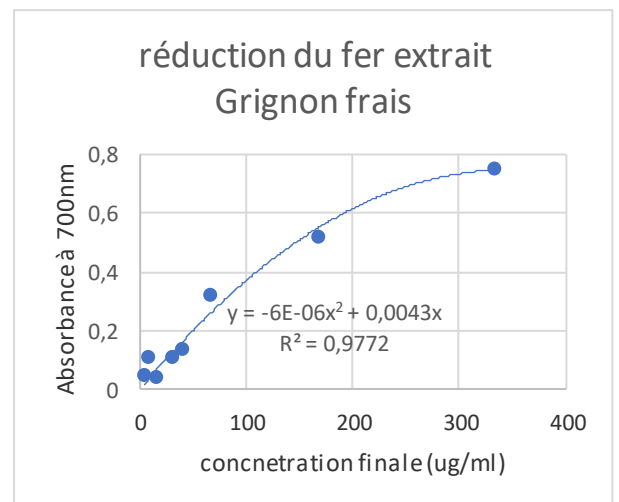
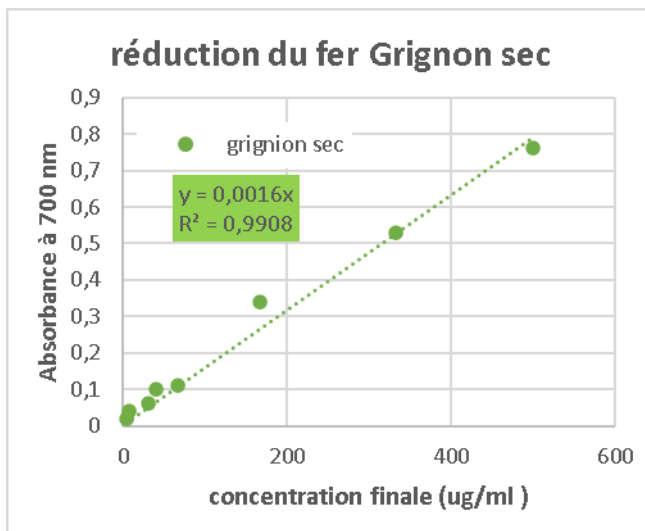
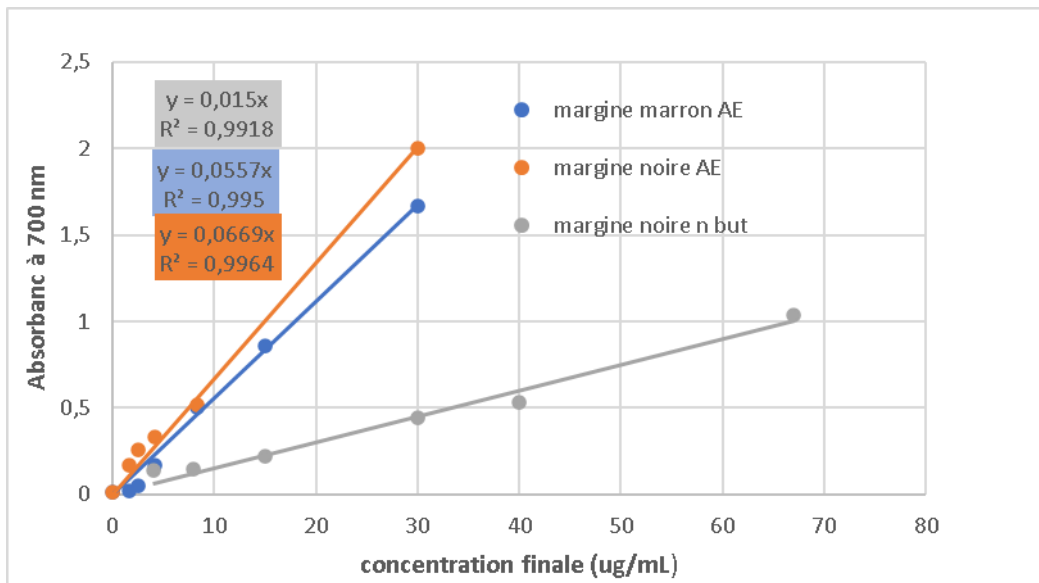


Figure n° 23:(annexe) : Pouvoir réducteur du fer des extraits du grignon et du margine d'olive

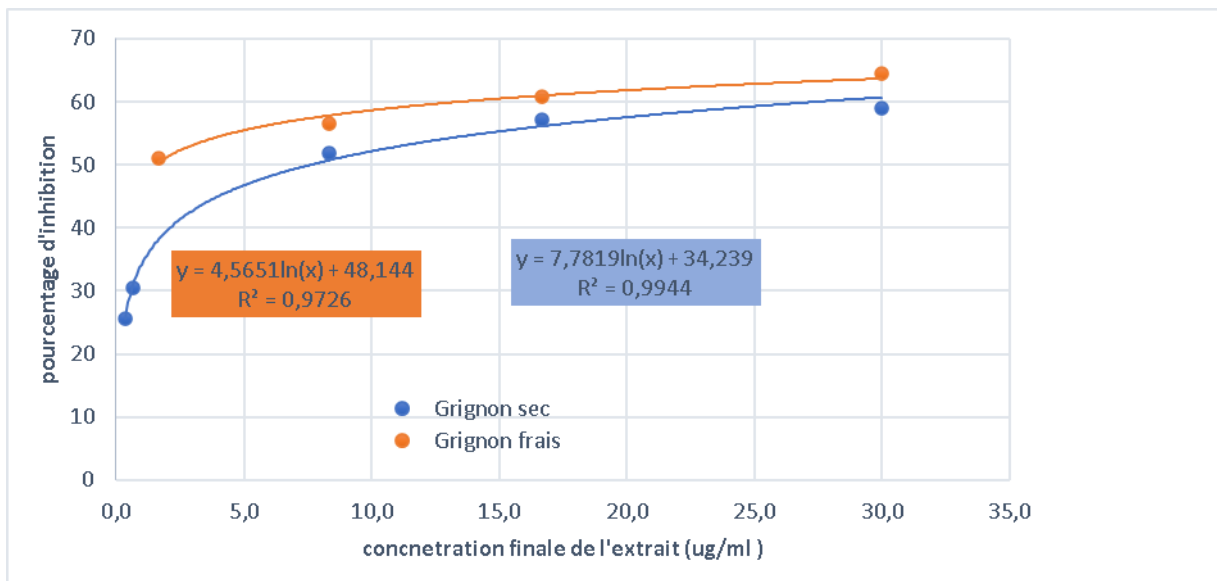


Figure n°24:(annexe ) : effet des extraits de Grignon frais et séché sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

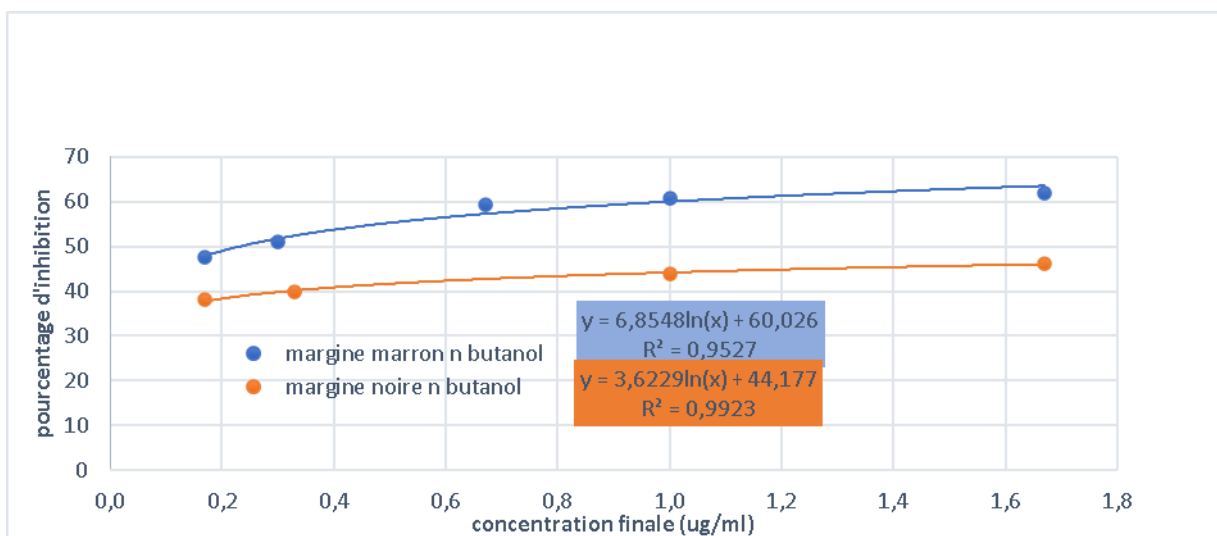


Figure n° 25:(annexe): effet des extraits n-butanol de margine noire et marron sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

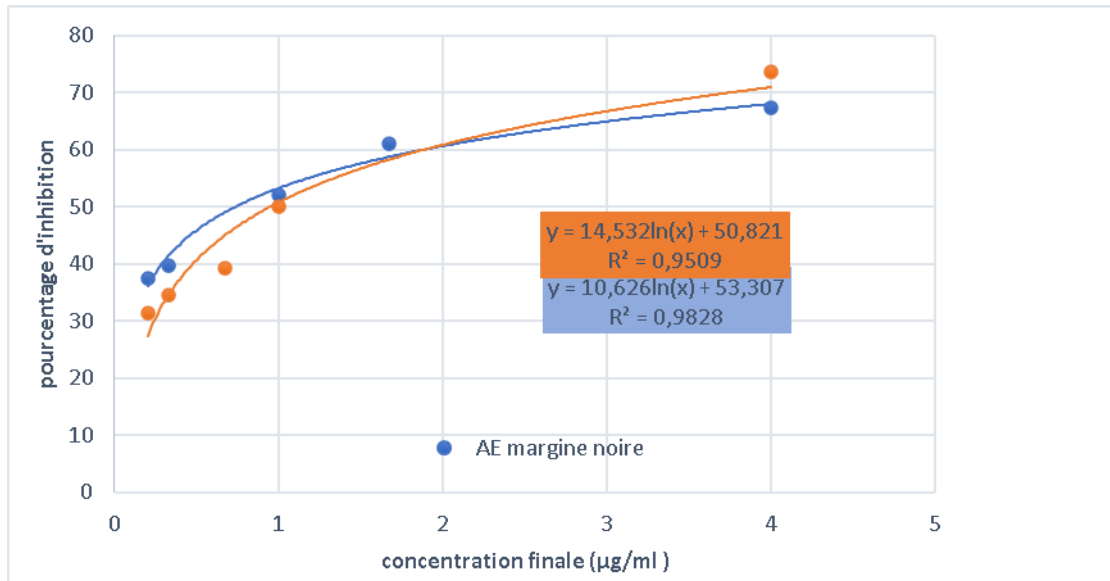


Figure n° 26:(annexe): Effet des extraits acétate d'éthyle de margine noire et marron sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase