



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur Et De la Recherche Scientifique



Université Larbi Ben M'Hidi Oum El-Bouaghi

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature Et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Option : **Microbiologie appliquée**

Thème :

**Caractérisation des profils phénoliques et évaluation de
l'activité antibactérienne du contenu phénolique des
marges monovariétales**

Présentée par :

YAKHLEF Wahiba

Soutenue :

Le 25 Avril 2019

Devant le jury :

Président :	M. ZELLAGUI A.	(Prof.)	Univ. Larbi Ben M'Hidi, Oum El-Bouaghi
Encadreur :	M. ARHAB R.	(Prof.)	Univ. Larbi Ben M'Hidi, Oum El-Bouaghi
Examineurs :	M. HAMIDECHI M.A.	(Prof.)	Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
	M. DARBOUCHE A.	(Prof.)	Univ. Abbès Laghrour, Khenchela
	Mme AOUAR L.	(MCA)	Univ. Larbi Ben M'Hidi, Oum El-Bouaghi
	M. MECHAI A.B.	(MCA)	Univ. Larbi Tébessi, Tébessa

2018-2019

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier très chaleureusement mon directeur de thèse le Professeur **ARHAB R.** pour les orientations et les conseils qu'il n'a pas manqué de me prodiguer durant la réalisation de ce travail, pour sa disponibilité et sa compréhension. Qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.

Mes profonds respects et remerciements vont à Monsieur **ZELLAGUI A.**, Professeur à l'université Larbi Ben M'Hidi Oum El-Bouaghi, pour l'honneur qu'il me fait en présidant ce jury.

Mes remerciements vont à Monsieur **HAMIDECHI M.A.**, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury de cette thèse.

Mes reconnaissances vont aussi à Monsieur **DARBOUCHE A.**, Professeur à l'université Abbès Laghrour Khenchela, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et mes respects.

Que Monsieur **MECHAI A.B.**, Maître de conférences à l'Université Larbi Tébessi, Tébessa, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'être examinateur de ce travail.

Il m'est aussi agréable de remercier Mme **AOUAR L.**, Maître de conférences à l'Université Larbi Ben M'Hidi Oum El-Bouaghi d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude.

J'adresse mes vifs remerciements aux docteurs **BRENES M., MEDINA E., ROMERO C.** et **DE CASTRO A.** et toute l'équipe du département de biotechnologie alimentaire, Institut De la Grasa (Séville), pour le meilleur accueil qu'ils m'ont réservé dans leurs laboratoires, durant mon séjour en Espagne et la mise à ma disposition de tous les moyens pour me permettre de réaliser mes recherches dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier spécialement Messieurs **ZERAIB A.** et **RAHAL K.** pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté et pour leurs encouragements.

Je ne pourrais oublier de remercier les propriétaires des huileries de la région de Guelma pour leur collaboration dans l'étape d'échantillonnage de ce travail.

Un grand merci à mes parents pour leur soutien permanent tout au long de cette thèse et tout au long de ma vie universitaire.

Mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

Dédicaces

A mes très chers parents

A mon cher Mari

A mes deux anges Zyad & Iyad

A mon frère et mes sœurs

A toute ma famille et ma belle-famille

Résumé :

Le premier aspect traité dans ce travail consiste à caractériser, par HPLC, les profils phénoliques de l'huile d'olive, des grignons d'olives et des margines de trois variétés algériennes : *Blanquette*, *Rougette* et *Sigoise*, issus de deux procédés d'extraction : traditionnel discontinu à presse et continu à trois phases. L'analyse qualitative a permis l'identification de 24 composés phénoliques qui appartiennent à cinq classes phénoliques. Les contenus phénoliques les plus importants ont été enregistrés pour la variété *Blanquette*. Cependant, aucune différence concluante n'a été trouvée pour le procédé d'extraction de l'huile d'olive.

Le deuxième volet de cette étude concerne la détermination de l'activité antibactérienne, *in vitro*, des margines et de l'huile d'olive brutes. Les margines les plus bactéricides, qui ont présenté la concentration la plus élevée en phénols totaux (10828 mg/L), ont montré une concentration minimale bactéricide (CMB) de 2,5% pour toutes les souches testées. En outre, une concentration en polyphénols totaux de 452 mg/Kg de l'huile d'olive a réduit, plus de 3 unités logarithmiques, l'inoculum initial des bactéries Gram positif après 30 min de contact. L'activité bactéricide des margines est attribuée à leur contenu phénolique, notamment, à la forme dialdéhyde du décarboxyméthyl-élnolate (EDA-like) qui a présenté une CMB de 150 mg/L contre *Staphylococcus aureus*.

Les margines constituent une source précieuse de bio-phénols naturels, douées d'une activité antibactérienne remarquable, pouvant servir dans l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire ou en agriculture.

Mots clés : huile d'olive, grignons d'olives, margines, composés phénoliques, HPLC, variétés d'olives, procédé d'extraction, effet bactéricide.

Abstract :

The first aspect treated in this work is to characterize, by HPLC, the phenolic profiles of olive oil, olive pomace and olive mill wastewater (OMWW) of three Algerian cultivars: *Blanquette*, *Rougette* and *Sigoise*, which were generated by traditional discontinuous press and 3-phases centrifugal extraction processes. The qualitative analysis allowed the identification of 24 phenolic compounds that belong to five phenolic classes. *Blanquette* was the cultivar with the highest phenolic content. However, no conclusive difference was found for the olive oil extraction process.

The second part of this study concerns the determination of the antibacterial activity, *in vitro*, of OMWW and olive oil. The most bactericidal OMWW, which had the highest concentration of total phenols (10828 mg/L), showed a minimum bactericidal concentration (MBC) of 2.5% for all target bacteria. In addition, a concentration of 452 mg/kg of total polyphenols in the olive oil reduced more than 3 log units from the initial inoculum of Gram-positive bacteria in 30 min. The bactericidal activity of OMWW is attributed to their phenolic content, in particular to the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid (EDA-like), which showed a MBC of 150 mg / L against *Staphylococcus aureus*.

OMWW are a valuable source of natural bio-phenols, with remarkable antibacterial activity, which can be used in pharmaceutical industry, food industry or agriculture.

Key words: olive oil, pomace, OMWW, phenolic compounds, HPLC, olive varieties, extraction process, bactericidal effect.

ملخص :

الجانب الأول الذي تم التطرق اليه في هذا العمل هو تحليل ، باستعمال الاستشراب السائل الرفيع الإنجاز، المحتوى الفينولي لزيت الزيتون وثقل الزيتون والنفايات السائلة لمعاصر الزيتون لثلاثة أصناف جزائرية: البلانكات، الروجات و السيقواز، الناتجة عن نمطين مختلفتين من العصر: التقليدية غير متواصلة و ذات الثلاث مراحل. سمح التحليل النوعي بتحديد 24 مركباً فينولياً ينتموت إلى خمسة أصناف فينولية. سجل المحتوى الفينولي الأهم عند الصنف بلانكات، لكن لم يتم الوصول الى اختلاف قاطع في ما يخص أنماط عصر زيت الزيتون.

الجزء الثاني من هذه الدراسة يتعلق بتحديد النشاط المضاد للبكتيريا، للنفايات السائلة لمعاصر الزيتون وزيت الزيتون. أظهرت العينة التي تحتوي على أعلى تركيز فينولي كلي (10828 ملغم / لتر) فعالية كبيرة ضد جميع السلالات المختبرة بتركيز 2.5%. بالإضافة إلى ذلك، تمكن التركيز البوليفينولي الكلي لزيت الزيتون (452 ملغم / كغ) من خفض أكثر من 3 وحدات من البكتيريا إيجابية الجرام بعد 30 دقيقة. المحتوى الفينولي للنفايات السائلة لمعاصر الزيتون هو المسؤول عن هذه الخاصية، تحديداً الديهالديهيد ديكاربوكسيميثيل إيلينولات الذي أظهر أدنى تركيز مثبط = 150 ملغم / لتر ضد المكورات العنقودية الذهبية.

تعتبر للنفايات السائلة لمعاصر الزيتون مصدراً قيماً للمركبات الفينولية الطبيعية، حيث تتمتع بنشاط مضاد للبكتيريا يمكن استغلاله في الصناعات الصيدلانية أو الغذائية أو الزراعية.

الكلمات المفتاحية : زيت الزيتون، ثقل الزيتون، النفايات السائلة لمعاصر الزيتون ، المركبات الفينولية ، الاستشراب السائل الرفيع الإنجاز ، أصناف الزيتون ، أنماط العصر ، تأثير مبيد للجراثيم.

TABLE DES MATIERES

Résumés

Liste des acronymes	I
Liste des figures	III
Liste des photographies	V
Liste des tableaux	VI

Introduction	1
---------------------------	---

Revue Bibliographique

Chapitre I : L'olivier

I. Généralités sur l'olivier	4
1. Classification botanique	4
2. Patrimoine oléicole mondial	5
3. Secteur oléicole en Algérie	5
4. Diversité oléicole dans le monde	7
5. Diversité oléicole en Algérie	8
6. L'oléiculture dans la région de Guelma	8

II. Du fruit d'olive à l'huile d'olive	9
1. Nettoyage	9
2. Broyage et malaxage	9
3. Extraction.....	9
3.1. Système discontinu.....	12
3.2. Système continu à trois phases.....	12
3.3. Système continu à deux phases.....	13

III. Les produits et les sous-produits de l'olivier	14
1. Huile d'olive	15
2. Grignons d'olives	15
3. Margines	16
3.1. Composition chimique des margines	16
3.1.1. Fraction organique	16
3.1.2. Fraction minérale	16
3.2. Caractère polluant des margines	16
3.3. Valorisation des margines	17

Chapitre II : Les composés phénoliques

I. Généralités	19
1. Définition	19
2. Distribution	19
3. Structure	19
4. Classification	20

4.1. Alcool phénoliques	20
4.2. Acides phénoliques	20
4.2.1. Acides hydroxybenzoïques.....	20
4.2.2. Acides hydroxycinnamiques.....	20
4.3. Coumarins	21
4.4. Quinones	21
4.5. Xanthones	21
4.6. Stilbènes	21
4.7. Flavonoïdes	21
4.8. Lignanes	21
4.9. Lignines	22
4.10. Tanins	22
5. Biosynthèse	22
II. Composés phénoliques de l'olivier	22
1. Classes des polyphénols de l'olivier	23
1.1. Alcool phénoliques	23
1.1.1. Hydroxytyrosol	24
1.1.2. Tyrosol	24
1.2. Acides benzoïques	24
1.3. Acides cinnamiques	24
1.4. Flavonoïdes	24
1.5. Isochromans	24
1.6. Lignanes	25
1.7. Séco-iridoïdes	25
1.7.1. Oleuropéine	25
1.7.2. Déméthyle oleuropéine	25
1.7.3. Ligstroside	25
2. Fraction phénolique des olives	25
3. Fraction phénolique de l'huile d'olive	25
4. Fraction phénolique des grignons d'olives	30
5. Fraction phénolique des margines	30
III. Propriétés biologiques des polyphénols de l'olivier	30
1. Effet antimicrobien des polyphénols de l'olivier	33
2. Effet antimicrobien des polyphénols des margines	33
IV. Méthodes d'analyse des composés phénoliques	36
1. Méthodes d'extraction des polyphénols	36
2. Méthodes de séparation, dosage et identification des polyphénols	37
2.1. Chromatographie liquide à haute performance	37
2.1.1. Détecteur spectroscopique ultraviolet-visible	38
2.1.2. Détecteur à spectrométrie de masse	39

Matériel et Méthodes

I. Contexte et rappel des objectifs	40
1. Echantillonnage	40
1.1. Huile d'olive	40
1.2. Grignons d'olives	41
1.3. Margines	41
II. Caractérisation phénolique des produits et sous-produits de l'olivier	43
1. Préparation de l'échantillon avant l'analyse	43
1.1. Huile d'olive	43
1.2. Grignons d'olives	44
1.3. Margines brutes	45
2. Conditions expérimentales	46
2.1. Témoins utilisés	47
2.2. Analyses des données	47
3. Caractérisation phénolique de différentes formes de margines	47
3.1. Préparation d'un extrait d'acétate d'éthyle des margines	47
3.2. Préparation des margines ultrafiltrées	49
3.3. Analyse chromatographique des trois formes de margines	49
4. Purification et identification des composés phénoliques	49
4.1. Procédé de purification	49
4.2. Identification des composés purifiés par HPLC-MS	51
III. Evaluation de l'activité antibactérienne	51
1. Souches-test	51
2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile d'olive	52
3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des margines brutes	53
4. Détermination de l'activité antibactérienne des trois formes de margines	55
5. Activité antibactérienne des molécules purifiées et de leur mélange	55
IV. Analyses statistiques	56

Résultats et Discussion

I. Echantillonnage et mesure du pH des margines	57
II. Caractérisation du contenu phénolique des produits et des sous-produits de l'olivier	58
1. Analyse qualitative	58
1.1. Contenu phénolique de l'huile d'olive	63
1.2. Contenu phénolique des grignons d'olives	63
1.3. Contenu phénolique des margines brutes acidifiées	65
1.4. Contenu phénolique des margines ultrafiltrées	68
1.5. Contenu phénolique de l'extrait de l'acétate d'éthyle et des margines épuisées	68
2. Analyse quantitative	70

2.1. Composition phénolique de l'huile d'olive	70
2.2. Composition phénolique des grignons d'olives	73
2.3. Composition phénolique des margines brutes	75
2.4. Composition phénolique des trois formes de margines	78
3. Spectres de masse des composés phénoliques purifiés	79
III. Activité antibactérienne de l'huile d'olive et des margines	81
1. Effet bactéricide de l'huile d'olive	81
2. Effet bactéricide des margines brutes	83
3. Effet bactéricide des margines ultra-filtrées sur <i>S. aureus</i>	87
4. Effet bactéricide de l'extrait phénolique des margines et des margines épuisées sur <i>S. aureus</i>	87
5. Effet bactéricide des composés phénoliques purifiés sur <i>S. aureus</i>	92
Conclusion et perspectives	95
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des acronymes

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la variance
CAS	Chemical Abstracts Service
CE	Conductivité électrique
CECT	Spanish Type Culture Collection
CMB	Concentration minimale bactéricide
COI	Conseil oléicole international
DBO₅	Demande biochimique en oxygène en cinq jours
DCO	Demande chimique en oxygène
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMF	N, N-Diméthylformamide
DO	Densité optique
DSA	Direction des services agricoles
EA	Acide élénolique
EAG	Equivalent acide gallique
EDA	Forme dialdéhydrique de l'acide élénolique décarboxyméthyle
GFA	Glutaraldéhyde
HCL	Chlorure d'hydrogène
Hy	Hydroxytyrosol
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HPLC-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
H₂S	Sulfure d'hydrogène
ITAFV	Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne
MADRP	Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche
m/z	masse/charge
NaOH	Hydroxyde de sodium
N₂	Diazote
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
O₂	Dioxygène
ONFAA	Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires
OPA	Orthophtalaldéhyde
PBST	Solution saline tamponnée au phosphate stérile avec du Tween 20
pH	Potentiel hydrogène
PNDA	Programme National de Développement Agricole
POU	Protéines d'organismes unicellulaires
PT	Polyphénols totaux
Rpm	Rotation par minute
Ty	Tyrosol
UICPA	Union internationale de chimie pure et appliquée
UFC	Unité Formant une Colonie

Liste des figures

Figure 1 :	Production annuelle des olives et de l'huile d'olive en Algérie	06
Figure 2 :	Schéma des trois procédés d'extraction de l'huile d'olive	13
Figure 3 :	Bilan annuel des produits et sous-produits de l'industrie oléicole en Algérie ...	15
Figure 4 :	Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate	23
Figure 5 :	L'hydrolyse de l'oleuropéine	26
Figure 6 :	Nombre d'études évaluant les potentialités bioactives <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des composés phénoliques, publiés entre 2000 et 2015	32
Figure 7 :	Localisation des huileries d'échantillonnage dans la wilaya de Guelma	42
Figure 8 :	Récupération des CP de l'huile d'olive et préparation des extraits pour l'HPLC	44
Figure 9 :	Récupération des CP des grignons et préparation des extraits pour l'HPLC	45
Figure 10 :	Protocole de préparation des margines à l'HPLC	45
Figure 11 :	Protocole de l'étude de l'activité antibactérienne	54
Figure 12 :	Chromatogrammes d'élution des composés phénoliques de l'huile d'olive BC .	64
Figure 13 :	Chromatogramme d'élution des composés phénoliques des grignons d'olives ...	65
Figure 14 :	Chromatogrammes d'élution des composés phénoliques des margines BC	66
Figure 15 :	Chromatogrammes d'élution du contenu phénoliques de l'extrait d'acétate d'éthyle des margines SP	69
Figure 16 :	Chromatogrammes d'élution des composés phénoliques des margines épuisées	69
Figure 17 :	Polyphénols totaux des produits et sous-produits de l'olivier des variétés <i>Rougette</i> , <i>Blanquette</i> et <i>Sigoise</i> , issus d'un système d'extraction continu (C) ou par presse (P)	77
Figure 18 :	Spectres UV et spectres de masse, obtenus en mode SCAN, de l'hydroxytyrosol	79
Figure 19 :	Spectres UV et spectres de masse, obtenus en mode SCAN, de l'acide élénolique	80
Figure 20 :	Spectres UV et spectres de masse, obtenus en mode SCAN, de l'EDA-like	80
Figure 21 :	Effet bactéricide des huiles d'olive RC, BC et SP sur les quatre souches test	83
Figure 22 :	Effet bactéricide des margines brutes BC sur les quatre souches test, après 30 min de contact	88
Figure 23 :	Effet bactéricide des margines brutes SP sur les quatre souches test, après 30 min de contact	89

Figure 24 :	Effet bactéricide des margines brutes RC sur les quatre souches test, après 30 min de contact	90
Figure 25 :	Effet bactéricide des margines ultrafiltrées (MU), extrait de margines (EM) et les margines épuisées (ME) sur <i>S. aureus</i>	91
Figure 26 :	Effet bactéricide des composés purifiés (Hy, EDA-like et AE) sur <i>S. aureus</i>	93

Liste des photographies

Photographie 1 :	Extraits phénoliques de l'huile d'olive sous une atmosphère de diazote.	43
Photographie 2 :	Filtration des extraits à travers les filtres millipores ($\varnothing = 0,22\mu\text{m}$)	44
Photographie 3 :	Le système chromatographique utilisé	46
Photographie 4 :	Filtration de l'extrait d'acétate d'éthyle à travers du papier-cellulose contenant du sulfate de sodium	48
Photographie 5 :	Ultrafiltration des margines	49
Photographie 6 :	Isolement et collecte manuelle des molécules par HPLC analytique	50
Photographie 7 :	L'ensemenceur automatique (<i>Spiral-plater</i>)	53
Photographie 8 :	Compteur automatique à haute résolution lié à un ordinateur.....	53

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Situation botanique de l'espèce <i>Olea europea L.</i>	04
Tableau 2 :	Répartition de la production mondiale de l'huile d'olive pour la campagne oléicole 2009-2010	05
Tableau 3 :	Orientations variétales de l'olivier en Algérie.....	10
Tableau 4 :	Évolution de production oléicole dans la région de Guelma	08
Tableau 5 :	Rendement en huile et caractéristiques des sous-produits obtenus avec les différents procédés d'extraction d'huile.....	14
Tableau 6 :	Caractéristiques physico-chimiques des margines	17
Tableau 7 :	Impact des margines sur l'environnement.....	18
Tableau 8 :	Les principaux composés phénoliques identifiés dans les différentes matrices de l'olivier (olives, grignons, margines, huile d'olive) et leurs poids moléculaire (Da)	27
Tableau 9 :	Les principaux biophénols présents dans les margines.....	31
Tableau 10 :	L'effet antimicrobien des extraits phénoliques des produits et sous-produits de l'olivier	34
Tableau 11 :	Activité antimicrobienne des margines brutes et leurs extraits phénoliques	35
Tableau 12 :	Caractéristiques des échantillons de l'huile d'olive, des grignons d'olives et des margines collectés	41
Tableau 13 :	Gradient d'éluion utilisé pour la séparation par HPLC.	46
Tableau 14 :	Caractéristiques des composés phénoliques purifiés.....	50
Tableau 15 :	Caractéristiques des bactéries-test utilisées.....	51
Tableau 16 :	Gamme de concentrations testées pour chaque échantillon de margines brutes	55
Tableau 17 :	Gamme de concentrations testées des trois formes des margines	55
Tableau 18 :	Résultats des mesures du pH des échantillons de margines	57
Tableau 19 :	Composés phénoliques identifiés dans les échantillons de l'huile d'olive, des grignons d'olives et des margines	59
Tableau 20 :	Concentrations moyennes des CP des extraits de l'huile d'olive (mg/Kg) quantifiés par HPLC selon la variété et le procédé d'extraction	72

Tableau 21 :	Concentrations moyennes des CP des extraits des grignons (mg/Kg) quantifiés par HPLC selon la variété et le procédé d'extraction	74
Tableau 22 :	Concentrations moyennes des CP des margines (mg/L) quantifiés par HPLC selon la variété et le procédé d'extraction	76
Tableau 23 :	Composition phénolique (mg/L) des margines SP brutes, ultrafiltrées, leur extrait phénolique et le SP épuisé	78
Tableau 24 :	Composition phénolique (mg/Kg) des échantillons de l'huile d'olive choisis pour les tests de l'activité antibactérienne	82
Tableau 25 :	Composition phénolique (mg/L) des trois margines brutes choisies pour les tests de l'activité antibactérienne	84
Tableau 26 :	Les concentrations minimales bactéricides des margines brutes (RC, BC et SP) sur les quatre souches test	86
Tableau 27 :	Gamme des concentrations des composés purifiés testées contre <i>S. aureus</i>	92



INTRODUCTION

Introduction

L'olivier (*Olea europaea L.*) est un arbre essentiellement méditerranéen, cultivé depuis les temps anciens pour produire les olives de table et l'huile d'olive. L'oléiculture revêt une importance non négligeable pour l'Algérie. La superficie implantée en olivier s'élève à 400 000 ha, avec une production de 63000 tonnes d'huile d'olive pour la campagne oléicole 2016/2017. L'Algérie occupe ainsi le 9ème rang mondial après l'Espagne, la Grèce, l'Italie, la Turquie, le Maroc, la Syrie, la Tunisie et le Portugal (**Rebour, 2005 ; MADRP, 2015 ; COI, 2017**).

Pour la production d'huile d'olive, les fruits sont récoltés de l'arbre à partir du mois de novembre, broyés puis malaxés pour augmenter le rendement en huile libérée. L'extraction de l'huile de la pâte d'olives peut s'effectuer selon différents processus : (i) discontinu à presse, (ii) continu à trois phases et (iii) continu à deux phases (**Klen et Vodopivec, 2012**). Trois différents produits et sous-produits sont générés pour les deux premiers processus (huile d'olive, grignons et margines) et seulement deux (huile d'olive et grignons humides) avec le système à deux phases. Même s'ils sont moins écologiques et génèrent de grandes quantités de margines, les procédés de pressage traditionnels et les procédés de centrifugation triphasiques sont toujours utilisés dans les huileries algériennes.

Comme toutes les industries agro-alimentaires, la trituration des olives engendre d'importantes quantités de résidus solides (grignons) et liquides (margines). Il est estimé qu'un mètre cube (1m³) de margines est équivalent à la pollution engendrée par 1200 habitants (**Benhayoun et Lazzeri, 2007**). Ces effluents ne subissent aucun traitement et sont souvent déversés dans les égouts d'assainissement, stockés dans des bassins d'évaporation ou épandus directement sur le sol. Il en résulte un impact négatif sur l'environnement qui se traduit par le colmatage des sols, la pollution des eaux superficielles et souterraines et le dégagement d'odeurs nauséabondes (**El Hajjouji, 2007**). Les volumes importants des margines produites durant une brève période, entre Novembre et Mars, de production d'huile d'olive aggravent ces dommages environnementaux dans les pays oléicoles méditerranéens (**Dermeche et al., 2013**).

De nombreuses études ont été menées avec le souci de trouver des solutions permettant le traitement des margines par des voies physiques, chimiques et/ou biologiques (**Ranalli, 1991 ; El Hajjouji et al., 2008 ; Achak et al., 2009**). Cependant, avec les contraintes économiques, il n'existe pas encore une solution universelle pour la valorisation des margines (**Lakhtar, 2009**).

La toxicité des margines est attribuée à leur grande richesse en matière organique (**Galli et al., 1997**), notamment en composés récalcitrants, difficiles à dégrader comme les composés phénoliques (CP), avec des concentrations qui peuvent atteindre 15 g/L (**El Hajjouji et al., 2007a**). Pendant le processus de fabrication de l'huile d'olive, la grande proportion des polyphénols, originaire des olives, est perdue dans les eaux de végétations ou margines. Seulement 2% des CP sont transférés dans la phase huileuse (**Rodis et al., 2002**).

Les profils phénoliques de l'huile d'olive, des grignons et des margines dépendent de plusieurs facteurs tels que le cultivar (**Laincer et al., 2016**), la maturation des fruits et le processus d'extraction de l'huile utilisé (**Laribi et al., 2009; Bengana et al., 2013**). Malgré la vocation oléicole de l'Algérie et la richesse de son patrimoine variétal, les travaux qui ont analysé la fraction phénolique des sous-produits oléicoles restent très limités, par rapport à la Tunisie et au Maroc.

Les polyphénols de l'olivier ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leurs propriétés biologiques (**Lopez-Miranda, 2010 ; Ghanbari et al., 2012**). Ils sont doués de diverses activités antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires, antiallergiques et antimicrobiennes (**D'Angelo et al., 2005; Visioli et al., 2005; Brenes et al., 2007**). Ces propriétés ont orienté les chercheurs, vers l'extraction et la valorisation de ces polyphénols dans divers domaines (agriculture, pharmacologie, agro-alimentaire) (**Paredes et al., 2000; Bouaziz et al., 2008; Lee et al., 2009**).

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait de l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. De nombreux cas de bactéries multi-résistantes sont rapportés en Algérie (**Bouzenoune et al., 2009**), pour cela le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ce phénomène. Nombreuses données existent sur l'effet antimicrobien des composés phénoliques des margines dans le bassin méditerranéen (**Larif et al., 2015 ; Leouifoudi et al., 2015 ; Rubio-Senent et al., 2015b ; Roila et al., 2016**). Cependant, à notre connaissance, aucun travail n'a testé l'effet antibactérien des margines générées par les huileries algériennes.

L'objectif général de ce travail consiste à identifier et quantifier la fraction phénolique des huiles d'olives, grignons et margines, issus de différentes huileries de la région de Guelma et à déterminer leurs éventuelles propriétés antibactériennes. Nous avons également étudié l'influence de deux paramètres à savoir la variété et le système d'extraction sur les profils phénoliques de ces produits et sous-produits.

Cette présente thèse est subdivisée en trois parties : une synthèse bibliographique, l'étude expérimentale et enfin les résultats et discussion.

La partie bibliographique comporte deux grands chapitres : le premier chapitre traite des généralités sur l'olivier, ses produits, ses sous-produits, ainsi que les différents systèmes d'extraction de l'huile d'olive ; le deuxième est consacré à l'étude des polyphénols de l'olivier, leurs propriétés biologiques et les méthodes utilisées pour leur analyse.

La partie expérimentale se déroule aussi en deux axes, le premier porte sur la caractérisation des profils phénoliques des produits (huile) et sous-produits (margines, grignons) de l'olivier, issus de deux procédés d'extraction, l'un moderne utilisant un système de trituration continu avec centrifugation à trois phases, l'autre est traditionnel utilisant un système d'extraction par presse. Les échantillons sélectionnés proviennent de trois différentes variétés algériennes d'olive, à savoir la *Rougette* de Guelma, la *Blanquette* de Guelma et la *Sigoise*. Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à évaluer le pouvoir antibactérien des polyphénols de l'huile d'olive et des margines contre différentes souches bactériennes à Gram positif et négatif. Une purification de certains CP a été également réalisée afin de tester l'effet antibactérien de chaque composé individuellement.

Enfin, dans la troisième partie, nous avons présenté et discuté les résultats obtenus, entre autre, les teneurs des composés phénoliques identifiés et les résultats des tests antibactériens, en les comparants à ceux publiés dans la littérature scientifique.



Revue

Bibliographique

Chapitre I : L'olivier

I. Généralités sur l'olivier

L'olivier, arbre spécifique du bassin méditerranéen, a été considéré depuis la nuit des temps comme symbole de la sagesse, de la paix, de la richesse et de la gloire, Cet arbre pousse dans un climat tempéré et il est réputé pour sa grande rusticité qui lui permette de s'adapter facilement aux sols rocheux, ingrats, caillouteux et arides. Il se caractérise par une longue durée de vie ; on peut même le considérer comme immortel, et il se multiplie très facilement par voie végétative ou à partir des boutures (**Amoretti et Comet, 1985**)

L'olivier est de 6 à 15 m de hauteur, à tronc rugueux et tortueux et à écorce grisâtre et crevassée. Les feuilles ne tombent jamais avec une durée de vie de trois ans. Elles sont persistantes lancéolées, leur situation sur le rameaux est opposée, la face supérieure des feuilles est luisante de couleur verte foncée, tandis que la face inférieure présent un aspect argenté dû à la pruine (**Benlemlih et Ghanam, 2012**).

Les fleurs, petites et blanches, à quatre pétales, se présentent le plus souvent en grappe naissant à l'aisselle des feuilles. Le fruit qui est l'olive est une drupe charnue et huileuse de forme ovale il est constitué d'un épicarpe fin et lisse qui recouvre un mésocarpe (la pulpe) est d'un noyau ou endocarpe. Elle pèse de 2 à 12 g, bien que certaines variétés puissent peser jusqu'à 20 g (**Nafzaoui, 1991 ; Sekour, 2012**).

1. Classification botanique

L'olivier appartient à la famille des *Oleaceae* et au genre *Olea*. Ce dernier comporte 33 espèces différentes, réparties sur la surface du globe, dont l'*Olea europea L.*, cultivée en Méditerranée, qui se divise à son tour en deux sous-espèces : *Olea europea sylvestris* ou l'olivier sauvage, qui se présente sous une forme spontanée comme un buisson épineux et à fruit ordinairement petit et *Olea europea sativa* ou l'olivier cultivé qui se constitue par un grand nombre de variétés améliorées, multipliées par bouturage ou par greffage (Tab.1) (**Green, 2002**).

Tableau 1. Situation botanique de l'espèce *Olea europea L.* (**Green, 2002**).

Embranchement	Magnoliophyta	Genre	<i>Olea</i>
Classe	Equisetopsida	Espèce	<i>Olea europea L.</i>
Ordre	Lamiales	Sous-espèces	<i>O. europea sylvestris</i>
Famille	Oleaceae		<i>O. europea sativa</i>

2. Patrimoine oléicole mondial

Le patrimoine oléicole mondial compte actuellement environ 750 millions d'oliviers cultivés sur une superficie de 9,23 millions d'hectares. Les pays méditerranéens comptent 715 millions d'oliviers sur une superficie d'environ 8.16 millions d'hectares, soit 95% du patrimoine oléicole mondial, assurant 95% de la production mondiale de l'huile d'olive (Fiorentino *et al.*, 2003; Tsagariki, 2007).

Parmi les pays producteurs européens, l'Espagne a une production d'huile d'olive très significativement élevée. Il est à noter que les principaux pays producteurs sont généralement les principaux consommateurs de l'huile d'olive (Tab. 2) (Benrachou, 2013).

Tableau 2 : Répartition de la production mondiale de l'huile d'olive pour la campagne oléicole 2009-2010 (COI, 2009).

Pays	Production (1000 t)	Production (%)
Espagne	1200	41,6
Italie	540	18,7
Grèce	348	12,1
Portugal	50	1,7
France	5	0,2
Total Europe	2148,4	74,6
Syrie	150	5,2
Turquie	147	5,1
Tunisie	140	4,9
Maroc	95	3,3
Algérie	50	1,7
Total Monde	2881,5	

3. Secteur oléicole en Algérie

L'Algérie, à l'instar des autres pays du bassin méditerranéen, renferme d'importantes ressources oléicoles. Elle offre à l'olivier un climat propice à sa culture (Tsagariki, 2007). L'olivier est toujours l'espèce fruitière la plus dominante du verger arboricole algérien. Le patrimoine oléicole algérien est estimé à 32 millions d'oliviers, dont 80% sont destinés à la production d'huile d'olive (Fig. 1) (Mendil, 2009).

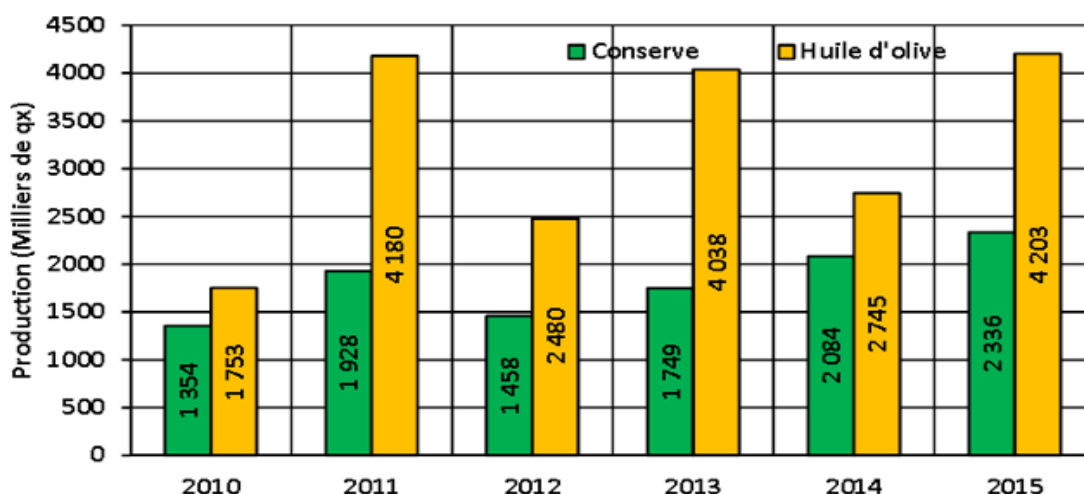


Figure 1 : Production annuelle des olives et de l'huile d'olive en Algérie (Labdaoui, 2017).

Selon les données du Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche (MADRP), la superficie oléicole totale de l'Algérie est estimée à 404 784 ha. Cette dernière est en nette progression suite aux différents encouragements de l'Etat par le biais du Programme National de Développement Agricole (PNDA), qui a incité les agriculteurs à planter cette culture. Ces superficies atteindront dans quelques années 583 000 ha, selon les projections du PNDA (Rebour, 2005; MADR, 2015).

Avec une production de 63 mille tonnes d'huile d'olive en 2016/2017, l'Algérie est classée au 9^{ème} rang mondial des pays producteurs de l'huile d'olive et la 3^{ème} au niveau maghrébin après la Tunisie et le Maroc (ONFAA, 2014; COI, 2017). D'après Belkessam (2013), la production d'olives de table a plus que quadruplé, passant de 346.730 quintaux (qx) en 2000 à plus de 1,4 million de qx en 2012, alors que celle de l'huile d'olive est passée de 333 mille hectolitres (hl) en 2000 à 728 mille hl en 2011.

Selon les déclarations de Mendil (2018), le directeur général de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV), d'ici 2025, l'Algérie pourrait se positionner parmi les cinq premiers producteurs mondiaux de l'huile d'olive au sein du Conseil Oléicole International (COI) (Aït Allouache, 2018).

Le potentiel oléicole se répartit principalement dans trois régions : le Centre Nord (Tizi-ouzou, Bouira et Bejaia) occupe la première place avec 54,33 % de la surface totale du verger oléicole national ; L'Est du pays (Jijel, Guelma, Skikda, et Mila) vient en seconde position avec 28,27 % ; La région Ouest qui occupe à peine 17%, dont l'ensemble est concentré à Tlemcen et Mascara. Enfin, la région Sud occupe 0,45% du patrimoine nationale.

A noter que les olives des régions Centre et Est sont destinées à la production de l'huile d'olive, alors que celles de l'Ouest sont pour la conserverie (olives de table) (**Aggoun-Arhab, 2016**).

La production d'huile d'olive est une activité traditionnelle en Algérie, elle connaît des variations importantes d'une année à l'autre, dues à divers facteurs tels que la productivité alternante caractéristique de certaines variétés, la pluviométrie, les incendies de forêts dans certaines régions du pays et les pratiques culturelles.

L'absence de laboratoires spécialisés, d'unités de conditionnement, et la non maîtrise du processus complet, font, également, que l'huile d'olive algérienne ne peut rivaliser avec les productions des pays concurrents malgré sa qualité indéniable.

Le nombre d'huileries en Algérie est de l'ordre de 1715 (**MADRP, 2015; In Labdaoui, 2017**) réparties comme suit :

- 902 huileries fonctionnent par le processus discontinu traditionnel, utilisant la technique de presse ;
- 383 huileries semi-automatiques utilisant le système discontinu ;
- 430 utilisent le procédé continu généralement à trois phases.

Cela dénote clairement que l'industrie oléicole algérienne est toujours archaïque, ou le système traditionnel discontinu présente un taux de 75%.

4. Diversité oléicole dans le monde

Les variétés d'olives se divisent en trois catégories :

- Les variétés à huile sont principalement destinées à l'extraction de l'huile et sont caractérisées par un rendement variable mais normalement non inférieur à 16 - 18 % ;
- Les variétés de table sont les variétés dont les fruits sont destinés à la consommation directe ;
- Les variétés à double aptitude sont celles qui peuvent être utilisées tant pour l'extraction de l'huile que pour la production d'olives de table.

L'identification variétale peut être effectuée à l'aide des marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires (**Benrachou, 2013**). Le patrimoine génétique oléicole mondial est très riche en variétés d'olivier (*Olea europaea* L.), cultivées et spontanées. Il est constitué actuellement de plus de 2 600 variétés différentes. La majeure partie de ces cultivars vient des pays européens méridionaux tels que l'Italie (800 cultivars), l'Espagne (272 cultivars) et la Grèce (52 cultivars) (**Barranco et Rallo, 2000; Bracci et al., 2009; Muzzalupo, 2012**).

5. Diversité oléicole en Algérie

Par sa position stratégique, l'Algérie a été un relais de la diversité phylogénétique entre l'Europe, l'Est et l'Ouest de la Méditerranée. Cette position a contribué largement à la richesse de notre patrimoine génétique de l'olivier. L'Algérie dispose d'un patrimoine constitué de 164 cultivars autochtones et introduits de toute la méditerranée et même d'outre Atlantique. Les travaux de caractérisation entamés par **Mendil et Sebai (2006)** ont permis de répertorier 72 variétés autochtones dont 36 sont homologuées, le reste est en cours de réalisation. Le tableau 3 montre les variétés nationales les plus dominantes en fonction de la destination du produit (huile d'olive ou olives de table et leurs caractéristiques).

6. Oléiculture dans la région de Guelma

L'olivier est présent presque à travers l'ensemble du territoire de la wilaya de Guelma, grâce à sa grande capacité d'adaptation à différents types de sols. Les zones à fort potentiel sont situées dans les régions de Bouchegouf, Guelaât Bousbaâ, Hammam N'bails, Dahoura, Hammam Debagh, Roknia, Héliopolis et Nechmaya qui sont réputées pour la qualité de leur huile d'olive et qui recèlent des variétés locales d'olives comme la *Blanquette*, la *Rougette* et *Chemlel* (**Guergour, 2010**).

La région de Guelma possède un potentiel oléicole très important avec 17 huileries opérationnelles et 222 505 oliviers productifs, sur une superficie oléicole de 9 500 hectares (ha). La production en l'huile d'olive avait atteint 2 364 000 litres durant la campagne oléicole 2015/2016 (Tab. 4) (**Ahmed, 2016; Dadci, 2017**).

Tableau 4 : Évolution de la production oléicole dans la région de Guelma.

Compagne	Superficie (ha)	Olives (qx)	Huile d'olive (L)	Référence
2005 - 2006	-	-	1 200 000	(Nacer, 2006)
2008 - 2009	7 746	61 055	1 330 000	(Dadci, 2009)
2010 - 2011	-	74.430	1 259 500	(Menani, 2011)
2012 - 2013	-	144 200	1 847 300	(Menani, 2013)
2013 - 2014	9 000	17 000	2 109 500	(Baali, 2015)
2014 - 2015	-	31 120	512 400	(Dadci, 2015)
2015 - 2016	9443	129 420	2 364 000	(Ahmad, 2016)
2016 - 2017	-	27 000	460 400	(Dadci, 2017)
2017-2018	9500	104 585	1 950 000	(Dadci, 2017)

(-) : données non disponibles

II. Du fruit d'olive à l'huile d'olive

La production de l'huile d'olive a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. Les méthodes d'extraction ont évolué mais le processus d'extraction de l'huile reste toujours le même. Il inclut quatre opérations principales (Fig. 2) : Le nettoyage des fruits, le broyage, le malaxage et enfin l'extraction ou séparation des phases : grasse (huile), solide (grignons) et aqueuse (eau de végétation ou margines) (**Benlemlih & Ghanam, 2012**).

1. Nettoyage

Le nettoyage des olives commence par effeuillage qui se fait généralement par aspiration afin d'éliminer les brindilles et les feuilles, suivi par un lavage pour éliminer les matières étrangères (saletés, moisissures...) adhérentes aux olives. Une succession de plusieurs lavages semble nécessaire à l'obtention d'un produit bien débarrassé de ses impuretés (**Chimi, 2006**). Ces dernières opérations sont indispensables parce qu'elles préservent les broyeurs métalliques, d'une part, et évitent l'altération des propriétés organoleptiques de l'huile (couleur foncé, odeur, goût amer) d'autre part (**Aissam, 2003**).

2. Broyage et malaxage

Cette opération consiste à la dilacération des parois et des tissus des olives afin de libérer les gouttelettes d'huile contenues dans les vacuoles des cellules d'olives. Le broyage s'effectue à l'aide des moulins en pierre (installations traditionnelles), des marteaux ou des disques (installations modernes) (**Veillet, 2010**).

Le malaxage consiste en un broyage lent et continu de la pâte d'olives, à température appropriée, afin de libérer le maximum d'huile en brisant les vacuoles qui sont restées entières durant la phase de broyage et d'amasser les gouttelettes d'huile en gouttes plus grosses. Le temps de malaxage varie en général entre 15 à 30 min (**Aissam, 2003; Sifoun, 2008**).

3. Extraction

Le broyage et le malaxage aboutissent à la formation d'une pâte homogène qui facilite l'extraction de l'huile d'olive. Cette dernière contient de la matière solide et des fluides. La matière solide appelée grignons d'olives est formée de débris de noyaux, d'épiderme, et de parois cellulaires, alors que la partie fluide est composée d'huile et des margines (**Benlemlih & Ghanam, 2012**).

Tableau 3 : Orientations variétales de l'olivier en Algérie (Benrachou, 2013 ; Aggoun-Arhab, 2016).

N°	Variété	Air de culture	Importance	Destination	Rendement	Caractéristiques
01	<i>Abani</i>	Khenchela	-	Huile	13%	-
02	<i>Aberkane</i>	Kabylie	-	Double fin	-	-
03	<i>Ascolana</i>	Ouest	-	Table	-	Fertilité excellente et régulière, bonne rusticité de l'arbre, résiste au froid.
04	<i>Azeradj</i>	Petite Kabylie	15%	Double fin	24 à 28%	Arbre rustique, très bon pollinisateur de <i>Chemlal</i> , résistant à la sécheresse. Gros fruit (5g), de forme allongée.
05	<i>Blanquette</i>	Nord-Est (Guelma)	20%	Double fin	18 à 22%	Tardive, vigueur moyenne, résistante au froid et moyennement à la sécheresse, fruit moyen de forme ovoïde.
06	<i>Bouchouk</i>	Centre	2%	Double fin	-	Intéressante pour la région de Bougaa (Sétif).
07	<i>Boukhenfas</i>	Centre-Nord	2%	Huile	-	Donne des meilleurs résultats dans la station de Sidi-Aich
08	<i>Bouricha</i>	El-Harrouche (Skikda)	5 à 6 %	Huile	18 à 22 %	Cultivée dans les régions à forte pluviométrie, rustique, résistante au froid et à la sécheresse. Fruit de faible poids, de forme allongée.
09	<i>Chemlal</i>	Kabylie	10%	Huile	18 à 22 %	Donne une huile très appréciée, autostérile, à floraison tardive. Fruit de poids faible (2,5 g) de forme allongée.
10	<i>Coratina</i>	Centre et Est	1%	Huile	-	Variété d'origine italienne, très rigoureuse et très productive, sensible au froid. Fruit de taille moyenne (3,8 g).
11	<i>Cornicabra</i>	Ouest	5 %	Double fin	-	Très bon pollinisateur de <i>Sigoise</i> , originaire d'Espagne.
12	<i>Dahbia</i>	-	-	Huile	-	Bonne résistance au froid.
13	<i>Ferkani</i>	Ferfane (Tébessa)	-	Huile	28 à 32 %	Vigueur moyenne, résistante au froid et à la sécheresse, fruit moyen de forme allongée, variété en extension en régions steppiques et présaharienne.

14	<i>Frontoio</i>	Centre et Est	1%	Huile	-	Variété d'origine italienne, bon pollinisateur de <i>Chemlal</i> , excellente résistance au froid. Olives de taille moyenne, allongée. Huile de grande qualité.
15	<i>Grosse de Hamma</i>	Hamma (Constantine)	-	Double fin	16 à 20 %	Meilleure variété de la région constantinoise pour la conservation, nécessite des irrigations. Précoce, rustique, très gros fruit de forme allongée.
16	<i>Limli</i>	Kabylie	8%	Huile	20 à 24 %	Précoce, peu tolérante au froid, résistante à la sécheresse ; petit fruit (2 g) de forme ovoïde.
17	<i>Longue de Miliana</i>	Centre (Miliana)	5%	Double fin	16 à 20 %	Précoce, sensible au froid et à la sécheresse, fruit moyen de forme ronde.
18	<i>Neb Djmel</i>	Sud-Est	5%	Double fin	-	Variété des régions présahariennes
19	<i>Picholine Marocaine</i>	Ouest	30%	Huile	-	Très commune avec la <i>Sigoise</i> (mêmes caractères)
20	<i>Ronde de Miliana</i>	Centre et Ouest	5%	Double fin	-	Très localisée dans la région de Miliana.
21	<i>Rougette</i>	Est (Guelma)	12 %	Huile	18 à 22 %	Précoce, résistante au froid et à la sécheresse, fruit ovoïde de faible poids.
22	<i>Rougette de Mitidja</i>	Plaine de Mitidja	-	Huile	18 à 20 %	Rustique, fruit moyen de forme allongée.
23	<i>Sevillane</i>	Ouest (Oran)	3%	Table	-	Importée de l'Espagne. Très intéressante par le gros calibre des fruits.
24	<i>Sigoise</i>	Ouest (Mascara)	25%	Double fin	18 à 22 %	variété rustique, peu résistante au froid, auto-fertile. Fruit assez gros (3 à 3,5g), ovoïde.
25	<i>Souidi</i>	Chachar (Khenchla)	-	-	16 à 20 %	Variété tardive, résistante au froid et à la sécheresse, fruit moyen de forme allongée.

(-) Données non disponibles.

Les systèmes de séparation des phases (grasse, solide et aqueuse) utilisés sont au nombre de trois, le système discontinu d'extraction par presse, le système d'extraction continu à trois phases et le système d'extraction continu à deux phases (Fig. 3) (**Chimi, 2006 ; Takaç et Karakaya, 2009**).

3. 1. Système discontinu

Le système discontinu présente le procédé le plus traditionnel d'obtention de l'huile d'olive. Il utilise des presses métalliques à vis ou bien des presses hydrauliques. La pâte issue du malaxage est empilée sur des disques de matière filtrante (toile ou, plus récemment, fibre plastique) appelés scourtins à raison de 5 à 10 kg par scourtin. Ces disques sont empilés les uns sur les autres pour être ensuite pressés. L'opération de pressage dure au moins 45 minutes (**Benyahia et Zein, 2003**). Il est à noter que les scourtins doivent être lavés, selon la norme internationale en vigueur, à raison d'une fois par semaine pour éviter d'augmenter l'acidité de l'huile d'olive (**Chimi, 2006**).

Après l'étape de pression, on procède à une décantation naturelle du liquide obtenu dans des bassins, l'huile remonte à la surface et les margines sont récupérées en bas. Contrairement au système continu, où la séparation des phases (grasse et aqueuse) se fait par une centrifugation, ici la séparation est basée sur la différence de densité entre l'huile et l'eau de végétation (**Aissam, 2003 ; Benyahia et Zein, 2003**). Les grignons d'olives, contenant environ 4% d'huile, restent quant à elles emprisonnées dans les scourtins (**Veillet, 2010**).

Les opérations de broyage et de pressage de la pâte des olives, conduites en pleine air, peuvent entraîner l'altération de l'huile de cette pâte qui est exposée à l'air libre durant environ une heure. En effet, l'auto-oxydation de l'huile déclenchée par la présence de l'air provoque la dégradation des acides gras insaturés et par conséquent la formation des hydroperoxydes qui peuvent se décomposer et donner lieu à des produits volatils conduisant à un état de rancissement de l'huile. Un autre inconvénient de ce système, c'est qu'il génère des quantités importantes de margines (60 à 70 L par 100 Kg d'olives). Néanmoins, l'avantage du système de presse est l'obtention d'une huile non piquante et riche en polyphénols (**Hamadi, 2006**).

3.2. Système continu à trois phases

Contrairement au procédé discontinu, cette méthode permet une extraction successive de l'huile d'olive. La pâte d'huile provenant du malaxage est soumise à une centrifugation donnant trois fractions : les grignons, les margines et l'huile d'olive (**Nefzaoui, 1987**).

Ce système d'extraction a permis de surmonter les multiples inconvénients associés à l'extraction par pression dont la réduction des coûts de transformations et la durée du stockage des olives et donc une huile d'olive de moindre acidité. Néanmoins, ce système consomme d'importantes quantités d'eau chaude ce qui fait que l'huile extraite se trouve appauvrie en composés aromatiques et en composés phénoliques avec comme conséquences une résistance plus faible à l'oxydation. Ces composés passent partiellement dans les margines générées en grandes quantités (Chimi, 2006).

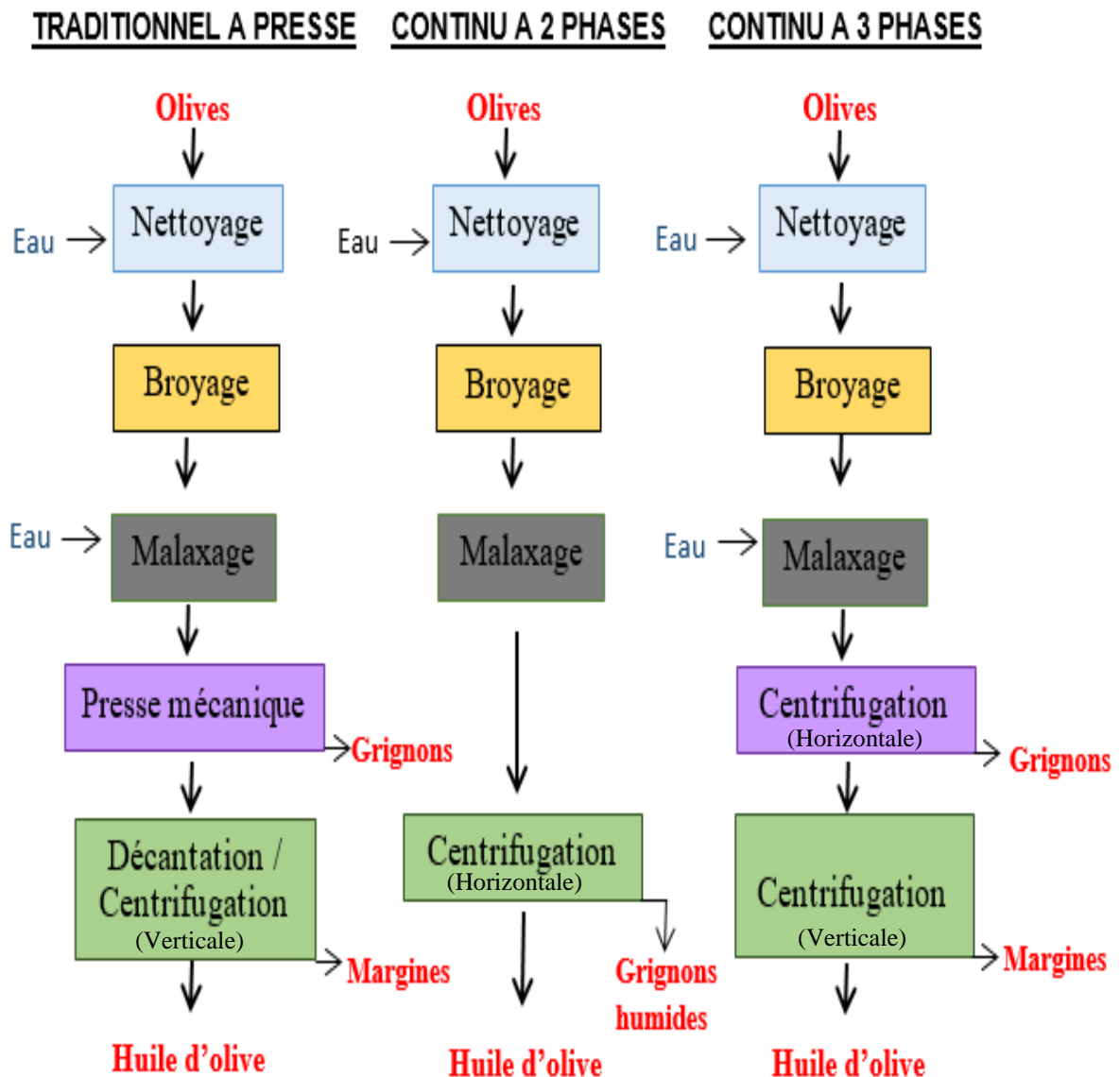


Figure 2 : Schéma des trois procédés d'extraction de l'huile d'olive (Zbakh et El Abbassi, 2012).

3.3. Système continu à deux phases

Le décanteur à deux phases a été conçu pour pallier les inconvénients des deux systèmes précédents. En pratique, il s'en différencie par une moindre utilisation d'eau. La centrifugation

sépare deux fractions seulement, une fraction huileuse et une fraction solide de consistance pâteuse appelée grignons-humides ou grignons à deux phases contenant les grignons d'olives et les margines.

Ce système permet d'obtenir une huile riche en polyphénols totaux et avec un rendement légèrement plus élevé en comparaison avec les huiles obtenues avec le décanteur conventionnel à trois phases et le système d'extraction par presse. En outre, ce système est plus respectueux de l'environnement (procédé écologique) car il ne procède pas à l'augmentation des volumes d'effluent liquides (**Benyahia et Zein, 2003**).

Tableau 5 : Rendement en huile et caractéristiques des sous-produits obtenus avec les différents procédés d'extraction de l'huile d'olive (**Chimi, 2006 ; Hamadi, 2006**).

Déterminations	Continu à 2 phases	Continu à 3 phases	Discontinu à presse
Rendement (%)	86.1	85.5	84.5
Grignons			
Quantité (kg/100 kg d'olives)	75.5	57.5	45.5
Humidité (%)	57.3	55.4	35.5
Huile (%)	3.5	3.6	6.8
Margines			
Volume (L / 100 Kg d'olives)	3.6	90	75
Huile (Kg /100 Kg d'olives)	0.06	1.05	2.4
Huile totale dans les sous- produits (Kg/100 Kg d'olives)	2.8	3.1	7.8

III. Les produits et les sous-produits de l'olivier

L'industrie oléicole, en plus de la production d'huile d'olive engendre deux types de sous -produits, l'un liquide, représenté par des eaux de végétation ou margines et l'autre solide représenté par les noyaux d'olives ou grignons. En outre, l'olivier, à travers la taille génère des feuilles, des brindilles et du gros bois (**Nefzaoui, 1991**).

Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% de margines (**Di-Giovacchino et al., 1989**). Ces dernières résultent de l'eau contenue dans le fruit (olives) et l'eau de fabrication ajoutée au cours du processus de trituration (**Achak et al., 2009**).

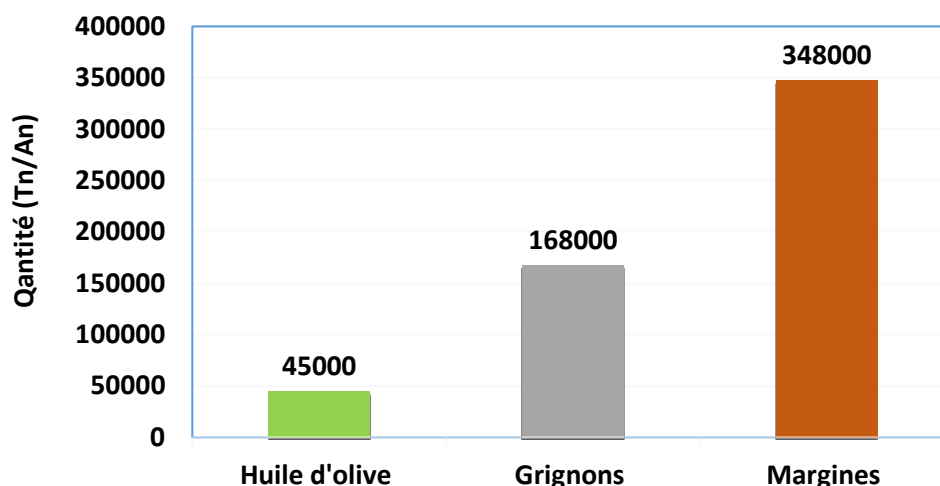


Figure 3 : Bilan annuel des produits et sous-produits de l'industrie oléicole en Algérie (Khodja, 2011).

1. Huile d'olive

On désigne par l'huile d'olive vierge toute huile extraite du fruit de l'olivier (*Olea europaea L.*) uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques et dans des conditions, notamment thermiques, n'entraînant pas d'altération de l'huile, à l'exception des huiles obtenues par solvant ou par des procédés de ré-estérification et de tout mélange avec des huiles d'autre nature. L'huile d'olive vierge ne doit avoir subi aucun autre traitement que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration (COI, 2003).

L'huile d'olive vierge comprend diverses appellations : vierge extra, ou vierge fine, vierge courante et vierge lampante (Perrin, 1992). L'appartenance à une catégorie est définie en fonction de l'évaluation de quelques paramètres de qualité de l'huile d'olive à savoir : l'acidité, l'indice de peroxyde, l'absorbance dans l'UV et les caractéristiques organoleptiques (Fedeli, 1999).

L'intérêt pour l'huile d'olive a été accru depuis la découverte de sa richesse en vitamines liposolubles et en polyphénols qui sont des antioxydants. Elle constitue également une source importante d'acides gras poly-insaturés essentiels car non synthétisables par le corps humain (Veillet, 2010).

2. Grignons d'olives

Les grignons sont les résidus solides formés de la pulpe et des noyaux d'olives, elles représentent environ un tiers du poids des olives fraîches triturées. Les grignons peuvent être transformés en un produit destiné à l'alimentation animale, engrais et la fabrication de savon, ou subir une extraction chimique afin de produire de l'huile de grignons d'olive (Labdaoui, 2017).

3. Margines

Les margines présentent un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre, d'aspect trouble et d'une odeur spécifique d'huile d'olive. Elles sont caractérisées par un pH acide de 4 à 5 et d'une conductivité électrique élevée due surtout aux ions potassium (4 g/L), chlorure calcium et magnésium. Sa couleur noire résulte de la présence des polyphénols (**Rodis, 2002**).

3.1. Composition chimique des margines

La composition chimique des margines est assez variable, elle dépend de nombreux facteurs, en particulier du mode d'extraction de l'huile (presse ou centrifugation), mais aussi des conditions climatiques, la situation géographique, la variété d'olives, le stade de maturation des olives, le temps, les techniques et le lieu de stockage des olives avant leur trituration (**Aissam, 2003; Hanafi et al., 2009**). Cette composition a été bien étudiée et comporte typiquement 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matière organique et 0.4 à 2.5% de substances minérales (**Ranalli, 1991 ; Ramos-Cormenzana, 1996 ; Noubih et al., 2007**).

3.1.1. Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques. Une fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives, Cette fraction représente les matières en suspension et colloïdales. Et une fraction soluble dans la phase aqueuse contenant les sucres (13-53%), les lipides (1-14%), les acides organiques (3-10%) et les composés phénoliques (2-15%) (**Hamdi, 1991 ; Fiestas et Borja, 1992 ; Obied et al., 2005a**).

3.1.2. Fraction minérale

Les margines contiennent des quantités significatives de sels minéraux (dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorure) et 20% insoluble (carbonate et silicates). Les éléments les plus représentatives sont le potassium 47 %, les carbonates 21%, les phosphates 14% et le sodium 7% (Tab. 6) (**Rannalli , 1991; Tsagariki et al., 2007**).

3.2. Caractère polluant des margines

Les effluents d'huilerie d'olive posent un sérieux problème de contamination pour tous les pays oléicoles. Un mètre cube de margines est équivalent à la pollution engendrée par 1200 habitants. 25 à 40 millions de mètre cube de margines sont produits annuellement dans le monde, le 90% est localisé dans le bassin méditerranéen et déversés dans la nature sans traitement préalable (**Benhayoun et Lazzeri, 2007**).

Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques des margines (Amirantes, 1999).

Paramètres	Valeurs
pH	5.0 – 5.5
DCO (mg/L)	60000 - 180000
DBO ₅ (mg/L)	20000 - 55000
Chlorures (mg/L)	5 - 6
Phosphore (mg/L)	50 - 70
Phosphates (mg/L)	170 - 190
Azote ammoniacque (mg/L)	100 - 150
Azote nitrique (mg/L)	3 - 4
Azote nitreux (mg/L)	5.5 – 6.5
Potassium (mg/L)	4000 - 6000
Sodium (mg/L)	15 - 25
Résidus secs (mg/L)	30 - 120

Les margines ont un pouvoir polluant élevé avec une demande chimique en oxygène (DCO) qui peut varier de 40 à 220 g d'O₂/L et une demande biologique en oxygène pendant 5 jours (DBO₅) de 35 à 110 g d'O₂/L (Niaounakis et Halvadakis, 2006).

L'acidité des margines, leur teneur élevée en polyphénols et leur grande charge en matière organique représentent les principaux paramètres responsables de leur caractère polluant. Ces derniers affectent la qualité des eaux et des sols dans lesquelles elles sont déversées. Les mauvaises odeurs, introduites par les margines, provoquent également une pollution considérable de l'air (Tab. 7) (Benyahia et Zein, 2003).

3.3. Valorisation des margines

Les sous-produits oléicoles sont partiellement ou totalement perdus pour certains pays, alors que leurs possibilités d'utilisation sont multiples. Selon Moussouni (2009), en Algérie les pertes annuelles dans les déchets solides (grignons) sont d'environ 16.000 t de matières organiques et 21.000 t de matières énergétiques.

Tableau 7 : Impact des margines sur l'environnement (Mebrouk, 2002; Benyahia et Zein, 2003; El Hajjouji *et al.*, 2007).

	Effets	Facteurs polluants
Air	- Dégagement des odeurs désagréables liées à la formation du sulfure d'hydrogène (H ₂ S) lors de la fermentation.	H ₂ S
Eaux	- Coloration des eaux naturelles et affection de leur qualité ; - L'asphyxie de la faune et de la flore aquatique ; - Diminution de la capacité de l'autoépuration ; - Formation d'un film imperméable empêchant la pénétration des rayons lumineux et de l'oxygène.	- La matière organique - La matière grasse - L'acidité
Sols	- Inhibition de l'activité microbienne du sol ; - Dégradation de la qualité des sols ; - Effets toxiques sur les cultures végétales.	* Les composés phénoliques

Dans les déchets liquides (Margines) on retrouve : 650 t de matière organique, 300 t d'Azote et près de 600 t d'éléments minéraux (Potassium, Phosphore, Calcium, Magnésium...), ajouté à cela une perte considérable d'eau (en moyenne 15.000 litres par jour au niveau de chaque huilerie).

La valorisation de ces sous-produits permet, entre autres, de minimiser les problèmes de pollution engendrés par les effluents des huileries et de contribuer à compenser le déficit fourrager surtout dans les pays d'Afrique du nord (Nefzaoui, 1991).

La richesse des margines en éléments nutritifs, minéraux et organiques, a amené les chercheurs à mettre au point de nombreux procédés de valorisation dans de nombreux domaines comme la biotechnologie, la chimie et l'agriculture (Aissam, 2003).

- L'application du processus de la digestion anaérobie aux margines permet de transformer environ 80% des substances organiques en biogaz (65 à 70% de méthane) ;
- La récupération des composants phénoliques des margines, tels que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol, qui présentent un pouvoir antimicrobien et antioxydant très élevés ;
- Les margines peuvent être également exploitées dans l'alimentation des bétails, la production des composts fertilisants aux sols ou dans la production des protéines d'organismes unicellulaires (POU) et de diverses enzymes (lipases, laccases, ...).

Chapitre II : Les composés phénoliques

I. Généralités

1. Définition

Le terme «polyphénols» est utilisé fréquemment pour désigner l'ensemble des composés phénoliques (CP) des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Donc la désignation générale «composés phénoliques» est plus correcte et précise, elle concerne à la fois les mono et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (**Macheix *et al.*, 2005**).

Le terme « biophénols » fut inventé par **Romeo et Uccella** en **1996** pour désigner les phénols bioactifs des olives en remplacement du terme « polyphénol » plus commun mais plus vague d'un point de vue chimique. Utilisé au départ uniquement dans la chimie des olives, le terme a gagné une popularité et est actuellement utilisé par les chercheurs faisant référence aux phénols des végétaux en général.

Les CP sont des substances naturelles caractéristiques du métabolisme secondaire des plantes. Ils n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction) mais participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (**Merghem, 2009**).

2. Distribution

Les CP sont largement rencontrés dans le règne végétal. Chez l'homme, l'alimentation est la principale source des composés phénoliques, ils représentent des éléments importants de la qualité sensorielle (couleur et caractères organoleptiques et nutritionnelles) des végétaux. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également dans les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les graines oléagineuses et les légumineuses secs (**Bahorun, 1997 ; Macheix *et al.*, 2005**).

3. Structure

L'élément fondamental qui caractérise les CP est la présence d'au moins un noyau benzénique, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH), libre ou engagé dans une autre fonction. Les CP se trouvent généralement conjugués aux sucres et aux acides organiques (**Crozier *et al.*, 2006**). Selon **Ribereau-Gyon (1968)**, les principaux composés phénoliques ne se trouvent pas à l'état libre mais sous forme d'esters ou d'hétérosides.

Les CP peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Dalton, comme les tanins (**Merghem, 2009**).

4. Classification

Les CP sont répartis en différents groupes définis en fonction :

- de la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées) ;
- du degré de modification du squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation) ;
- des liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules glucidiques, lipidiques ou protéiques (**Herbert, 1989; Sarni-Manchado et Cheyner, 2006**).

Les alcools et les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins et les lignanes sont considérés comme les principales classes des composés phénoliques (**Harborne, 1980; Muanda, 2010**).

4.1. Alcools phénoliques

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (*Ericaceae, Rosaceae, ...*). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Cowan, 1999**).

4.2. Acides phénoliques

Ils englobent les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C₆-C₁), suivis des dérivés d'esters hydroxycinnamiques (C₆-C₃) (**Barboni, 2006**).

4.2.1. Acides hydroxybenzoïques

Ils sont particulièrement représentés chez les gymnospermes et les angiospermes. Les acides hydroxybenzoïques (parahydroxybenzoïques, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicyclique, gentisique, etc.) existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides (**Bruneton, 1993; Macheix et al., 2005**).

4.2.2. Acides hydroxycinnamiques

Comme l'acide para-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique qui ont une distribution très large ; les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents (**Bruneton, 1993**).

4.3. Coumarines

Les coumarines qui sont les dérivés de (C₆-C₃), appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone (**O’Kennedy et Thornes, 1997**) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l’état libre ou bien combiné avec des sucres. Plus d’un millier de coumarines naturelles ont été décrites. Elles sont responsables de l’odeur caractéristique du foin (**Cowan, 1999**).

4.4. Quinones

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l’oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques (C₆-C₄). Elles sont caractérisés par un motif 1,4-dicéto cyclohexa- 2,5 diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa- 3,5- diénique (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Elles sont ubiquitaire dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (**Cowan, 1999**).

4.5. Xanthonnes

Constituants phénoliques possédant une structure hétérocyclique (C₆-C₁-C₆) assez similaire aux flavonoïdes. Les xanthonnes sont principalement rencontrés chez les plantes supérieures (**Ferreira, 2017**).

4.6. Stilbènes

Les membres de cette famille possèdent une structure (C₆-C₂-C₆), ce sont des phytoalexines. Les stilbènes sont produits par les plantes en réponse à l’attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (**Crozier et al., 2006**).

4.7. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils participent à l’apparition de différents pigments jaunes, orangés et rouges de différents organes de végétaux. Les flavonoïdes sont caractérisés par la présence d’un noyau flavone, ils possèdent une structure générale en (C₆-C₃-C₆) et sont composés de deux cycles benzoïques reliés par un cycle pyrone (**Rice Evans et al., 1996; Hakkinen, 2000**).

Les flavonoïdes se rencontrent également associés à des sucres, et se distinguent généralement par six différentes sous-classes : anthocyanes, flavanols, flavanones, flavones, flavonols et isoflavones (**Ferreira, 2017**).

4.8. Lignanes

Ils résultant de l’union de deux résidus d’acides cinnamiques (C₆-C₃)₂ ou ses dérivés

biogènes. Les lignanes sont caractérisés par une distribution botanique très large (**Ferreira, 2017**).

4.9. Lignines

Constituants phénoliques à structure complexe, composés de polymères de monolignols $(C_6-C_3)_n$. Les lignines forment la troisième famille de composés les plus abondants chez les plantes et dans les écosystèmes terrestres, après la cellulose et l'hémicellulose (**Ferreira, 2017**).

4.10. Tanins

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins, différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition (**Haslam, 1989**).

- Les tanins hydrolysables : ce sont des esters de glucose et d'acide gallique. Ils sont d'abord caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique (enzymatique). Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide (l'acide éllagique) ;
- Les tanins condensés : ce sont des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères. Ils ont la propriété de coaguler les protéines (**Guignard, 2000**).

5. Biosynthèse

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (Fig. 4). Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (**Bruneton, 1993; Macheix, 1996**).

II. Composés phénoliques de l'olivier

L'olivier et ses dérivés (feuilles, olives, huile, margines et grignons) regroupent toute une gamme de composés phénoliques. Le profil phénolique dans chaque dérivé est très variable, tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Cette variabilité est fonction de plusieurs facteurs notamment, les conditions pédo-climatiques, le degré de maturité des olives au moment de la récolte, les techniques culturales (entretien des arbres, irrigation) et les techniques de trituration

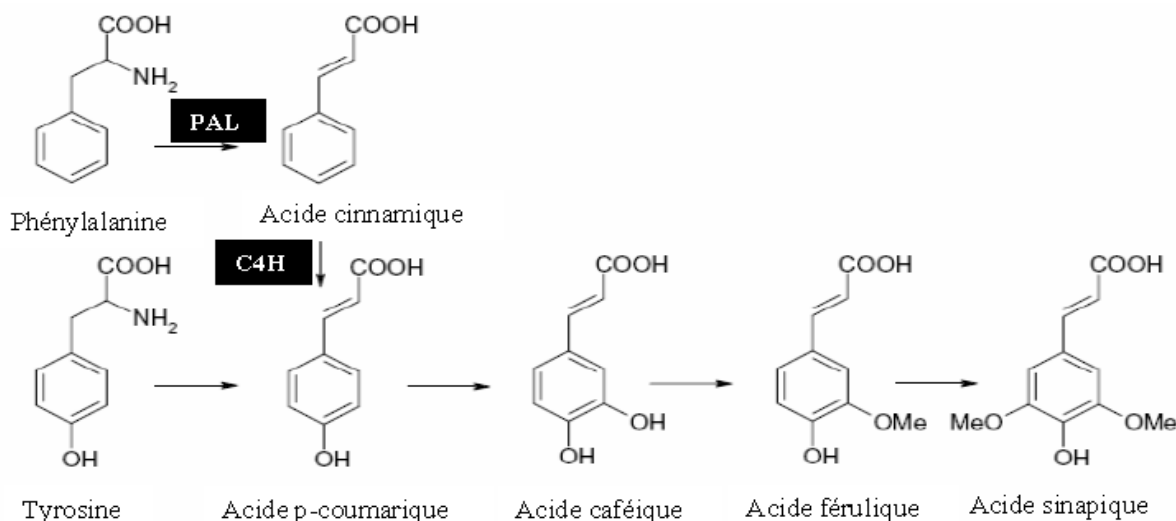


Figure 4 : Biosynthèse des composés phénoliques les plus largement distribués par la voie de shikimate [PAL : Phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : Cinnamate 4-hydroxylase] (Crozier *et al.*, 2006 ; In Benhammou, 2012).

de l'huile d'olive (Romani *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2000; Botia *et al.*, 2001; Vinha *et al.*, 2005). Enfin le facteur le plus déterminant de tous est la variété des olives cultivées. De nombreuses études ont montré que certaines variétés d'olives étaient plus riches en composés phénoliques que d'autres). Il a été montré que la variété espagnole *Cornicabra* avait beaucoup plus de composés phénoliques que *Picolimon*, ou encore, la variété portugaise *Madural Fina* était plus riche en composés phénoliques que la *Borrenta* (Tura, 2007 ; Gomez, 2008 ; Tura, 2008 ; In Veillet, 2010).

1. Classes des polyphénols de l'olivier

Selon Obied et ses collègues (2007a), les polyphénols de l'olivier sont très variés et peuvent être répertoriés en sept groupes majeurs à savoir : les alcools phénoliques, les dérivés benzoïques, les dérivés cinnamiques, les flavonoïdes, les isochromanes, les lignanes, et les secoiridoïdes. Les constituants de ces différents groupes referment à leur tour des « O-glucosides » pour lesquels un ou plusieurs groupements hydroxyles sont liés à un ou plusieurs sucres. Parmi ces sucres figurent principalement le glucose et en faible proportion le rhamnose et les disaccharides (Karray, 2013).

1.1. Alcool phénoliques

L'hydroxytyrosol et le tyrosol représentent les alcools phénoliques les plus importants, de cette classe de phénols (Bendini *et al.*, 2007). Ce sont des dérivés du phényl-éthanol et peuvent se trouver sous différentes formes.

1.1.1. Hydroxytyrosol

Il appartient au groupe des *o*-diphénols, et il est connu par ses propriétés antioxydantes (**Riachy et al., 2011**). Il peut se trouver en forme libre ou estérifiée ; i) avec l'acide élénolique formant l'oleuropéine, l'oleuropéine aglycone (Hy-EA) ou le décarboxy-méthyle oleuropéine aglycone (Hy-EDA), ii) avec l'acide caféique formant le verbascoside, et iii) en forme glucosidique comme l'hydroxytyrosol glucoside (Hy-glu).

1.1.2. Tyrosol

De manière analogue à l'hydroxytyrosol, il est présent sous forme libre ou estérifiée ; i) avec l'acide élénolique formant le ligstroside, le ligstroside aglycone (Ty-EA) ou le décarboxyméthyl ligstroside aglycone (Ty-EDA), et ii) sous forme glucosidique comme le tyrosol glucoside (Ty-glu), également appelé salidroside (**Jerma Klen, 2014**).

1.2. Acides benzoïques

Cette classe comprend une large gamme d'acides phénoliques tels que les acides : gallique, vanillique, homovanillique, syringique, protocatéchique, la vanilline et autres (**Obied et al., 2007a**).

1.3. Acides cinnamiques

Ce sont des acides phénoliques caractérisés par des acides : cinnamique, *p*-coumarique, *o*-coumarique, caféique, ferulique, sinapique et autres, ou par leurs glucosides et leurs dérivés (**Obied et al., 2007a**).

Le verbascoside est un ester hétérosidique de l'acide caféique et de l'hydroxytyrosol et peut être trouvé dans plusieurs structures analogues. Il est également connu comme le plus puissant piègeur de radicaux ayant une activité 3 fois supérieure à celle de l'hydroxytyrosol (**Aldini et al., 2006 ; Savarese et al., 2007**) et présente donc des intérêts pharmacologiques considérables.

1.4. Flavonoïdes

Ce groupe est représenté par plusieurs sous-classes telles que les flavones (lutéoline, apigénine et leurs glucosides), flavonols (rutine, quercitine), anthocyanes (cyanidine-3-*o*-glucosides) et flavanones (**Harborne et al., 1998**).

1.5. Isochromans

Ce sont des dérivés de 3,4-dihydro-1H-benzo[*c*]pyrane généralement présents dans la nature dans le cadre de systèmes cycliques condensés complexes. Deux d'entre eux ont été

trouvés dans l'huile d'olive ; Le 1-phényl-6,7-dihydroxyisochromane et le 1-(3'-méthoxy-4'-hydroxy) phényl-6,7-dihydroxyisochromane (**Bianco *et al.*, 2001**).

1.6. Lignanes

Il existe trois classes structurelles de lignanes oxygénés, à savoir les lignanes simples, les lignanolides (pinorésinol) et les cyclolignanes (**Harborne *et al.*, 1998**).

1.7. Sécoiridoïdes

Ils sont exclusivement présents chez la famille des *Oleaceae*. Les sécoiridoïdes sont caractérisés par la présence de l'acide élénolique dans ses formes glucosidiques ou aglyconiques (**Bendini *et al.*, 2007**).

1.7.1. Oleuropéine

C'est généralement le composé phénolique prédominant des olives, où il peut atteindre jusqu'à 90 mg/g de fruits en poids sec. C'est un ester de l'acide élénolique glucosylé et de l'hydroxytyrosol (**Ryan *et al.*, 2002**).

1.7.2. Déméthyl-oleuropéine

C'est un dérivé de l'oleuropéine sans groupe méthyle présent dans le groupe carboxylique sur l'anneau pyranosique. Il provient de l'oleuropéine, par l'activité de l'estérase, au cours de la maturation des fruits (**Savarese *et al.*, 2007**).

1.7.3. Ligstroside

C'est un ester de l'acide élénolique glucosylé et du tyrosol.

D'autres représentants des sécoiridoïdes sont généralement les dérivés des glucosides secoiridoïdes formés lors de l'extraction de l'huile tels que l'Hy-EA, le Ty-EA, l'Hy-EDA, le Ty-EDA et autres (**Servili *et al.*, 2004**).

2. Fraction phénolique des olives

Les olives peuvent contenir jusqu'à 80 mg de polyphénols par échantillon de 100 g (**Visioli *et al.*, 2000**). Les secoiridoïdes (oleuropéine, déméthyl-oleuropéine, ligstroside, verbascoside) représentent les principaux CP des olives (Tab. 8). L'oleuropéine est le composé majoritaire responsable de l'amertume des olives (**Panizzi *et al.*, 1960**). Il a été montré que la teneur de ce dernier diminue à mesure que les olives mûrissent (**Shahidi et Naczki, 2003**).

3. Fraction phénolique de l'huile d'olive

Selon **Medina *et al.* (1999)**, la teneur totale en phénol dans l'huile extra vierge est de 86 mg d'équivalent acide gallique (EAG) pour 100 g d'huile, alors que l'huile d'olive raffinée ne

contient que 0,8 mg d'EAG pour 100 g d'huile. Les composés phénoliques identifiés dans l'huile d'olive sont rapportés dans le tableau 8.

Les sécoiridoïdes représentent la famille phénolique la plus abondante dans l'huile d'olive, englobant les aglycones de l'oleuropéine (Hy-EA) et du ligstroside (Ty-EA) ou leurs formes décarboxyméthylées ; Hy-EDA et Ty-EDA, respectivement (Shahidi et Naczk, 2003).

Au cours des processus de broyage et de malaxage, l'oleuropéine est hydrolysée par des β -glucosidases endogènes en Hy-EA, puis en Hy-EDA (Fig. 5). Les aglycones deviennent solubles dans la phase huileuse tandis que les glycosides restent dans les eaux de végétation (Cortesi *et al.*, 1995).

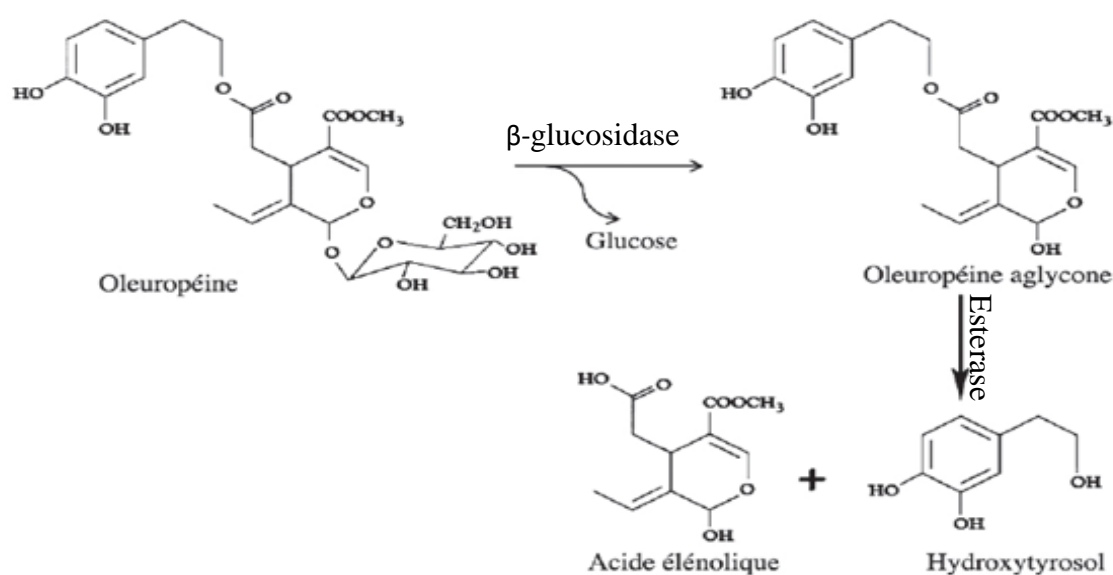


Figure 5 : L'hydrolyse de l'oleuropéine (Granados-Principal *et al.*, 2010 ; In Benlemlih et Ghanam, 2012).

La fermentation lactique des olives de table entraîne également une hydrolyse complète de la lutéoline 7-glucoside en lutéoline; ceci est catalysé par l'estérase de souches de *Lactobacillus plantarum* (Blekas *et al.*, 2002). Enfin, l'apigénine de l'huile d'olive est issue des glucosides de l'apigénine présents dans les olives (Brenes *et al.*, 1999).

Il faut noter que lors de la trituration, seulement 2% du contenu total des CP du fruit passe dans la phase huileuse (huile d'olive), le reste se trouve surtout dans la phase liquide (marges) et dans la phase solide (grignons). Cela est dû aux propriétés amphiphiles, mais essentiellement hydrophiles (solubilité plus élevée dans l'eau que dans l'huile), des composés phénoliques (Rodis *et al.*, 2002; Sifoun, 2008; Tafesh *et al.*, 2011).

Tableau 8 : Les principaux composés phénoliques identifiés dans les différentes matrices de l'olivier (olives, grignons, margines, huile d'olive) et leurs poids moléculaire (Da) (**Jerma Klen, 2014**).

Classe / Composé phénolique	PM	Olives	Grignons	Margines	Huile d'olive
Alcools phénoliques					
Hyroxytyrosol diglucoside	476	-	-	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	-
Hydroxytyrosol glucoside	316	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Cardoso <i>et al.</i> , 2005	Artajo <i>et al.</i> , 2006	Bianco <i>et al.</i> , 1998
Tyrosol glucoside	300	Romero <i>et al.</i> , 2002a	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	-	-
Hydroxytyrosol	154	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	Dierkes <i>et al.</i> , 2012
Hydroxytyrosol acétate	196	Morelló <i>et al.</i> , 2004	-	Artajo <i>et al.</i> , 2006	Brenes <i>et al.</i> , 1999
Tyrosol acétate	180	-	-	-	Mateos <i>et al.</i> , 2001
Tyrosol	138	Romero <i>et al.</i> , 2002a	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	Suárez <i>et al.</i> , 2008
Catéchol	110	Romero <i>et al.</i> , 2002a	-	-	Brenes <i>et al.</i> , 2004
Acides benzoïques					
Acide Syringique	198	Ryan <i>et al.</i> , 1999	Alu'datt <i>et al.</i> , 2010	-	Cioffi <i>et al.</i> , 2010
Acide Quinique	192	-	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	-
Acide Homovanillique	182	Ryan <i>et al.</i> , 2002	-	Artajo <i>et al.</i> , 2006	-
Acide Gallique	170	Mcdonald <i>et al.</i> , 2001	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	-	Cioffi <i>et al.</i> , 2010
Acide Vanillique	168	Romero <i>et al.</i> , 2002a	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	De Marco <i>et al.</i> , 2007	De LaTorreCarbot <i>et al.</i> , 2005
Acide Proto-catéchique	154	Boskou, 2006	Alu'datt <i>et al.</i> , 2010	-	-
Vanilline	152	Morelló <i>et al.</i> , 2004	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	De LaTorreCarbot <i>et al.</i> , 2005
Acide <i>p</i> -Hydroxybenzoïque	138	Boskou <i>et al.</i> , 2006	Alu'datt <i>et al.</i> , 2010	-	Caponio <i>et al.</i> , 1999

Acides cinnamiques					
β-OH-verbascoside	640	Kanakis <i>et al.</i> , 2012	Innocenti <i>et al.</i> , 2006	-	-
Acide Sinapique	224	Ryan <i>et al.</i> , 1999	Alu'datt <i>et al.</i> , 2010	-	-
Acide Férulique	194	Boskou <i>et al.</i> , 2006	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	-	Cioffi <i>et al.</i> , 2010
Acide Caféique	180	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Obied <i>et al.</i> , 2007a	Mulinacci <i>et al.</i> , 2001	Mateos <i>et al.</i> , 2001
Acide <i>p</i> -Coumarique	164	Ryan <i>et al.</i> , 2002	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	Suárez <i>et al.</i> , 2010	De LaTorre-Carbot,2005
Acide Cinnamique	148	Boskou <i>et al.</i> , 2006	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	-	Mateos <i>et al.</i> , 2001
Flavonoïdes					
Hésperidine	610	Kalua <i>et al.</i> , 2006	Alu'datt <i>et al.</i> , 2010	-	-
Rutine	610	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Cardoso <i>et al.</i> , 2005	Mulinacci <i>et al.</i> , 2001	-
Cyanidine-3- <i>O</i> -rutinoside	595	Romero <i>et al.</i> , 2002	-	-	-
Lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside	448	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Cardoso <i>et al.</i> , 2005	Mulinacci <i>et al.</i> , 2001	Yorulmaz <i>et al.</i> , 2011
Apigénine-7- <i>O</i> -glucoside	432	Obied <i>et al.</i> , 2007a	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	Suárez <i>et al.</i> , 2010	-
Quercétine	302	Rigane <i>et al.</i> , 2011	Alu'datt <i>et al.</i> , 2010	-	-
Cyanidine	287	Ryan <i>et al.</i> , 1999	-	-	-
Lutéoline	286	Ryan <i>et al.</i> , 2002	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> ,2011	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	Fu <i>et al.</i> , 2009
Apigénine	270	Bouaziz <i>et al.</i> , 2005	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> ,2011	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	Fu <i>et al.</i> , 2009
Lignanes					
Syringaresinol	418	-	-	-	García-Villalba <i>et al.</i> , 2010
Acétoxypinorésinol	416	López <i>et al.</i> , 2008	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> ,2011	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Fu <i>et al.</i> , 2009
Pinorésinol	358	Bonoli <i>et al.</i> , 2004	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Fu <i>et al.</i> , 2009

Hydroxy-isochromans					
1-(3'-Methoxy-4'-hydroxy)-phenyl -6,7-dihydroxyisochroman	288	-	-	-	Bianco <i>et al.</i> , 2001
1-Phenyl-6,7-dihydroxyisochroman	242	-	-	-	Bianco <i>et al.</i> , 2001
Secoiridoïdes					
Oleuropéine diglucoside	702	Bouaziz <i>et al.</i> , 2010	Cardoso <i>et al.</i> , 2005	-	-
Caffeoyl-6'-secologanoside	552	Obied <i>et al.</i> , 2007a	Obied <i>et al.</i> , 2007a	Obied <i>et al.</i> , 2007a	-
Oleuropéine	540	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Cardoso <i>et al.</i> , 2005	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Bianco <i>et al.</i> , 1998
Oleuroside	540	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Obied <i>et al.</i> , 2007a	-	-
Comsélogoside	536	Obied <i>et al.</i> , 2007a	Obied <i>et al.</i> , 2007a	-	-
Deméthyloléuropéine	526	Savarese <i>et al.</i> , 2007	-	-	Bianco <i>et al.</i> , 1998
Ligstroside	524	Savarese <i>et al.</i> , 2007	-	De Marco <i>et al.</i> , 2007	-
Deméthylligstroside	510	Sivakumar <i>et al.</i> , 2005	-	-	-
Acide élénolique glucoside	404	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Cardoso <i>et al.</i> , 2005	-	-
Hy-EA	378	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Cardoso <i>et al.</i> , 2005	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Fu <i>et al.</i> , 2009b
Ty-EA	362	-	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Suárez <i>et al.</i> , 2008
Ligstroside dérivé	336	-	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Suárez <i>et al.</i> , 2008
Hy-EDA	320	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Dierkes <i>et al.</i> , 2012
Ty-EDA	304	Obied <i>et al.</i> , 2007a	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	Suárez <i>et al.</i> , 2010	Dierkes <i>et al.</i> , 2012
Acide élénolique	242	Savarese <i>et al.</i> , 2007	Peralbo-Molina <i>et al.</i> , 2012	Mulinacci <i>et al.</i> , 2001	Dierkes <i>et al.</i> , 2012
Forme hydroxylée de l'acide élénolique	258	-	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	-	García-Villalba <i>et al.</i> , 2010
Forme dialdéhyde du décarboxy-méthyl élénolate (EDA)	184	-	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	Lozano-Sanchez <i>et al.</i> , 2011	-

(-) : Absence

4. Fraction phénolique des grignons d'olives

Les grignons d'olives sont considérés comme une source riche en composés phénoliques qui offre un large éventail d'activités biologiques. Il a été montré que la composition phénolique des grignons issus d'un système de trituration triphasique est similaire à celle des olives, bien que les quantités des secoiridoïdes peuvent diminuer lors du malaxage des olives (Servili *et al.*, 1999a). Les composés majeurs identifiés sont l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'oleuropéine, l'acide caféique, l'acide benzoïque et la rutine (Tab. 8) (Obied *et al.*, 2007a; Morsi *et al.*, 2016).

5. Fraction phénoliques des margines

La teneur en phénols totaux (PT) est très appréciable dans les effluents oléicoles. Elle est de l'ordre de 5,5 à 12 g par litre de margines. La fraction phénolique des margines se caractérise par une grande complexité. Cette dernière a été étudiée dans de nombreux travaux, et plus de 30 phénols différents ont été déjà identifiés (Servili *et al.*, 1999b; Della *et al.*, 2004; Obied *et al.*, 2005b).

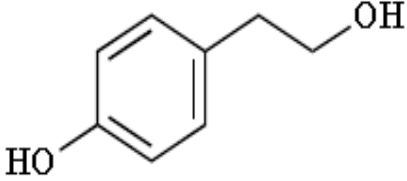
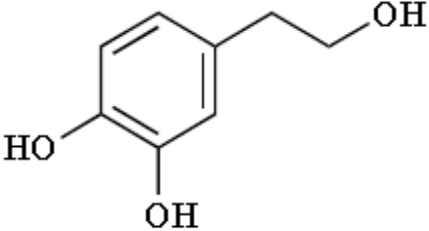
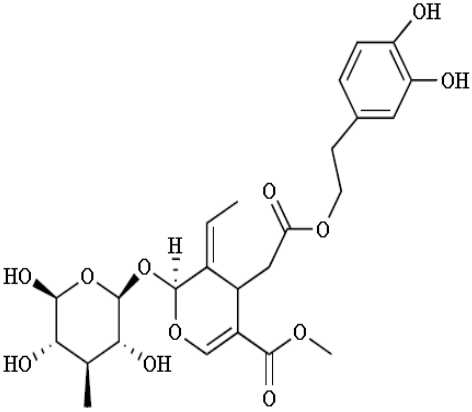
Le profil phénolique des margines est différent de celui du fruit (Tab. 8). Alors que les olives sont très riches en secoiridoïdes glucosés, les margines présentent une forte concentration en dérivés secoiridoïdes tels que l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'Hy-EDA (Tab. 9). Les margines sont également très riches en acides phénoliques, ce qui explique leur caractère acide (De Marco *et al.*, 2007).

La variété, le système de d'extraction (type de broyage, temps et température du malaxage), l'addition de l'eau chaude et le chlorure de sodium (NaCl) lors de la trituration des olives, représentent les principaux facteurs qui affectent le rendement phénolique de l'huile d'olive et des margines (Servili *et al.*, 1999a ; Gómez-Rico *et al.*, 2008 ; Pérez *et al.*, 2008 ; Inarejos-García *et al.*, 2009 ; Clodoveo, 2012).

III. Propriétés biologiques des polyphénols de l'olivier

L'olivier est considéré comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques, tels que les composés phénoliques. Ces derniers sont doués d'activités biologiques extrêmement importantes (Djenane *et al.*, 2012). Le nombre des travaux, qui s'intéressent à ces composés, a augmenté de façon exponentielle au cours de ces dernières années (Fig. 6) (Vierhuis, 2001 ; Garcia *et al.*, 2010).

Tableau 9 : Les principaux biophénols présents dans les margines (Takaç *et al.*, 2009).

Biophénols	Structure chimique	Propriétés
Tyrosol		<p>Nomenclature de l'UICPA : 4-(2-Hydroxyethyl)phenol</p> <p>Synonymes : 4-(2-Hydroxyethyl)phenol <i>p</i>-Hydroxyphenethyl alcohol 4-Hydroxyphenylethanol</p> <p>Formule brute : C₈H₁₀O₂</p> <p>Poids moléculaire : 138.164 Da</p> <p>Numéro CAS : 501-94-0</p>
Hydroxytyrosol		<p>Nomenclature de l'UICPA : 4-(2-Hydroxyethyl)-1,2-benzenediol</p> <p>Synonymes : 3-Hydroxytyrosol, 3,4-dihydroxyphenylethanol</p> <p>Formule brute : C₈H₁₀O₃</p> <p>Poids moléculaire : 154.16 Da</p> <p>Numéro CAS : 10597-60-1</p>
Oleuropéine		<p>Nomenclature de l'UICPA : 4<i>S</i>,5<i>E</i>,6<i>S</i>)-4-[2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-2-oxoethyl]-5-ethylidene-6-[[[(2<i>S</i>,3<i>R</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-tetrahydropyranyl]oxy]-4Hpyran-3-carboxylic acid, methyl ester</p> <p>Formule brute : C₂₅H₃₂O₁₃</p> <p>Poids moléculaire : 540.514 Da</p> <p>Numéro CAS : 32619-42-4</p>

UICPA : l'Union internationale de chimie pure et appliquée
CAS : Chemical Abstracts Service

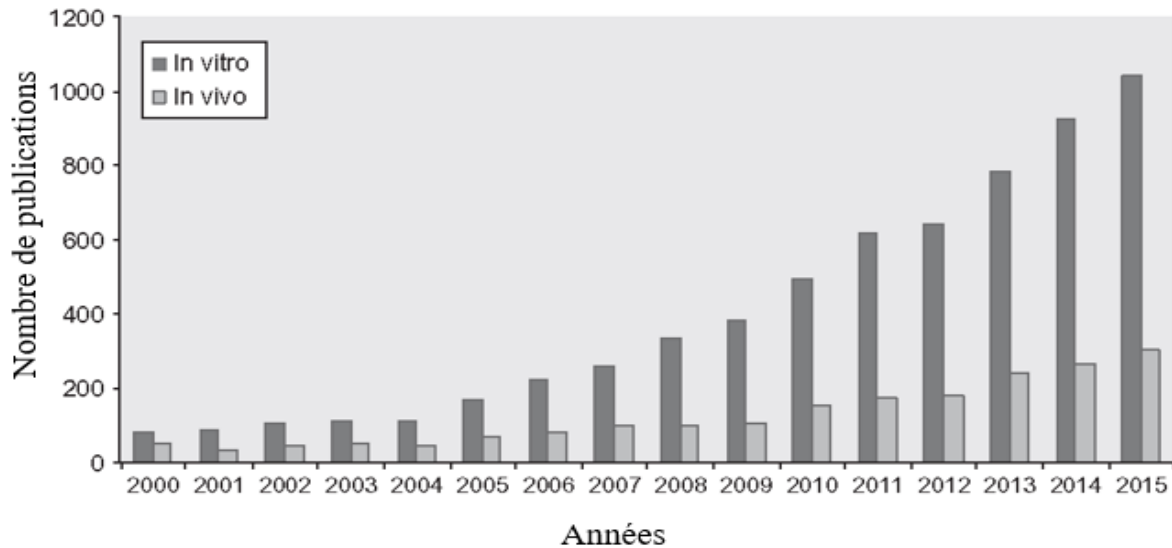


Figure 6 : Nombre d'études évaluant les potentialités bioactives *in-vitro* et *in-vivo* des composés phénoliques, publiés entre 2000 et 2015 (Ferreira *et al.*, 2017).

Les polyphénols de l'olivier sont pourvus d'un grand effet antioxydant supérieur à celui du vin rouge, du thé vert, et de la vitamine C (Benlemlih et Ghanam, 2012). Cette propriété antioxydante est associée à leur capacité à former des liaisons hydrogène intramoléculaires entre le groupe hydroxyle et les radicaux phénoxylique (Visioli et Galli, 1998).

Beauchamp et ses collaborateurs (2005), affirment que l'oléocanthal (Ty-EDA), un composé qui a la même activité pharmacologique que l'ibuprofène, médicament anti-inflammatoire, se trouve uniquement dans l'huile d'olive extra vierge fraîchement pressée et sa présence est liée à la sensation de picotement dans la gorge.

Il a été également prouvé que l'hydroxytyrosol améliore la fonction mitochondriale et pourrait donc prévenir le vieillissement cellulaire (Raederstorff *et al.*, 2010).

Lee-Huang et ses collègues (2003) ont rapporté que l'extrait de feuilles d'olivier est efficace contre le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). L'efficacité de cet extrait est due à la présence de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol. Ces deux composés sont actifs au niveau de plusieurs étapes du cycle de vie du VIH-1. Ils inhibent sa transmission d'une cellule à l'autre et ralentissent considérablement sa multiplication virale.

Les CP de l'olivier permettent également de prévenir et de traiter les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète et les maladies neurodégénératives (Visioli *et al.*, 1995; Fabiani *et al.*, 2002; Hamden *et al.*, 2008). Ce sont aussi des excellents antimicrobiens et jouent un rôle important dans le renforcement du système immunitaire et la protection de certains tissus et organes contre les dommages oxydatifs : cerveau, foie, globules sanguins, muscles et artères (Benlemlih et Ghanam, 2012).

1. Effet antimicrobien des polyphénols de l'olivier

Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques sont de bon inhibiteurs des microorganismes pathogènes (Takahashi *et al.*, 2004 ; Yadava et Tiwari, 2005). Le mécanisme de l'effet antimicrobien des CP est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on cite : l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques (Hilliard, 1995) ; l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique (Tsuchiya et Iinuma, 2000) ; l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Haraguchi *et al.*, 1998) et l'inhibition des enzymes hydrolytiques (Cowan, 1999).

Les composés phénoliques de l'olivier, ses produits et ses sous-produits ont la capacité d'arrêter ou de retarder la prolifération de diverses bactéries (Bisignano *et al.*, 1999; Rupasinhe *et al.*, 2006) et champignons (Tab. 10). (Pereira *et al.*, 2007; Brenes *et al.*, 2011 ; Gaouar *et al.*, 2014)

L'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et la vanilline ont été initialement identifiés comme principaux composés phénoliques inhibiteurs des microorganismes (Bisignano *et al.*, 1999 ; Rupasinhe *et al.*, 2006) . Medina et ses collègues (2006) ont ensuite prouvé que les produits de l'hydrolyse de l'oleuropéine, tels que l'Hy-EDA et le Ty-EDA, ont été plus inhibiteurs que leurs précurseurs. Ces résultats ont été confirmés en testant chaque composé phénolique isolé par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), contre *Listeria monocytogenes*.

Il a été également montré que ces composés étaient aussi actifs que deux biocides synthétiques, le glutaraldéhyde (GTA) et l'orthophtalaldéhyde (OPA), vis-à-vis d'une large gamme de bactéries à Gram positif et négatif (Medina *et al.*, 2009). La GTA et l'OPA interagissent fortement avec les acides aminés, les protéines et les molécules membranaires, favorisant la perméabilisation de la membrane et la lyse cellulaire (Simoes *et al.*, 2006).

2. Effet antimicrobien des margines

Les margines contiennent plusieurs composés phénoliques qui ont des propriétés phytotoxiques et antimicrobiennes (Tab. 11) (Ramos-Cormenzana, 1996 ; Niaounakis et Halvadakis, 2004). L'effet inhibiteur des CP des margines a été montré contre la sporulation des bactéries telluriques ainsi que la croissance des bactéries Gram positives et Gram négatives (Pérez *et al.*, 1992 ; Capasso *et al.*, 1995 ; Larif *et al.*, 2015 ; Leouifoudi *et al.*, 2015 ; Roila *et al.*, 2016).

Tableau 10 : L'effet antimicrobien des extraits phénoliques des produits et sous-produits de l'olivier (feuilles, olives, huile d'olive, saumure d'olives et grignons d'olives).

	Microorganisme	Référence
Feuilles	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Erdohan et Turhan, 2011)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Djenane <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	(Pereira <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella enteritidis</i>	(Korukluoğlu <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Medjkouh <i>et al.</i> , 2016)
Olives	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	(Bisignano <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Yersinia</i> <i>sp.</i> <i>Shigella sonnei</i>	(Medina <i>et al.</i> , 2006)
Saumures d'olives	<i>Helicobacter pylori</i>	(Romero <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Erwinia</i> <i>Clavibacter</i> <i>Agrobacterium</i> <i>Pseudomonas</i>	(Brenes <i>et al.</i> , 2011)
Grignons d'olives	<i>Alternaria solani</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium culmorum</i>	(Winkelhausen <i>et al.</i> , 2005)

Elles agissent sur les bactéries en dénaturant leurs protéines cellulaires et en altérant leurs membranes cytoplasmiques (**Ranalli, 1991**). Nombreuses études ont également révélées l'action des polyphénols des effluents oléicoles sur la croissance des champignons (**Özdemir, 2009 ; Vagelas et al., 2009 ; Senani-Oularbi et al., 2011**) et des algues (**DellaGreca et al., 2001**).

En plus du coût élevé des opérations d'extraction, la récupération des polyphénols des margines reste une tâche analytique difficile pour plusieurs raisons. Les phénols sont des espèces chimiques réactives, vulnérables à l'oxydation, à la conjugaison, à l'hydrolyse, à la polymérisation, ceci est aggravé par le contact direct de ces polyphénols avec les enzymes et les substrats (protéines, lipides, polysaccharides) qui se trouvent en grande quantités dans les margines (**Obeid et al., 2005b**).

L'analyse immédiate des margines fraîches est donc toujours la situation idéale, en raison des modifications possibles dans leur composition chimique lors de la manipulation de l'échantillon (**Bianco, 2003**). Plusieurs auteurs ont recommandé l'utilisation des margines brutes, filtrées et stérilisés comme agents antibactériens et antifongiques. Ces eaux de végétations ont présentés des résultats similaires à leurs extraits phénoliques (**Capasso et al., 1995 ; Visioli et Galli, 1998 ; Vagelas et al., 2009 ; Esmail et al., 2015**).

Tableau 11 : Activité antimicrobienne des margines brutes et leurs extraits phénoliques.

Microorganisme	Espèce	Référence
Algues	<i>Ankistrodesmus braunii</i>	(DellaGreca et al., 2001)
Champignons	<i>Fusarium solani</i>	(Yangui et al., 2008)
	<i>Botrytis cinerea</i>	(Vagelas et al., 2009)
	<i>Aspergillus flavus</i>	(Senani-Oularbi et al., 2018)
Bactéries	<i>Clavibacter michiganensis</i>	(Özdemir, 2009)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Capasso et al., 1995 ; Özdemir, 2009)
	<i>Corynebacterium michiganense</i>	(Capasso et al., 1995)
	<i>Bacillus subtilis</i>	(Obied et al., 2007b)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Roila et al., 2016).
	<i>Proteus sp.</i>	(Obied et al., 2007b ; Tafesh et al., 2011 ;
	<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Esmail <i>et al.</i>, 2015 ; Larif <i>et al.</i>, 2015 ; Leouifoudi <i>et al.</i>, 2015)
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	(Tafesh <i>et al.</i>, 2011)
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	(Krid <i>et al.</i>, 2011)

Il faut signaler que les polyphénols de l'olivier ne sont pas disponibles commercialement en grande quantité. Plusieurs méthodes ont été proposées pour leur synthèse chimique (Tuck, Tan et Hayball, 2002) ou enzymatique (Espin *et al.*, 2001), mais les protocoles sont généralement lents et coûteux. La récupération des polyphénols des effluents oléicoles offre donc une double opportunité d'obtenir des biomolécules à haute valeur, et de réduire la toxicité environnementale de margines.

IV. Méthodes d'analyse des composés phénoliques

Plusieurs méthodes analytiques ont été proposées pour l'analyse des composés phénoliques des produits et des sous-produits de l'olivier. Nous expliquant brièvement dans cette partie les techniques de caractérisation des composés phénoliques, utilisées dans notre étude.

La préparation des échantillons est une étape d'une importance capitale préalable à tout type d'analyse fiable. Les procédures de préparation des échantillons d'analyse des polyphénols peuvent considérablement varier de la simple filtration ou ultrafiltration, dans le cas des différents échantillons liquides, jusqu'aux celles les plus compliquées, telle que l'extraction et la purification.

1. Méthodes d'extraction des polyphénols

La solubilité des polyphénols dépend du type de solvant (polarité) utilisé, le degré de polymérisation des composés phénoliques, l'interaction des composés phénoliques avec d'autres molécules et la formation de complexes insolubles. Les solvants les fréquemment utilisés pour l'extraction des CP sont, le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate d'éthyle, le propanol, le diméthylformamide et leurs combinaisons (Antolovich *et al.*, 2000 ; In Shahidi et Nacz, 2003).

Les méthodes appliquées pour les produits et les sous-produits de l'olivier impliquent une extraction solide-liquide, pour les grignons d'olives, ou liquide-liquide, pour huile d'olive

et les margines, en utilisant différents solvant organiques et des méthodes conventionnelles d'agitation manuelle ou mécanique.

L'utilisation d'acétate d'éthyle est fréquemment signalée lors de l'extraction des polyphénols de matrices aqueuses telles que les margines (**Capasso et al., 1992; Lesage-Meessen et al., 2001**). L'acétate d'éthyle est sélectif pour les phénols de poids moléculaire faible et moyen (**Visioli et al., 1999**). Ce même solvant a donné des extraits pauvres en polyphénols quand il est appliqué sur les grignons humides issus d'un système de trituration continu à deux phases (**Obeid et al., 2005**).

L'agitation mécanique à l'aide d'homogénéisateurs ultrasoniques s'est montrée très efficace pour la récupération des CP. Elle permet une extraction rapide avec une moindre consommation de solvants. Le nombre d'extractions répétées jusqu'à l'épuisement du substrat, améliore également le rendement d'extraction en polyphénols totaux (**Obeid et al., 2005**).

Fernandez-Bolanos et ses collègues (**2002**) ont suggéré qu'une réaction de condensation entre les constituants phénoliques et non phénoliques ainsi que leur oxydation seraient les principales causes de la réduction de la récupération des biophénols des effluents oléicoles. Ainsi, une surgélation ou une lyophilisation des margines sont nécessaires afin d'assurer une bonne conservation de ces dernières avant leur manipulation (**Obeid et al., 2005**).

Shahidi et Naczk (1991) ont recommandé l'acidification de l'échantillon à analyser à un pH inférieur ou égal à 3, avec le chlorure d'hydrogène (HCl), pour augmenter sa teneur en PT. Ce traitement bloquera toutes les activités enzymatiques susceptibles de modifier sa fraction phénolique (**Ceccon et al., 2001; Mulinacci et al., 2001**).

2. Méthodes de séparation, dosage et identification des polyphénols

Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des CP ont fait des progrès spectaculaires au cours de ces dernières années, grâce à l'utilisation de la chromatographie liquide et son couplage avec les techniques physico-chimiques modernes (**Jackman et al., 1987 ; Karchesy et al., 1989; Merken et Beecher, 2000**). L'une des difficultés actuelles empêchant des analyses rapides et reproductibles des composés phénoliques est la rareté des étalons appropriés et purs, en particulier les sécoiridoïdes et les lignanes (**Abu Reidah, 2013**).

2.1. Chromatographie liquide à haute performance

L'HPLC est, de très loin, la technique la plus performante et la plus utilisée pour la séparation et le dosage des composés phénoliques. Elle ne demande qu'une faible quantité de l'échantillon et permet de combiner en une seule opération rapide et reproductible les analyses qualitatives et quantitatives d'un extrait phénolique complexe (**Pietta et al., 2003; Sakakibara**

et al., 2003). L'équipement de l'HPLC consiste en une série de blocs, qui sont communs à tous les modèles, composé d'une pompe, un injecteur, une colonne chromatographique, un four thermostatique contrôlé, un détecteur et un système d'acquisition de données.

Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées, du solvant d'élution et des composés phénoliques concernés, en particulier leur degré d'hydroxylation, de glycosylation et de méthylation. A partir de ces principes généraux, deux approches analytiques sont possibles (**Macheix *et al.*, 2005**).

- La chromatographie en « phase normale » destinée aux composés phénoliques non polaires. Dans cette technique la phase stationnaire est hautement polaire (ex. silice), et la phase mobile est relativement non-polaire (ex. hexane). Ce mode de chromatographie peut être utile pour la séparation des flavonoïdes aglycones non-polaires ou peu polaires.
- La chromatographie en « phase inverse » destinée aux composés phénoliques polaires (acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques). Le principe est de fixer ces composés sur une phase dite inversée (par exemple de la silice sur laquelle on a préalablement greffé des chaînes aliphatiques apolaires) suivie de leur élution par un mélange de solvants (fréquemment eau/acide acétique/acétonitrile ou eau/méthanol) dont on fait varier la composition et donc la polarité avec le temps de l'analyse (**Lought *et al.*, 1995 ; Meyer, 2010**).

Différents types de détecteurs peuvent être couplé à l'HPLC. Le choix du détecteur idéal pour chaque application dépend de la nature et des propriétés des analytes à déterminer et des informations recherchées (structure, quantité, ...). Deux systèmes de détection sont largement utilisés, pour la détection des composés phénoliques : la spectroscopie ultraviolet-visible et la spectrométrie de masse, ajoutant la résonance magnétique nucléaire qui est très utiles pour l'identification des composés dont les étalons ne sont pas disponibles (**Pietta *et al.*, 2003 ; Sakakibara *et al.*, 2003 ; Swinny et Markham, 2003**).

2.1.1. Détecteur spectroscopique ultraviolet-visible

Les composés élués sont généralement repérés en sortie de la colonne chromatographique par leur absorption en lumière visible pour les anthocyanes (vers 520 nm) et en ultraviolet (280, 325 ou 360 nm) pour tous les autres phénols ; ils apparaissent alors sous forme de pics sur les chromatogrammes. La surface de chacun des pics est proportionnelle à la concentration du composé, qui est alors dosé à la longueur d'onde choisie pour l'analyse par

référence à des composés témoins obtenus commercialement ou à partir d'analyses antérieures (**Macheix *et al.*, 2005 ; Merken et Beecher, 2010**).

Grace aux progrès de l'informatique et de la microélectronique, les détecteurs dits à barrette de diode permettent d'obtenir simultanément des réponses pour toutes les longueurs d'onde du spectre, ce qui conduit à une première étape de caractérisation de chacun des composés séparés, en comparant leurs spectres d'absorption avec celui de témoins (**Phillips et Corradini, 2010**).

2.1.2. Détecteur à spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est un système de détection communément utilisé pour l'élucidation ou la confirmation de la structure des composés organiques, bioorganiques et organométalliques. Elle est utilisée dans plusieurs domaines scientifiques : environnement, pharmacie, sciences alimentaires, ...

Le spectromètre de masse se compose généralement, de trois principales parties : la source d'ionisation, l'analyseur de masse et le détecteur. La première étape des mesures de la spectrométrie de masse est la conversion des molécules neutres à des espèces chargées (ions), qui seront ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/nombre de charge (m/z) dans un analyseur de masse. Les abondances relatives des valeurs individuelles m/z sont enregistrées par un détecteur approprié pour produire ce qu'on appelle un spectre de masse (**Ekman *et al.*, 2008 ; Steehler, 2009 ; In Abu Reidh, 2013**).



Matériel
et
Méthodes

I. Contexte et rappel des objectifs

La famille des polyphénols devient le point de départ de toutes les recherches scientifiques, en particulier, celles dédiées à la découverte de molécules naturelles à très fortes activités biologiques. Dans le contexte de recherche des antimicrobiens naturels, cette étude s'intéresse à évaluer l'activité antibactérienne des polyphénols des produits et sous-produits de l'olivier. Dans cette partie expérimentale, deux grands axes sont envisagés : i) le premier concerne la caractérisation des profils phénoliques de l'huile d'olive, des grignons d'olives et des margines issues de la trituration de trois variétés Algériennes (*Blanquette*, *Rougette* et *Sigoise*) par chromatographie en phase liquide ; ii) le second axe a pour objectif l'évaluation du pouvoir antibactérien de l'huile d'olive et des margines (brutes, ultrafiltrées, et de leur extrait d'acétate d'éthyle) vis-à-vis de quatre souches bactériennes de référence ; iii) enfin la détermination et la purification des composés phénoliques majoritaires et leurs dérivés présents dans les extraits et l'estimation de leur activité antibactérienne.

La partie expérimentale est réalisée au niveau des laboratoires du département de biotechnologie alimentaire, Institut de la Grasa (Séville, Espagne) et au campus des laboratoires pédagogiques de l'Université Abbès Laghrour, Khenchela.

1. Echantillonnage

L'étude a porté sur 18 échantillons de l'huile d'olive, 18 échantillons de grignons et 18 échantillons de margines, collectés durant la campagne oléicoles 2016-2017 (Novembre-Décembre) à partir de la région de Guelma (Fig. 7).

Les échantillons ont été prélevés à partir de six différentes unités d'extraction. Deux unités modernes ou à système de trituration continu à trois phases et quatre huileries traditionnelles ou à système de trituration discontinu (Tab. 12).

L'huiles d'olive, les grignons d'olives et les margines résultent de la trituration de trois variétés algériennes d'olives : la *Blanquette* et la *Rougette* (deux variétés typiques de la région de Guelma, Est-algérien) et *Sigoise* (originaire de la région de Sigue, Ouest du pays).

1.1. Huile d'olive

Des échantillons de 100 mL de l'huile d'olive ont été prélevés à la sortie finale de la dernière centrifugation dans des flacons en verre. Les échantillons sont filtrés à travers un papier de cellulose pour les purifier de toute matière solide, puis conserver à température ambiante jusqu'à l'analyse.

Tableau 12 : Caractéristiques des échantillons de l'huile d'olive, des grignons d'olives et des margines collectés.

Variété	Système de trituration utilisé	Code	Commune
<i>Rougette</i>	Presse	RP	Mdjev Sfa
			Roknia 2
			Roknia 2
	Continu	RC	Bouchegouf
			Bouchegouf
			Bouati Mahmoud
<i>Blanquette</i>	Presse	BP	Roknia 1
			Roknia 1
			Roknia 1
	Continu	BC	Bouati Mahmoud
			Bouati Mahmoud
			Bouati Mahmoud
<i>Sigoise</i>	Presse	SP	Guelma
			Guelma
			Guelma
	Continu	SC	Bouchegouf
			Bouchegouf
			Bouchegouf

1.2. Grignons d'olives

Des échantillons de 100 g de grignons d'olives sont collectés dans des récipients propres et secs, à partir des scourtins et après l'opération de presse, pour le cas des huileries traditionnelles et après la première centrifugation, responsable de la séparation des trois phases, pour les huileries modernes. Au laboratoire, les grignons d'olives ont subi une extraction immédiate en utilisant le diméthylsulfoxyde (DMSO) afin de minimiser le risque d'oxydation des composés phénoliques (**Medina et al., 2011**).

1.3. Margines

Des échantillons de 200 mL de margines ont été prélevés, dans des récipients hermétiques et ombrés, après la dernière centrifugation qui sépare l'huile des margines.

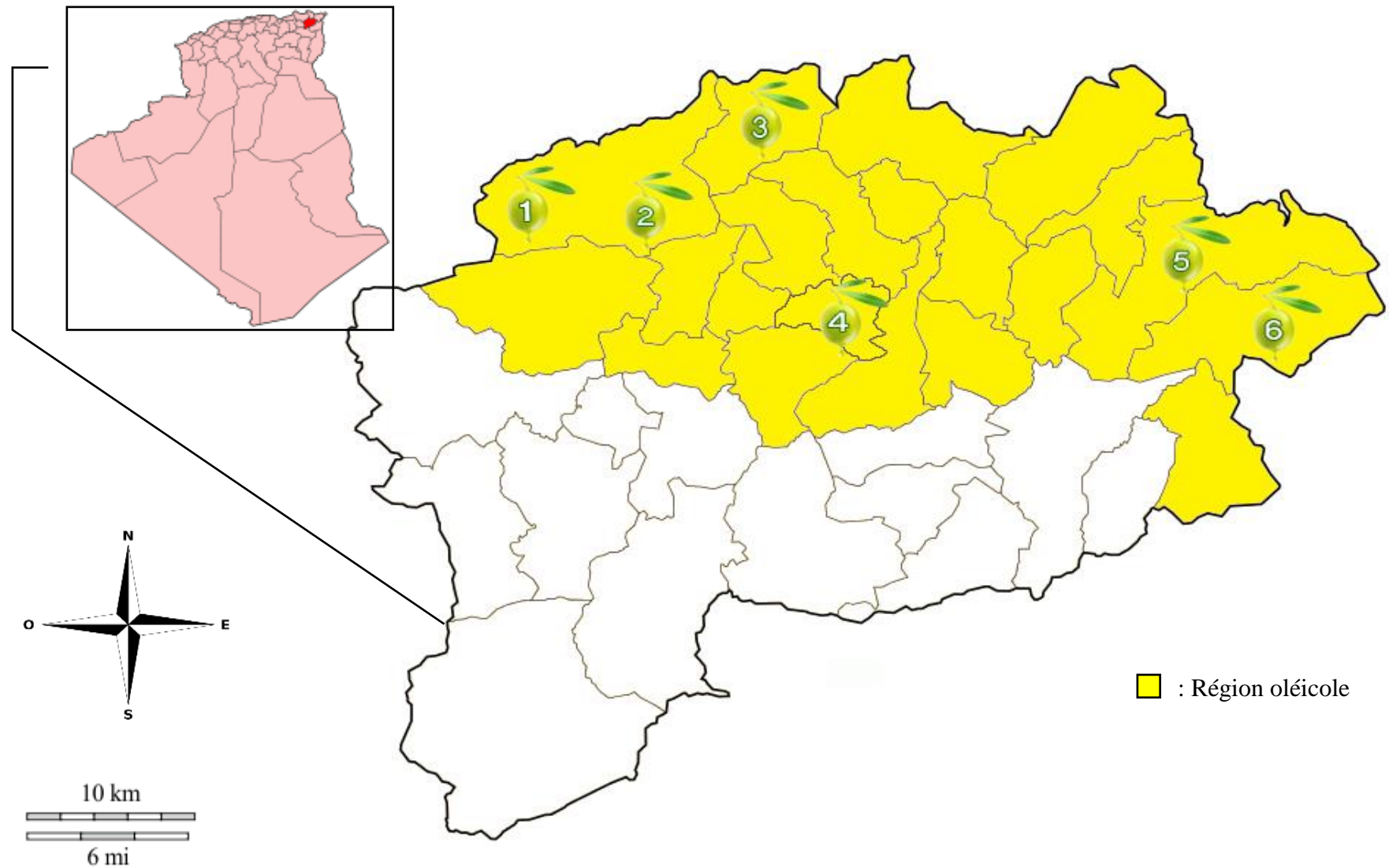


Figure 7 : Localisation des huileries d'échantillonnage dans la wilaya de Guelma.

[1] : Roknia 1 ; [2] : Roknia 2 ; [3] : Bouati Mahmoud ; [4] : Guelma ; [5] : Bouchegouf ; [6] : Medjez Sfa.

Une fois au laboratoire, les pH des margines sont déterminés à l'aide d'un pH-mètre de paillasse (HANNA) préalablement étalonné. L'électrode de mesure est plongée dans un bécher contenant un volume de 50 ml de margines analysées et on note le pH (**Rodier *et al.*, 2009**).

Les échantillons de margines sont ensuite filtrés à travers du papier Wattman (N° 3) et acidifiés à pH = 2 par de l'acide phosphorique (d = 1,57 ; pureté = 55%) et conservés à -30°C jusqu'à l'analyse.

II. Caractérisation phénolique des produits et sous-produits de l'olivier

Pour la caractérisation des profils phénoliques de l'huile d'olive, des grignons d'olives et des margines, les analyses sont effectués par HPLC en phase inverse.

1. Préparation des échantillons avant l'analyse

1.1. Huile d'olive

Un volume de 0,6 mL de l'huile d'olive sont ajoutés au même volume du N, N-diméthylformamide (DMF ; MM = 73,09 ; pureté \geq 99%). Le mélange est homogénéisé (vortex pendant 1 min) et centrifugé à 9000 g durant 5 minutes. Le culot est récupéré et ces opérations sont répétées trois fois afin d'extraire le maximum de composés phénoliques (**Medina *et al.*, 2006**). Après addition de 500 μ L de l'étalon interne (acide syringique, 2 mM dans le DMF) (Annexe 2) à chaque échantillon, les extraits sont lavés deux fois avec 2 mL d'hexane, puis passés sous une atmosphère de diazote (N₂) durant 15 minutes afin d'éliminer toute trace d'hexane (Photo. 1). Enfin, les extraits phénoliques sont filtrés à travers des filtres millipores ($\varnothing = 0,22\mu\text{m}$). 20 μ l de chaque échantillon sont injectés pour analyse par HPLC (**Brenes *et al.*, 2000 ; Medina *et al.*, 2006**) (Fig. 8).



Photographie 1 : Extraits phénoliques de l'huile d'olive sous une atmosphère de diazote.

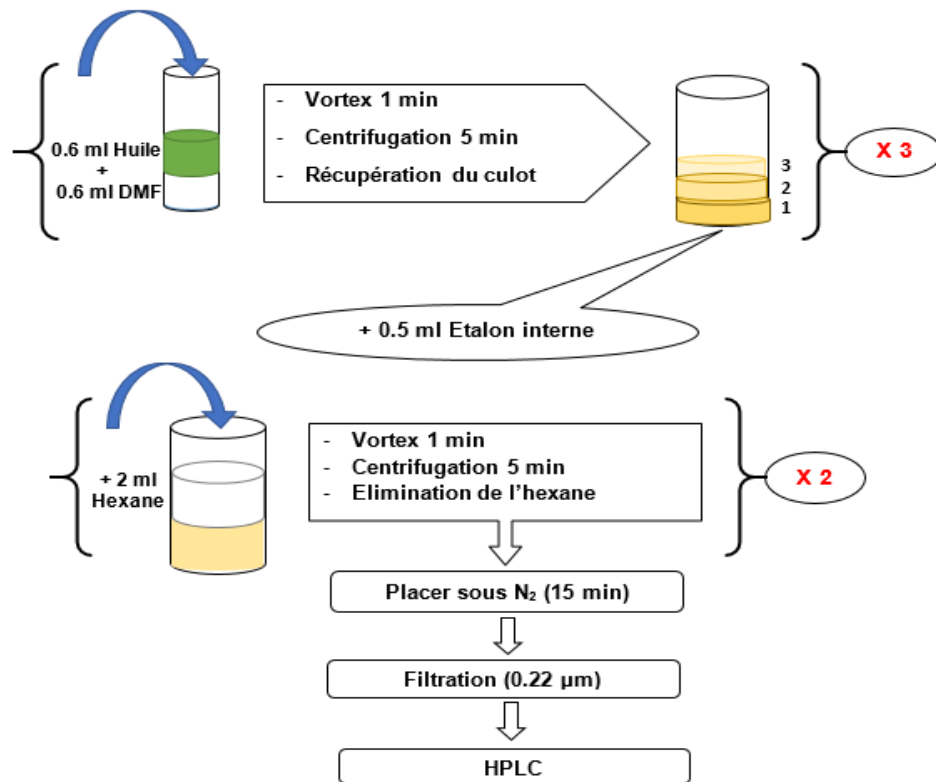
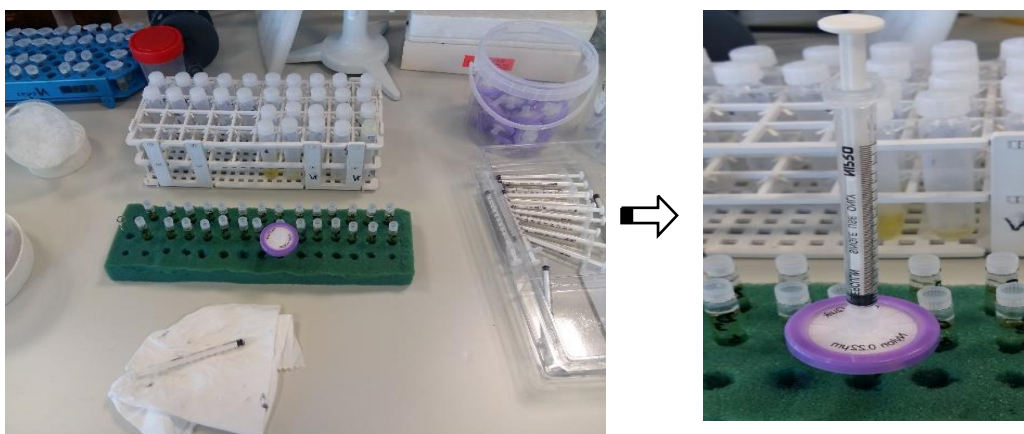


Figure 8 : Récupération des composés phénoliques de l'huile d'olive et préparation des extraits pour l'HPLC.

1.2. Grignons d'olives

10 g de grignons d'olives sont mélangés avec 30 mL de DMSO à l'aide d'un vortex durant 30 minutes (1 min agitation /5 min repos). Le mélange est ensuite centrifugé à 6000 g durant 5 min. Le surnageant est récupéré.

250 μL de l'extrait sont dilués dans 500 μL de DMSO puis additionnés de 250 μL de l'étalon interne (acide syringique, 2 mM dans le DMSO) (Annexe 2). Le mélange est homogénéisé et filtré à travers des filtre millipores ($\varnothing = 0,22\mu\text{m}$) (Photo. 2). De même que précédemment, 20 μL de chaque extrait sont injectés pour analyse par HPLC (Romero *et al.*, 2018) (Fig. 9).



Photographie 2 : Filtration des extraits à travers les filtres millipores ($\varnothing = 0,22\mu\text{m}$).

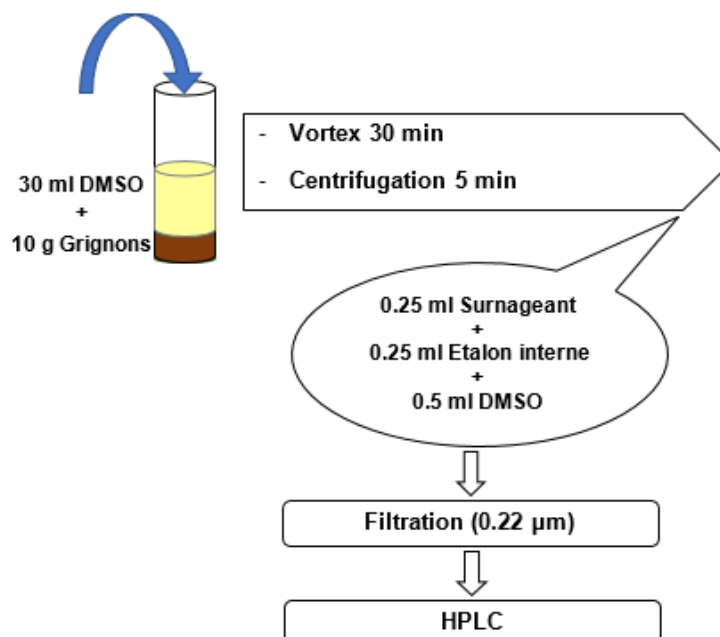


Figure 9 : Récupération des composés phénoliques des grignons d'olives et préparation des extraits pour l'HPLC.

1.3. Margines brutes

Les margines acidifiées (pH = 2) sont directement analysés sans extraction préalable. 5 mL de chaque échantillon est centrifugé à 9000 g durant 5 minutes. Ensuite, un mélange de 250µl du surnageant est dilué dans 500µl d'eau distillée, puis supplémenté de 250µl de l'étalon interne (acide syringique, 2 mM dans de l'eau distillée) (Annexe 2). L'ensemble est filtré comme il a été décrit précédemment et 20µl de chaque échantillon sont injectés pour analyse par HPLC (Fig. 10).

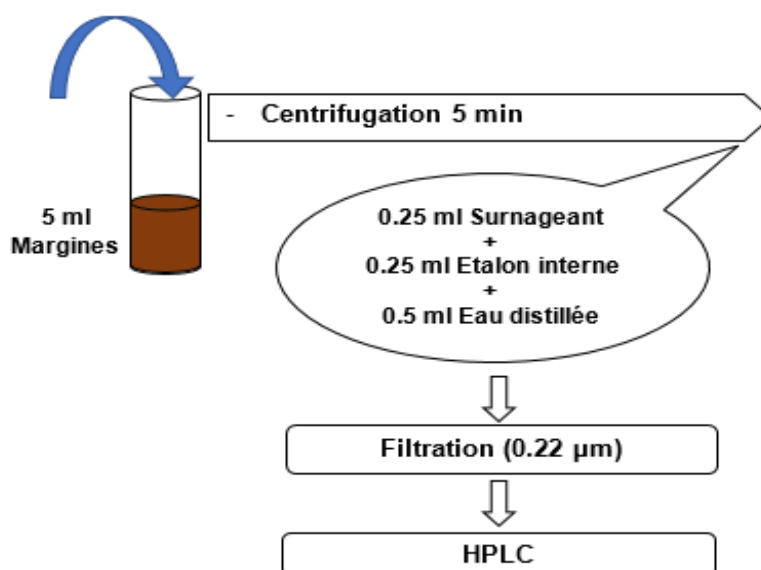


Figure 10 : Protocole de préparation des margines à l'HPLC.

2. Conditions expérimentales

Le système chromatographique est constitué d'un échantillonneur automatique (Waters 717 plus), une pompe (Waters 600 E), un thermostat de la colonne (Waters) et un détecteur UV à barrette de diodes (Waters 996) (Waters Inc. Mildford, MA). Un détecteur à fluorescence Jasco, modèle FP-920 (Jasco, Tokyo, Japon) a été également utilisé pour les échantillons de l'huile d'olive. Les deux détecteurs sont exploités avec le logiciel Empower 2.0 (Waters).

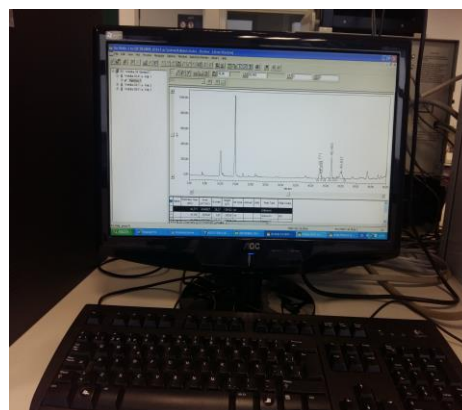
Une colonne de type Spherisorb ODS-2 (Waters), de granulométrie 5 μ m, de longueur 25 cm et de diamètre interne 4,6 mm a été utilisée pour toutes les expériences. Le débit d'élution est constant à 1 mL/min et la température à 35°C (Photo. 3).

L'élution des composés est réalisée selon le procédé décrit par **Ramírez et al. (2014)** en utilisant un gradient de solvant binaire : eau (pH = 2,5 ajusté avec 0.15% d'acide phosphorique) et méthanol. Le programme d'élution est présenté dans le tableau 13.

Tableau 13 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation par HPLC.

Temps (min)	Eau (%)	Méthanol (%)
00	90	10
10	70	30
30	60	40
45	50	50
50	40	60
55	30	70
60	00	100

Les composés phénoliques sont contrôlés à 240, 280 et 320 nm avec le détecteur à barrette de diodes et le détecteur de fluorescence pour les échantillons d'huile d'olive. L'évaluation de chaque composé est réalisée à l'aide d'une courbe de régression avec l'étalon correspondant.



Photographie 3 : Le système chromatographique utilisé.

2.1. Témoins utilisés

L'hydroxytyrosol (Hy), la lutéoline, la lutéoline-7-glucoside, la rutine et l'apigénine proviennent d'Extrasynthèse SA (Genay, France). L'hydroxytyrosol glycol (Hy-gly), le tyrosol (Ty), le 4-éthylphénol (4-EP), l'acide caféique, l'acide p-coumarique et l'acide vanillique sont procurés chez Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). L'hydroxytyrosol-1-O-glucoside (Hy-1-glu), le salidroside (Ty-glu), l'ester de l'acide caféique et le comsélogoside sont quantifiés à l'aide des facteurs de réponse de l'Hy, le Ty, l'acide caféique et l'acide p-coumarique, respectivement.

L'hydroxytyrosol-4-O-glucoside, le pinorésinol, le 1-acétoxypinorésinol, l'acide élénolique (EA), l'oleuropéine aglycone (Hy-EA), le ligstroside aglycone (Ty-EA), la forme dialdéhyde du décarboxyméthyl-élénotate (EDA) ou lié à l'hydroxytyrosol (Hy-EDA) ou le tyrosol (Ty-EDA) ont été obtenus par HPLC semi-préparative (Medina *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2008). Toutes les analyses ont été effectuées en double.

2.2. Analyse des données

La détermination des teneurs en polyphénols totaux, par techniques colorimétriques, n'a pas été mise en évidence. Le total des composés phénoliques dans les échantillons de l'huile d'olive est la somme de l'Hy, l'Hy-glycol, le Ty, le 4-éthylphénol, le pinorésinol, le 1-acétoxypinorésinol, l'apigénine, la vanilline, la lutéoline, l'acide p-coumarique, l'EDA, l'Hy-EDA, le Ty-EDA, l'EA, le Hy-EA et le Ty-EA.

Le total des composés phénoliques dans les échantillons de grignons d'olives est la somme de l'Hy, l'Hy-1-glu, l'Hy-4-glu, le Ty, le Ty-glu, l'Hy-EDA, la rutine, la lutéoline, la lutéoline 7-glu, l'acide p-coumarique, l'acide vanillique, l'acide caféique, l'ester d'acide caféique et le comselogoside.

Les composés phénoliques totaux dans les échantillons de margines sont la somme de l'Hy, l'Hy-gly, l'Hy-1-glu, l'Hy-4-glu, le Ty, le Ty-glu, l'EDA, l'Hy-EDA, l'EA, l'acide caféique, l'ester d'acide caféique et le comselogoside.

3. Caractérisation phénolique de différentes formes de margines

3.1. Préparation d'un extrait d'acétate d'éthyle des margines

L'échantillon de margines de la variété *Sigoise*, issu du système d'extraction par presse (SP) a été retenu pour l'extraction liquide-liquide des composés phénoliques par l'acétate d'éthyle. Ces margines ont été choisies parce qu'elles sont faciles à manipuler et contiennent moins de matière organique et donc moins de colmatage.

4 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés à 4 mL de margines acidifiées (pH=2) (V/V), l'ensemble est homogénéisé à l'aide d'un vortex durant une minute, puis centrifugé à 9000 g pendant 5 min. Le surnageant d'acétate d'éthyle, riche en polyphénols, est aspiré et filtré à travers du papier-cellulose (N° 122) contenant du sulfate de sodium (≈ 10 g). Ce dernier a pour rôle l'absorption d'une éventuelle humidité (Photo. 4).

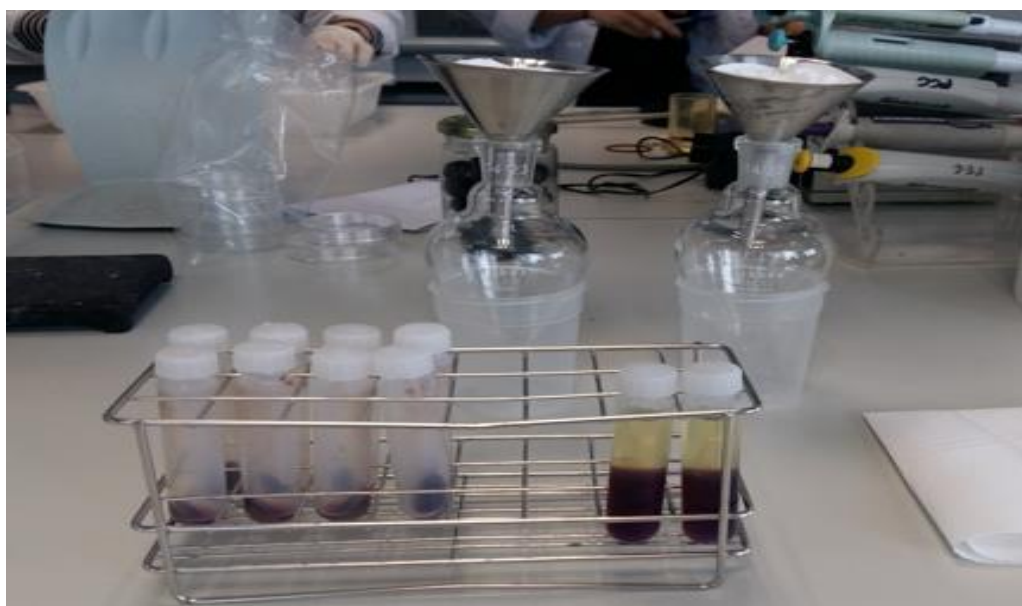
L'extraction est répétée cinq fois, en ajoutant un volume similaire d'acétate d'éthyle (4 mL) à chaque extraction, afin de récupérer le maximum des polyphénols de notre échantillon de margines (extraction par épuisement).

Un lavage du sulfate de sodium avec 70 mL d'acétate d'éthyle est effectué à la fin de l'extraction afin de récupérer les composés phénoliques qui y restent attachés.

L'extrait acétate d'éthyle est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 35°C jusqu'à l'obtention d'un dépôt jaune foncé (De Mardco *et al.*, 2007). Le ballon sec est ensuite passé sous azote pendant 15 min pour éliminer toute trace de l'acétate d'éthyle. Enfin, le dépôt jaune est récupéré dans 4 mL de l'eau distillée acidifiée (pH = 5,5) puis analysé par HPLC.

Les margines épuisées (ME) qui résultent après les cinq extractions sont également récupérées et analysées.

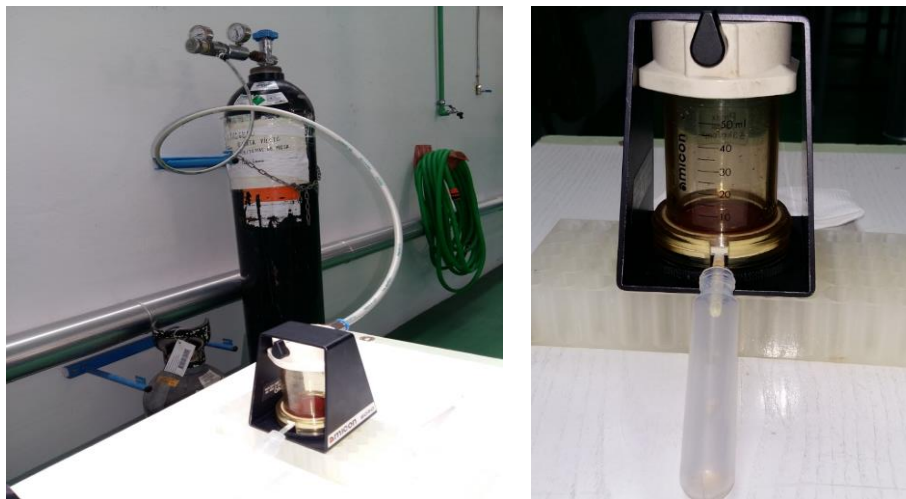
Un blanc est préparé dans les mêmes conditions en utilisant de l'eau distillée. 4 mL de l'eau distillée sont extraites cinq fois avec l'acétate d'éthyle, évaporées sous vide puis passées sous azote. L'éventuel dépôt est enfin récupéré dans 4 mL de l'eau distillée acidifiée (pH = 5,5).



Photographie 4 : Filtration de l'extrait d'acétate d'éthyle à travers du papier-cellulose contenant du sulfate de sodium.

3.2. Préparation des margines ultrafiltrées

10 mL de margines (SP), issu de la variété *Sigoise*, et d'un système d'extraction par presse, sont centrifugées à 9000 g pendant 5 min. Le surnageant récupéré est filtré dans un premier temps à travers un filtre millipore ($\text{\O} = 0,22\mu\text{m}$), ensuite il a subit une ultrafiltration à travers une membrane de cellulose (taille des mailles = 3000 Da, Whatman, Sigma-Aldrich) sous pression de nitrogène (Photo.5). Le filtrat (margines ultrafiltrées = MU) est récupéré puis analysé par HPLC.



Photographie 5 : Ultrafiltration des margines.

3.3. Analyse chromatographique des trois formes de margines

Un mélange réactionnel composé de : 250 μl de chaque type d'échantillon [margines ultra-filtrées (MU), extrait d'acétate d'éthyle (EM) et les margines épuisés (ME)], plus 500 μl d'eau distillée (pour les MU et des ME) et 500 μl d'acétate d'éthyle pour l'EM, plus 250 μl de l'étalon interne (d'acide syringique, 2mM) (Annexe 2) est filtré à travers des filtres millipores ($\text{\O} = 0,22\mu\text{m}$). 20 μl de chaque échantillon sont injectés pour analyse par l'HPLC. Le système de chromatographie et les conditions d'élution sont les mêmes que ceux mentionnés pour la caractérisation des profils phénoliques des margines brutes (section 2).

4. Purification et identification des composés phénoliques

4.1. Procédé de purification

L'hydroxytyrosol (Hy), la forme analogue au dialdéhyde du décarboxyméthyl-élénolate (EDA-like) et l'acide élénolique (EA) sont purifiés à partir de l'extrait acétate d'éthyle (EM) par HPLC analytique.

L'extrait est filtré à travers un filtre millipore ($\text{\O} = 0,22\mu\text{m}$) puis injecté directement dans l'HPLC sans traitement préalable (sans dilution et sans ajout de l'étalon interne). La colonne d'analyse, le gradient et l'équipement sont les mêmes que ceux utilisés pour l'analyse des composés phénoliques des échantillons de margines brutes excepté la phase mobile aqueuse qui a été acidifiée avec l'acide chlorhydrique (HCl, 2N, 522 μL /L, pH= 4).

Les molécules ciblées sont récupérées manuellement goutte par goutte à la sortie du collecteur de fractions (Photo. 6) durant 24 cycles successifs d'HPLC (24 injections de 20 μl), en suivant l'apparition de leurs pics et en tenant compte de leurs temps de rétention (Tab. 14) (Medina *et al.*, 2007).



Photographie 6 : Isolement et collecte manuelle des molécules purifiées par HPLC analytique.

Les extraits obtenus pour chaque pic sont évaporés sous vide, puis passés sous nitrogène. Les dépôts obtenus sont dissous dans 1 mL de tampon d'acide acétique/acétate de sodium (1,2%, à pH 5, Annexe 2). La concentration de chaque composé est mesurée par HPLC.

Un contrôle, qui servira aux tests antibactériens, est préparé en injectant de l'eau distillée dans l'HPLC. Les gouttes récupérées (75 mL) sont évaporées et le dépôt est traité comme précédemment.

Tableau 14 : Caractéristiques des composés phénoliques purifiés.

	Temps de rétention (min)	Longueur d'onde (nm)
Hydroxytyrosol	7,8 – 8,4	280
EDA-like	9,2 - 10	240
Acide élénolique	21,2– 25,5	

Toutes les manipulations de récupération des dépôts des molécules isolées après évaporations sont réalisées sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination microbienne (Medina *et al.*, 2013).

4.2. Identification des composés purifiés par HPLC-MS

L'identification des composés phénoliques purifiés à partir de l'extrait phénolique des margines est réalisée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) selon la méthodologie décrite par Susamci *et al.* (2017). Le système chromatographique est de type Waters 2695 Alliance, constitué d'une pompe, d'un thermostat de la colonne et d'un échantillonneur automatique. La détection est effectuée avec un détecteur à barrettes de diodes. (Waters 2998) et un détecteur de masse simple quadripolaire (QDa, Waters, États-Unis).

Le détecteur de masse QDa est exploité en mode négatif (ESI). La tension capillaire est réglée à 0,8 kV, la tension du cône à 15 V d'azote a été utilisée comme gaz nébuliseur avec une température de dépollution fixée à 600°C. Le débit d'élution était de 1 mL /min. La colonne et le gradient du solvant sont les mêmes que ceux mentionnés précédemment (section 2).

III. Evaluation de l'activité antibactérienne

1. Souches-test

Quatre espèces bactériennes de référence sont choisies pour l'étude de l'activité antibactérienne. Ces souches nous ont été fournies par la banque microbienne espagnole « Spanish Type Culture Collection » (CECT) de Burjasot, Valence. Il s'agit de deux bacilles à Gram négatif : *Escherichia coli* (CECT 434) et *Pseudomonas fluorescens* (CECT 378) et de deux cocci à Gram positif : *Enterococcus faecalis* (CECT 481) et *Staphylococcus aureus* (CECT 239) (Tab. 15).

Tableau 15 : Caractéristiques des bactéries-test utilisées.

Souche	T°C	Agitation	Bouillon	Gélose
<i>E. coli</i> (CECT 434)	37	Oui	Bouillon nutritif (Oxoid)	Gélose nutritive (Oxoid)
<i>P. fluorescens</i> (CECT 378)	29	Oui		
<i>S. aureus</i> (CECT 239)	37	Non		
<i>E. faecalis</i> (CECT 481)	37	Oui	Bouillon cœur-cervelle (Oxoid)	Gélose cœur-cervelle (Oxoid)

Toutes les souches sont conservées à - 80°C dans des bouillons de culture adéquats contenant du glycérol (15 à 20%) jusqu'à leur utilisation. Chaque souche cible a subi deux revivifications successives dans son bouillon correspondant et sa température d'incubation optimale avant d'être testée (Fig. 11). Des cultures d'une nuit sont utilisées pour la préparation d'inoculum.

Dans le but de déterminer les concentrations effectives des margines, un essai préliminaire est réalisé avec des margines, testées à deux concentrations différentes (50 et 100%), vis-à-vis de *P. fluorescens* qui est retenue comme souche cible. Différents temps de contact (5, 30 et 60 min) sont également testés.

2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile d'olive

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile d'olive est réalisée en suivant le protocole de **Medina et al. (2006)**. Trois échantillons de l'huile d'olive brute sont sélectionnés pour l'étude de l'activité antibactérienne contre les quatre souches citées précédemment. Il s'agit des échantillons : RC (*Rougette*, 3-phases), SP (*Sigoise*, mode presse) et BC (*Blanquette*, mode continu). Ce choix est basé sur leurs contenus en polyphénols totaux. Une seule concentration (100%) a été testée.

La taille de l'inoculum bactérien est susceptible de modifier largement les résultats des tests de détermination de la sensibilité bactérienne *in vitro* (**Garrabé et al., 1998**). Un mélange, composé de 2 mL de l'échantillon d'huile d'olive et 2 mL d'une solution saline tamponnée stérile au phosphate avec du Tween 20 (PBST) (pH = 7,0) (v/v, Sigma-Aldrich), est inoculé avec 50µL de la bactérie cible, revivifiée et préalablement diluée avec l'eau physiologique stérile pour obtenir un inoculum initial compris entre 5,70 et 5,90 Log UFC/mL.

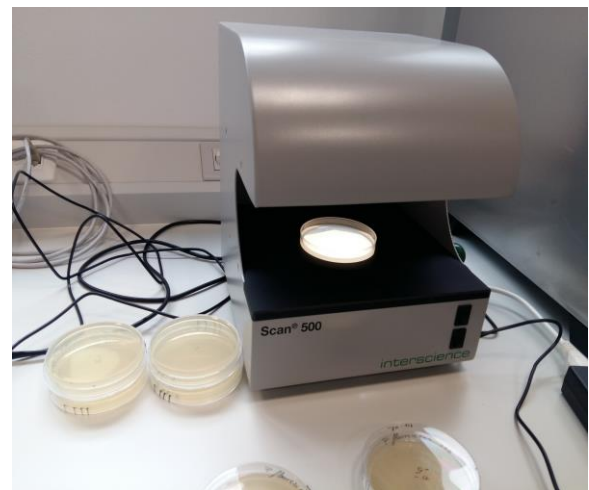
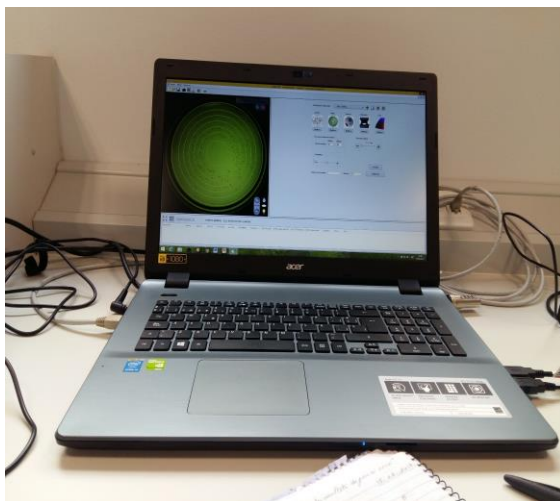
Les mélanges sont incubés à température ambiante pendant 30 min avec des agitations occasionnelles et puis dilués (10^{-1}) avec de l'eau peptonée (0,1%).

Des volumes de 50µl des dilutions sont ensuiteensemencés par spires sur les milieux de culture appropriés à chaque bactérie. Cette opération est réalisée par un ensementeur automatique (WASP 2 Spiral Plater, Don Whitley Sci. Ltd., Shipley, Royaume-Uni). Ce dernier permet de réaliser un ensemencement automatique standardisé de 1 à 1000 milliards CFU/ml sur une seule boîte de Pétri en 25 secondes. Il est doué d'une précision accrue (réduction du risque de la contamination) et d'une rapidité remarquable (ensemencement de 10 boîtes de Pétri en moins de 2 min) (Photo.7).



Photographie 7 : L'ensemencement automatique (*Spiral-plater*).

Des contrôles de PBST et de l'eau distillée stérile sont préparés et ensemencés dans les mêmes conditions. Les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} de la solution mère de chaque bactérie-test sont également ensemencées pour toutes expériences afin de confirmer la concentration de l'inoculum. Toutes les manipulations sont réalisées en double sous une hotte à flux laminaire. Après 24h d'incubation, le nombre de colonies (UFC/mL) est déterminé par un compteur de colonies automatique à haute résolution (Scan® 1200 contremat, IUL Instruments, Barcelona, Espagne). Ce compteur est équipé d'une caméra et d'un logiciel qui calcule le nombre de colonies avec un éclairage LED et enregistre automatiquement toutes les données sur Excel™, en se connectant à un ordinateur via une connexion USB (Photo. 8).



Photographie 8 : Compteur automatique à haute résolution lié à un ordinateur.

3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des margines brutes

De la même manière que les huiles d'olives, trois échantillons de margines brutes sont testés contre les quatre souches citées précédemment. Il s'agit des échantillons RC (pauvre en polyphénols, *Rougette*, mode 3-phases), SP (concentration moyenne en PT, *Sigoise*, mode presse) et BC (concentration élevée en PT, *Blanquette*, mode continu).

Le pH des échantillons de margines est ajusté à 5,5, avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 5M). Les margines sont ensuite stérilisés par filtration à travers des filtres millipores ($\varnothing = 0,22\mu\text{m}$) stériles (Medina *et al.*, 2009). Six concentrations pour chaque échantillon sont préparées par usage d'eau distillée stérile (Fig.11, Tab. 16). Un contrôle de l'eau distillé stérile à pH 5,5 est également préparé et testé. Toutes les manipulations sont réalisées en double sous une hotte à flux laminaire.

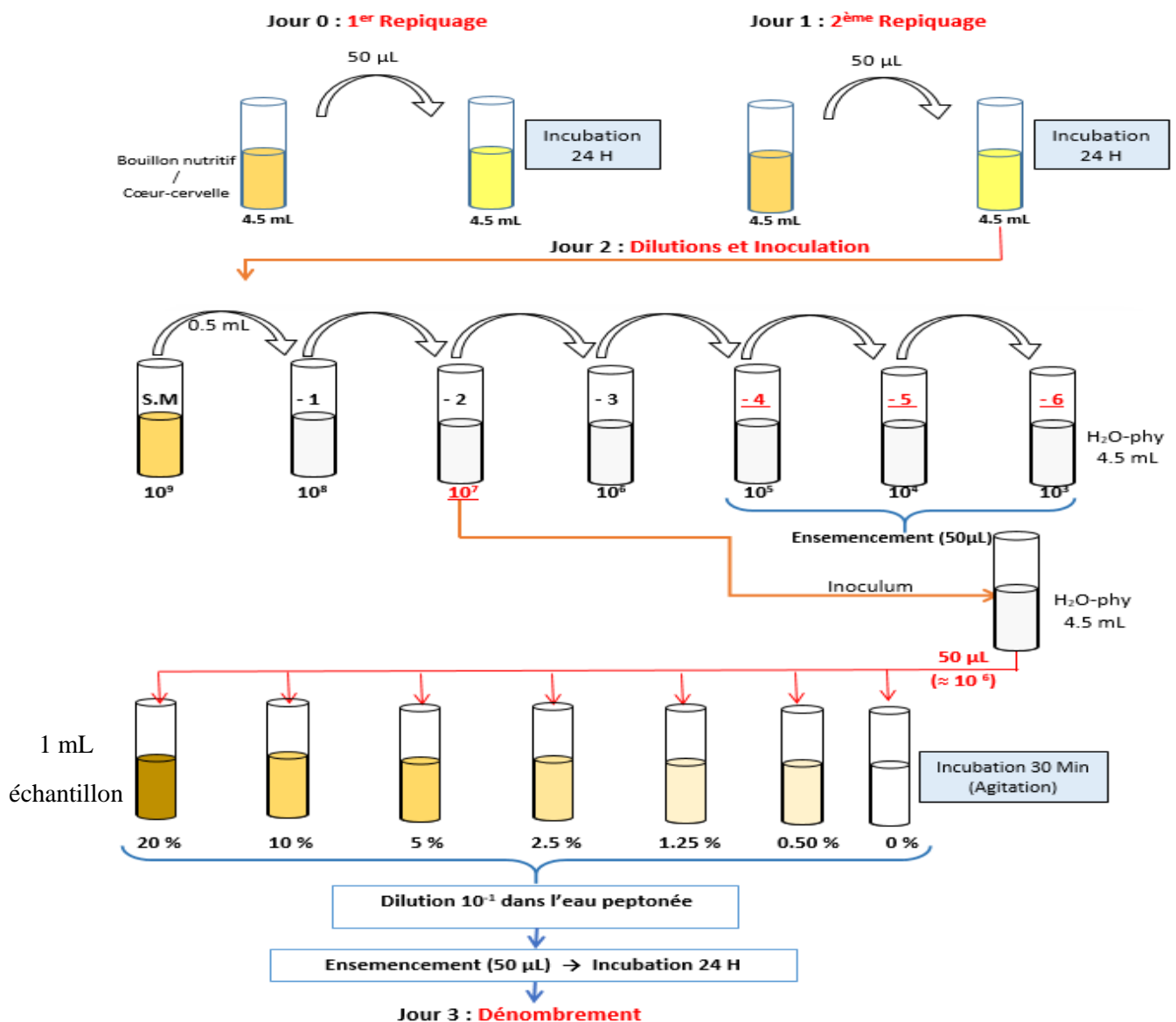


Figure 11 : Protocole de l'étude de l'activité antibactérienne des margines SP.

Tableau 16 : Gamme de concentrations testées pour chaque échantillon de margines brutes.

	Concentrations										
RC	80%	60%	40%	20%	10%	5%					
SP				20%	10%	5%	2.50%	1.25%	0.50%		
BC					10%	5%	2.50%	1.25%	0.50%	0.25%	
Contrôle											0%

Un volume de 1 mL de chaque concentration est incubé avec 50 µL d'un bouillon de culture d'une nuit de la souche cible diluée afin d'avoir une taille de l'inoculum comprise entre 5×10^5 et 1×10^6 UFC/mL.

Le mélange est incubé à température ambiante pendant 30 min (temps de contact entre la bactérie-test et les margines brutes) avec des agitations occasionnelles, puis dilué dans de l'eau peptonée (0,1%). Des volumes de 50 µL des dilutions sont ensuiteensemencés par spires, sur les milieux de culture convenables. Un dénombrement des survivants est effectué, à l'aide du compteur de colonies automatique, après 24 heures d'incubation.

4. Détermination de l'activité antibactérienne des trois formes de margines

L'activité antibactérienne de l'extrait phénolique des margines (EM), les margines épuisées (ME) et les margines ultra-filtrées (MU) est testée contre *S. aureus* CECT 239. Les inoculas sont au préalable stérilisés par filtration et leur pH ajusté à 5,5. Sept différentes concentrations sont testées pour chaque forme (Tab. 17) selon le même protocole mentionné dans la section des margines brutes.

Tableau 17 : Gamme de concentrations testées des trois formes des margines.

		Concentrations %						
MU		40	20	10	05	2.5	1.25	0.5
EM		40	20	10	05	2.5	1.25	0.5
ME		40	20	10	05	2.5	1.25	0.5
Extrait de l'eau distillée		40	20		05			
Eau distillée	100							

5. Activité antibactérienne des molécules purifiées et de leur mélange

De même, *S. aureus* CECT 239 est retenue pour évaluer les activités des composés phénoliques purifiés et de leurs mélanges. Des dilutions de l'Hydroxytyrosol, l'EDA-like, et

l'acide élénolique sont préparées, en utilisant une solution tampon d'acide acétique (1,2%), afin d'avoir des concentrations allant de 2,5 à 20 %.

Chaque concentration, est inoculée avec 50 µl de la solution mère de *S. aureus* diluée dans l'eau physiologique stérile pour atteindre une concentration de 10⁶ UFC/mL. Après un temps de contact de 30 minutes avec des agitations occasionnelles, 50 µL des dilutions 10⁻¹ sontensemencées par spires sur gélose nutritive et le nombre des survivants est dénombré après 24h d'incubation à 37°C.

En outre, un mélange de l'Hy, l'EDA-like, et l'EA est préparé et testé vis-à-vis de *S. aureus* à six concentrations (2,5 à 10%) dans les mêmes conditions.

Le contrôle de l'eau distillée préparé et un deuxième contrôle constitué d'une solution tampon d'acide acétique 1,2%, à différentes concentrations, sont également testé contre *S. aureus*, après leur stérilisation par filtration (Ø= 0,22µm).

IV. Analyses statistiques

Les données expérimentales de la caractérisation des profils phénoliques des échantillons de l'huile d'olive, des grignons d'olives et des margines et de l'évaluation de l'activité antibactérienne, obtenues sont exprimées en valeurs moyennes ± les écarts types.

Les données sont soumises à une analyse de la variance à deux facteurs en randomisation totale (ANOVA) en utilisant le logiciel *Statistica* version 7.0 (*Statistica* pour Windows, Tulsa, OK, USA), avec comme facteurs le procédé d'extraction et la variété d'olives. Le test de Duncan est utilisé pour comparer les valeurs moyennes entre les groupes. Les différences entre les groupes sont considérées significatives pour des valeurs de probabilité *p* inférieures à 0,05.



Résultats
et
Discussion

I. Echantillonnage et mesure du pH des margines

Malgré la richesse variétale de l'olivieraie algérienne (36 variétés), peu de travaux se sont intéressés aux cultivars répandus dans l'Est du pays, notamment la région de Guelma qui possède un potentiel oléicole très important. La majorité des recherches se sont concentrées sur les variétés kabyles à savoir : *Chemelal* et *Azeradj* (**Benrachou et al., 2010**).

Il faut signaler que le rendement de la filière oléicole dans la région de Guelma a enregistré une nette régression durant la saison agricole 2016-2017. En effet, presque la moitié des propriétaires des huileries de la wilaya n'ont pas mis en marche leurs huileries. Cette situation est confirmée par la moyenne du rendement qui n'a pas dépassé les 6 quintaux à l'hectare, représentant le quart seulement de la production enregistrée durant la précédente campagne (24 quintaux à l'hectare) (**Dadci, 2017**). Selon la direction des services agricoles (DSA) de la Wilaya, les conditions climatiques défavorables ayant caractérisées la région le long des mois qui ont précédé la campagne de cueillette (des chaleurs hors saison) ont favorisé l'apparition d'un insecte nuisible, la mouche de l'olivier (*Dacus olea*), qui a sévi dans les champs oléicoles.

Les valeurs de pH initiales des margines brutes mesurées avant leur acidification sont présentées dans le tableau ci-dessous. Les résultats indiquent le caractère acide des margines dont l'acidité varie entre 4,49 et 5 (Tab. 18). Ces valeurs se trouvent dans la fourchette citée dans la littérature (**Zbakh et El Abbassi, 2012 ; Dermech et al., 2013**). L'acidité des margines est généralement due à leur richesse en acides organiques (acides phénoliques, acides gras, ...) (**Capasso et al., 1992b**).

Il faut noter aussi que le système de trituration à presse engendre des margines plus acides ($4,49 < \text{pH} < 4,66$) que celles du système à 3-phases ($4,65 < \text{pH} < 5,00$). Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par plusieurs auteurs (**Yahiaoui et al., 2011; Aggoun et al., 2016**, margines algériennes : $4,8 < \text{pH} < 5,09$); (**Hafidi et al., 2005 ; El Hajjouji et al., 2008 ; Achak et al., 2009 ; Esmail et al., 2014**, margines marocaines : $4 < \text{pH} < 5,16$); (**Daassi et al., 2014**, margines tunisiennes : $\text{pH} = 5,4$) et (**Garcia Castelo et al., 2010; Barbera et al., 2014**, margines italiennes : $4 < \text{pH} < 5,03$).

Tableau 18 : Résultats des mesures du pH des échantillons de margines.

	Presse			Continu		
	<i>Rougette</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Rougette</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Sigoise</i>
pH	4,61 ± 0,15	4,49 ± 0,15	4,66 ± 0,18	5,00 ± 0,04	4,65 ± 0,03	4,79 ± 0,11

Les valeurs sont des moyennes ± l'écart type (n=2).

II. Caractérisation du contenu phénolique des produits et des sous-produits de l'olivier

1. Analyse qualitative

De nombreuses études ont traité la composition chimique des olives et de l'huile d'olive en Algérie. Cependant, très peu de travaux ont étudié la fraction phénolique de l'huile d'olive monovariétale et de ses sous-produits (grignons d'olives et margines). Dans ce contexte, une étude comparative est menée sur la caractérisation du contenu phénolique de l'huile d'olive et de ses sous-produits collectés après la trituration de trois variétés (*Blanquette*, *Rougette* et *Sigoise*) par deux procédés d'extraction prépondérants en Algérie : le système d'extraction en continu avec centrifugation à trois phases et celui d'extraction par presse.

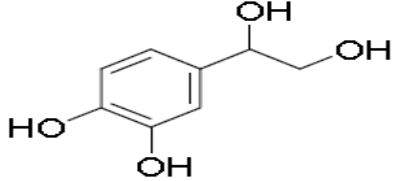
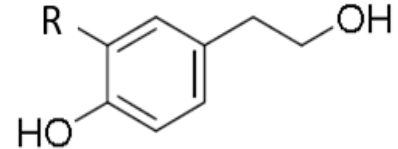
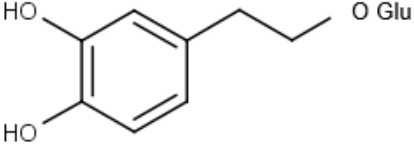
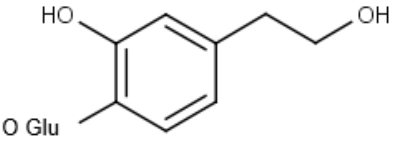
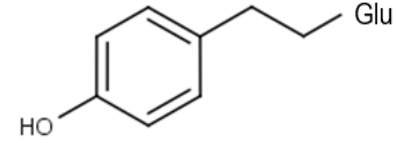
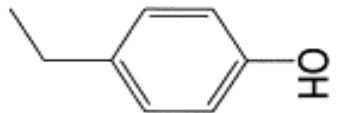
Les profils phénoliques des 54 échantillons (huile d'olive, grignons d'olives et margines) sont caractérisés par HPLC. L'identification des composés phénoliques est effectuée par comparaison des temps de rétention, des spectres des étalons de référence et en mesurant l'absorbance à 240, 280 et 340 nm.

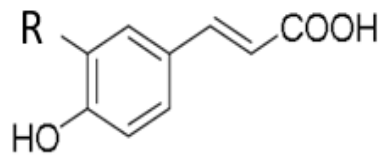
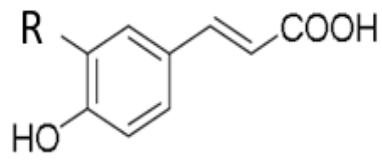
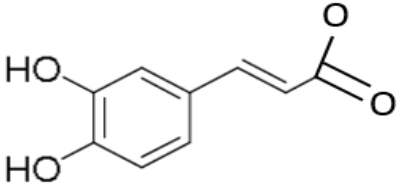
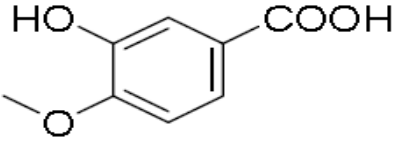
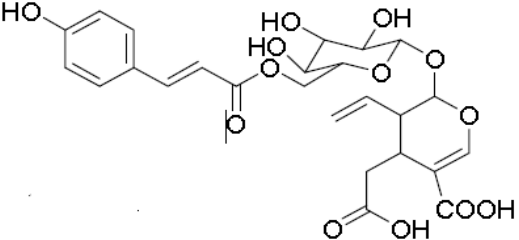
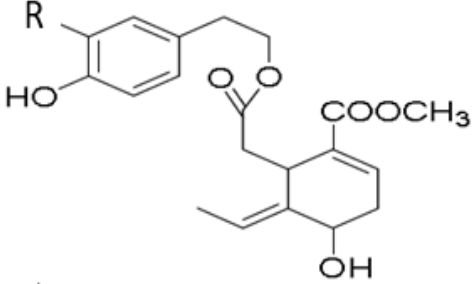
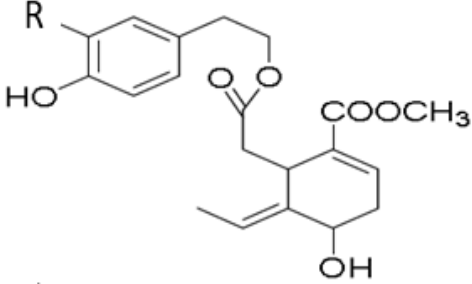
Les profils d'HPLC ont montré différents pics qui correspondent à différents polyphénols. Au total, 24 composés sont identifiés au niveau des trois types d'échantillons (huile d'olive, grignons et margines). Ces CP appartiennent à cinq classes phénoliques, à savoir les alcools phénoliques, les acides phénoliques, les lignanes, les flavonoïdes et les sécoiridoïdes. Les échantillons des grignons d'olives et de l'huile d'olive étaient plus riches en CP d'un point de vue qualitatif ; 14 et 12 composés sont identifiés respectivement dans les grignons et l'huile d'olive. Et seulement 11 composés sont caractérisés pour les échantillons de margines (Tab. 19).

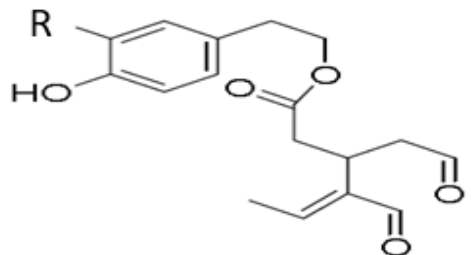
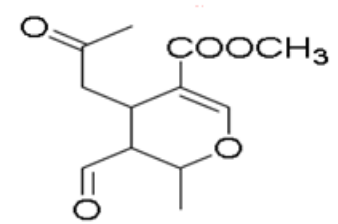
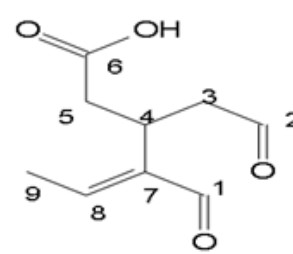
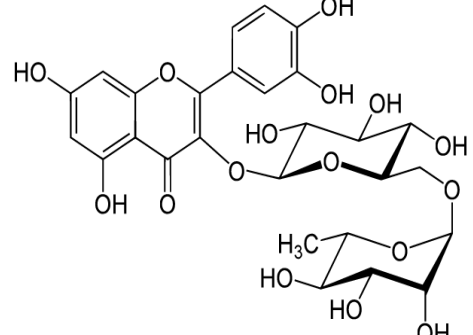
La composition phénolique des huiles d'olive analysées est différente de celle des grignons et des margines. Les échantillons de l'huile sont pauvres en acides et en alcools phénoliques, mais plutôt riches en lignanes (Pinorésinol et 1-acétoxypinorésinol), en sécoiridoïdes aglycones (Hy-EA, Ty-EA) et en dérivés séco-iridoïdes (HyEDA, Ty EDA). Ces derniers résultent de l'hydrolyse de l'oleuropéine et du ligstroside, les deux biophénols majeurs des olives, durant le processus d'extraction mécanique de l'huile (**Rovellini et Cortesi, 2002**).

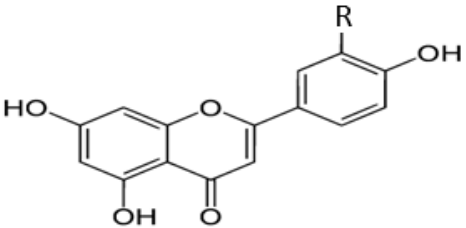
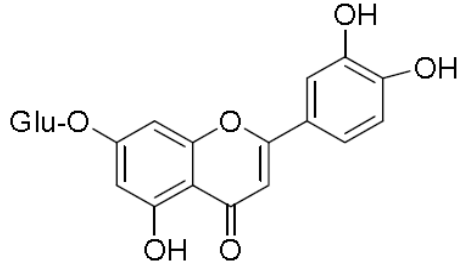
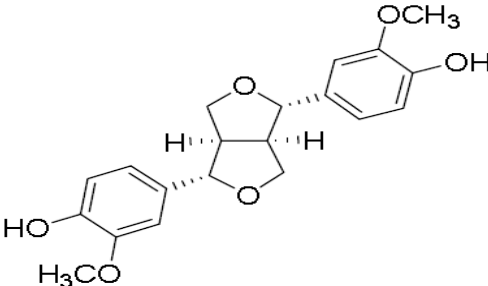
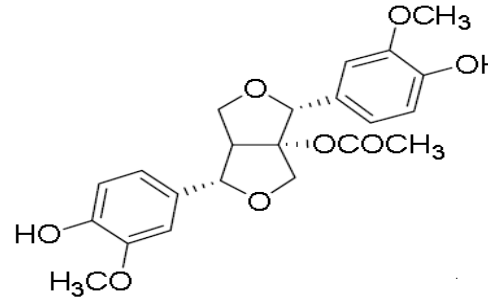
L'hydroxytyrosol et le tyrosol sont détectés dans tous les types d'échantillons analysés (huile, grignons d'olives et margines). Ces résultats sont conformes avec ceux de **Servilli et al. (1999b)**. Des teneurs importantes en formes glucosylées de l'hydroxytyrosol (Hy-1-glu, Hy-4-glu) et du tyrosol (Ty-glu) sont détectées dans les grignons d'olives et les margines. Ces derniers étaient, par contre, complètement absents dans les échantillons de l'huile d'olive. Ce sont des composés très polaires, et il est donc raisonnable de ne pas le trouver dans l'huile d'olive (**Romero et al., 2002a**).

Tableau 19 : Composés phénoliques identifiés dans les échantillons de l'huile d'olive, des grignons d'olives et des margines.

Classe	Composé	Huile	Grignons	Margines	Structure
Alcools Phénoliques Et leurs formes glycosylées	Hydroxytyrosol-glycol	+	-	+	
	Hydroxytyrosol (R = OH)	+	+	+	
	Tyrosol (R = H)	+	+	+	
	Hy-1-O-glucoside	-	+	+	
	Hy-4-O-glucoside	-	+	+	
	Salidroside	-	+	+	
	4-ethylphénol	+	-	-	

Acides phénoliques	Acide caféique (R = OH)	-	+	+	
	Acide p-coumarique (R = H)	-	+	-	
	Ester de l'acide caféique	-	+	+	
	Acide vanillique	-	+	-	
Sécoiridoïdes et leurs dérivés	Comselogside	-	+	+	
	Hy-EA (R = OH)	+	-	-	
	Ty-EA (R = H)	+	-	-	

Sécoiridoïdes et leurs dérivés	Hy-EDA (R = OH)	+	+	-	
	Ty-EDA (R = H)	+	-	-	
	Acide élénolique	-	-	+	
	EDA	-	-	+	
Flavonoïdes	Rutine	-	+	-	

	Lutéoline (R = OH)	+	+	-	
	Apéginine (R = H)	+	-	-	
	Lutéoline-7-glucoside	-	+	-	
Lignanes	Pinorésinol	+	-	-	
	1-Acétoxy-pinorésinol	+	-	-	

(+) : présence ; (-) absence.

1.1. Contenu phénolique de l'huile d'olive

Il existe trois types d'huile d'olive : (i) l'huile d'olive vierge, obtenue directement à partir des fruits frais; ii) l'huile d'olive, un mélange d'huile d'olive vierge et d'huile d'olive raffinée; et iii) l'huile des grignons d'olives, un mélange d'huile d'olive vierge et d'huile de grignons raffinée. Toutes les huiles ont la même teneur en acides gras totaux mais pas la même teneur en polyphénols (**Garcia et al., 2003**). Selon **Tuck et Hayball (2002)**, l'huile d'olive renferme plus de 30 composés phénoliques, ce sont des substances naturelles qui confèrent à l'huile d'olive des propriétés organoleptiques et contribuent à la bonne stabilité de l'huile à l'auto-oxydation (**Tura et al., 2007**).

Les échantillons de l'huile d'olive ont subi trois extractions avec le DMF avant leur analyse. L'étude des chromatogrammes des extraits phénoliques obtenus montre une composition qualitativement différente des échantillons. 12 composés phénoliques (Fig. 12) sont identifiés dans les échantillons d'huile d'olive. Il s'agit de l'hydroxytyrosol (Hy), l'Hydroxytyrosol-glycol (Hy-gly), le décarboxy-méthyle oleuropéine aglycone (Hy-EDA), l'oleuropéine-aglycone (Hy-EA), le tyrosol (Ty), le décarboxy-méthyle ligstroside aglycone (Ty-EDA), le ligstroside-aglycone (Ty-EA), le 4-éthylphénol (4-EP), le pinorésinol (Pino), le 1-Acétoxypinorésinol (Acétoxy-pino), la lutéoline (Lut) et l'apigénine (Apig).

Selon **Servilli (1999a)**, l'huile d'olive est souvent pauvre en acides et alcools phénoliques, mais plutôt riche en lignanes (**Brenes et al., 2000**) et en secoiridoides aglycones et leurs dérivés (**Montedoro et al., 1993**) qui résulte de l'hydrolyse enzymatique de l'oleuropéine et du ligstroside, les deux biophénols majeurs des olives, durant le processus d'extraction mécanique de l'huile. Nos résultats corroborent parfaitement avec ces constatations.

1.2. Contenu phénolique des grignons d'olives

Les résidus solides de l'extraction de l'huile d'olive constituent une source considérable et de bon marché de polyphénols naturels. Les grignons d'olives dans notre étude ont subi une extraction avec le DMSO. L'analyse des chromatogrammes des extraits obtenus a permis l'identification de 14 composés phénoliques (Fig. 13). Il s'agit de l'Hy-1-O-glucoside, (Hy-1-glu) ; l'hydroxytyrosol (Hy), l'Hy-4-O-glucoside (Hy-4-glu), l'Hy-EDA, le salidroside (Ty-glu), le tyrosol (Ty), l'acide caféique (AC), l'ester de l'acide caféique (Ester AC), l'acide para-coumarique (Ac. p-coum), l'acide vanillique (AV), le comselogoside (Coms), la rutine (Rut), la lutéoline (Lut) et la lutéoline-7-glucoside (Lut-7-glu). Ce profil est similaire à celui des grignons humides analysées par **Obeid et al., (2005a)**.

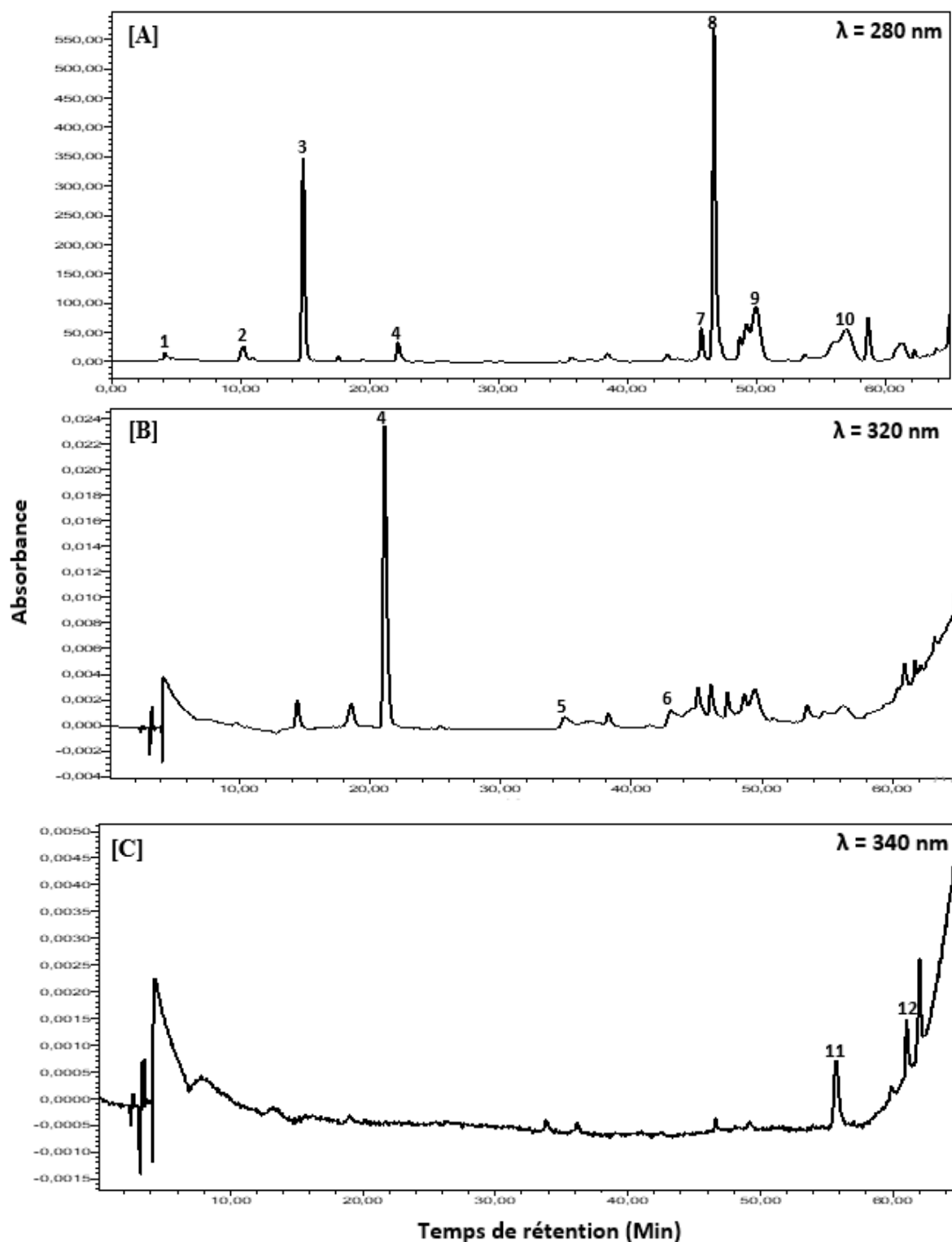


Figure 12 : Chromatogrammes d'élution des composés phénoliques de l'huile d'olive (variété *Blanquette* et système 3-phase).

Détection à fluorescence à 320 nm (excitation à 280 nm) [A], Détection par ultraviolet à 280 nm [B] et à 340 nm [C]. Pics : (1) Hy-gly; (2) Hy; (3) Ty ; (4) Acide syringique (étalon interne); (5) Hy-EDA; (6) Ty-EDA; (7) 1-Acétoxypino; (8) Pino; (9) Hy-EA; (10) Ty-EA ; (11) Lut ; (12) Apég.

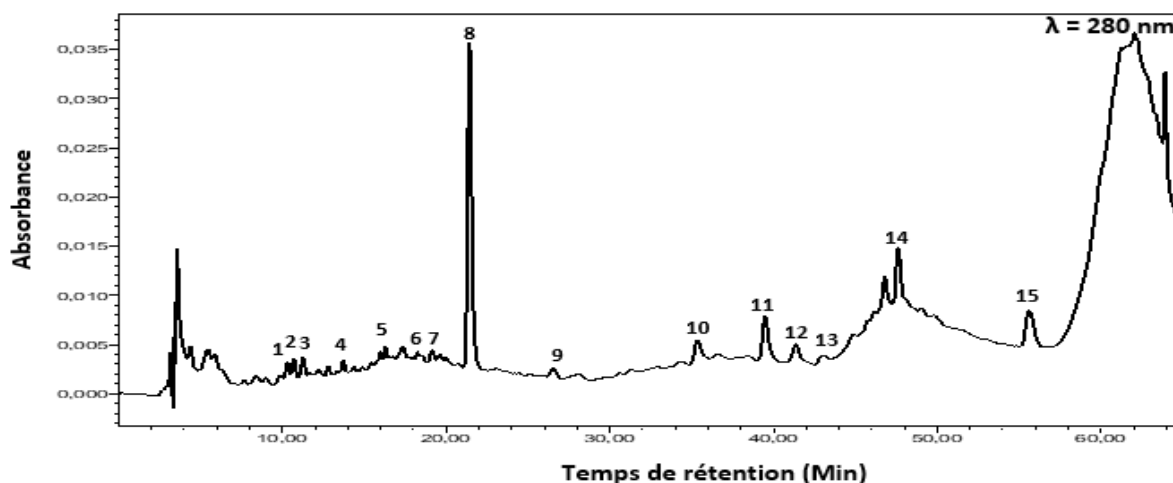


Figure 13 : Chromatogramme d'élution des composés phénoliques des grignons d'olives (variété *Rougette* et système presse).

Pics : (1) Hy; (2) Hy-1-glu; (3) H-4-glu; (4) Ty-glu; (5) Tyrosol; (6) AV; (7) AC; (8) : Acide syringique (étalon interne); (9) A p-coum; (10) Hy-EDA; (11) Lut-7-glu; (12) Rut; (13) Ester-AC; (14) Coms; (15) Lut.

1.3. Contenu phénolique des margines brutes acidifiées

La fraction phénolique des margines est caractérisée par une grande complexité (**Bianco et al., 2003**). 50 différents composés phénoliques ont été identifiés dans les margines. Cependant, les composés majeurs restent toujours l'oleuropéine et ses dérivés, notamment l'hydroxytyrosol et le tyrosol (**Obeid et al., 2005b; Zbakh et El Abbassi, 2012**).

Les margines brutes ont subi une acidification à pH 2 avec l'acide phosphorique, puis conservé à -30°C durant deux mois avant leur analyse. Ces prétraitements sont largement employés afin de stopper toute activité enzymatique et minimiser l'oxydation des polyphénols (**Ceccon et al., 2001; Mulinacci et al., 2001**). Un stockage des margines à 4°C ou à température ambiante n'empêche pas la diminution rapide des concentrations des polyphénols, qui se produit au cours des premières 24 h qui suivent leur collecte (**Obied et al., 2008**). La lyophilisation des margines fraîches est également recommandée pour préserver la fraction phénolique des margines de toute variation (**Obeid et al., 2005b**).

L'analyse des chromatogrammes des margines montre une composition qualitative, en composés phénoliques, similaire pour la plupart des échantillons quels que soient la variété d'olive ou le processus d'extraction utilisé. 11 composés phénoliques sont identifiés dans les margines étudiées (Fig. 14). Il s'agit de l'hydroxytyrosol-glycol (Hy-gly), l'hydroxytyrosol-1-O-Glucoside (Hy-1-glu), l'hydroxytyrosol (Hy), l'hydroxytyrosol-4-O-Glucoside (Hy-4-glu), le salidroside (Ty-glu), le tyrosol (Ty), l'acide caféique (AC), l'ester de l'acide caféique (Es-

ter-AC), le comselogoside (Coms), un composé analogue à la forme dialdéhyde du décarboxy-méthyl élénolate (EDA-like) et l'acide élénolique (EA). Ce composé est le principal fragment qui résulte de l'hydrolyse de l'oleuropéine. Il a été déjà détecté dans les olives (Savarese *et al.*, 2007), dans l'huile d'olive (Dierkes *et al.*, 2012; Augusto Ballus *et al.*, 2015), dans les margines (Mulinacci *et al.*, 2001) et dans les grignons d'olives (Leouifoudi *et al.*, 2015).

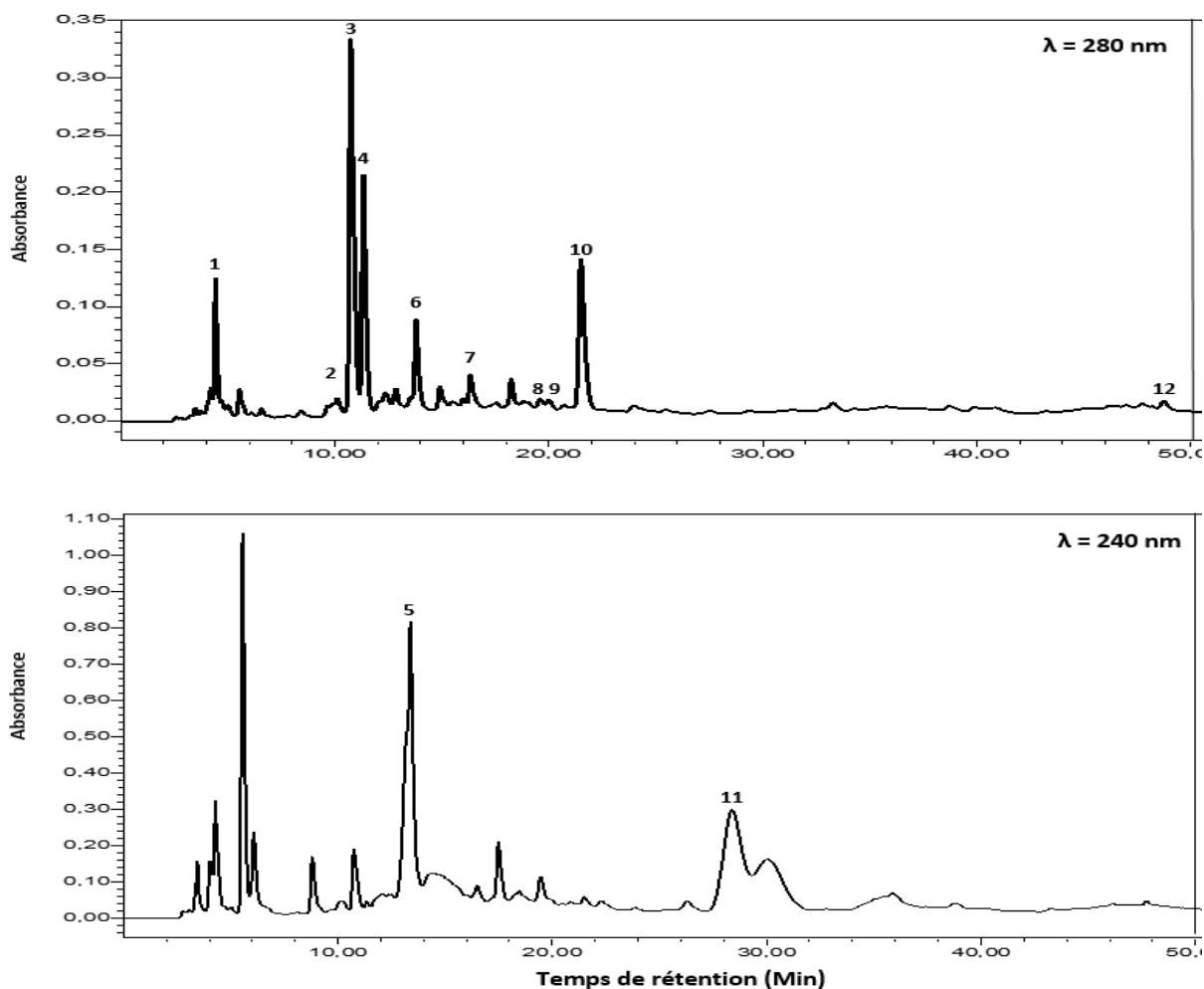


Figure 14 : Chromatogrammes d'élution des composés phénoliques des margines (variété Blanquette et système continu)

Pics : (1) Hy-gly; (2) Hy-1-glu; (3) Hy; (4) Hy-4-glu ; (5) EDA-like; (6) Ty-glu ; (7) Ty; (8) AC ; (9) Ester-AC ; (10) acide syringique (étalon interne) ; (11) AE ; (12) Coms.

L'EDA-like est un dérivé de l'acide élénolique (Rubio-Senen *et al.*, 2015), qui a été identifié dans les grignons d'olives et les margines par Lozano-Sanchez *et al.* (2011). Ce composé a été également détecté à des concentrations élevées au niveau les saumures d'olives (Medina *et al.*, 2011). La biosynthèse de l'EDA est d'origine enzymatique et endogène à l'olive, il résulte principalement de l'hydrolyse de l'Hy-EDA et du Ty-EDA.

Rubio-Senen *et al.* (2015) ont signalé l'absence de l'EDA dans la pulpe d'olive fraîche, mais il était, en revanche, présent en très grandes concentrations dans les grignons humides (alperujo) après deux mois de stockage. Une autre étude a montré que le stockage des margines à l'obscurité pendant cinq mois avait également un effet positif sur l'augmentation du taux de l'hydroxytyrosol, alors que la quantité de d'autres polyphénols diminuait (**Feki *et al.*, 2006**).

L'hydroxytyrosol et sa forme glucosylée (Hy-4-glu) sont détectés avec des teneurs très élevées dans nos échantillons de margines. Cela est conforme avec les résultats de **Allouche *et al.* (2004)** et **Obeid *et al.* (2005a)** portant sur des margines tunisiennes et australiennes, respectivement.

L'hydroxytyrosol est l'objet d'une grande attention car il présente des propriétés antioxydantes, cardioprotectrices, antiathérogènes (**Visioli *et al.*, 1999**), chimio-préventives (**Fabiani *et al.*, 2002**), antimicrobiennes (**Bisignano *et al.*, 1999**) et anti-inflammatoires (**Maiuri *et al.*, 2005**). Il résulte de l'hydrolyse de l'oleuropéine et sa forme aglycone (Hy-EA) durant la maturation et la trituration des olives (**Capasso *et al.*, 1994**).

Il est à noter que l'acidification des margines permet de précipiter les protéines et libère les polyphénols liés aux composants des parois cellulaires (**Obeid *et al.*, 2005a**). Elle provoque également l'hydrolyse des composés phénoliques complexes (sécoiridoides et leur dérivés) avec pour conséquence une libération des monomères phénoliques, comme l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide caféique (**De Marco *et al.*, 2007**). Cela explique probablement l'absence des sécoiridoides aglycones (Hy-EA, Ty-EA) et leurs dérivées (Hy-EDA, Ty-EDA) dans nos margines.

L'oleuropéine était absent dans tous les échantillons de margines analysés. Cela est peut être justifié par le stade de maturité avancé des olives, des trois variétés étudiées, avant leur trituration. En effet, au cours de la maturation des olives, l'activité des estérases et des glucosidases augmente (**Visioli *et al.*, 2002; Baccouri *et al.*, 2008**) entraînant ainsi une transformation totale de l'oleuropéine en sa forme aglycone et puis en hydroxytyrosol et en acide élénolique (EA).

Le verbascoside, un complexe phénolique caractérisé par de multiples propriétés bénéfiques pour la santé (**Liu *et al.*, 2003**) était très abondant dans les grignons humides analysées par **Obeid *et al.* (2005)**. Ce composé était, par contre, totalement absent dans nos extraits phénoliques des grignons d'olives et dans nos margines brutes. Cela est probablement expliqué par son hydrolyse en hydroxytyrosol et en acide caféique.

Les flavonoïdes, un groupe de substances naturelles, possédant de nombreuses propriétés biologiques (**Pietta, 2000**), étaient également absents dans nos margines. **De Marco *et***

al. (2007) ont détectés des concentrations faibles en flavonoïdes (209 ppm de lutéoline) dans des extraits phénoliques issus de margines acidifiées.

Enfin, il faut signaler que les margines constituent une matrice très complexe et fragile à manipuler en comparaison avec d'autres matrices végétales (**Bianco *et al.*, 2003; Obeid *et al.*, 2005b**). Nombreux pics ont été détectés mais non identifiés. Cependant, les activités biologiques démontrées par les biophénols de ces effluents oléicoles incitent les chercheurs à n'épargner aucun effort pour les récupérer et les valoriser.

1.4. Contenu phénolique des margines ultrafiltrées

L'ultrafiltration est un procédé physique de séparation soluté/solvant sur membrane qui s'applique aux solutions aqueuses, sous l'action d'une force hydrostatique n'excédant généralement pas quelques bars. Cette différence de pression assure le tri des divers solutés, par tamisage moléculaire. La taille des molécules retenues par l'ultrafiltration va de 0.002 µm à 0.1 µm selon la membrane choisie. Selon **Lounici *et al.* (2016)**, l'ultrafiltration est un traitement adapté aux effluents oléicoles afin de les débarrasser de leur charge organique. Ce procédé et celui de la nanofiltration ont été utilisés dans différents travaux de recherche pour purifier les polymères et fractionner les polyphénols des margines en fonction de leur poids moléculaire (**Della-Greca *et al.*, 2004 ; Garcia-Castello *et al.*, 2010 ; Cardinali *et al.*, 2011**).

La composition phénolique des margines de la variété *Sigoise* et collectées du système de trituration par presse, a subi une ultrafiltration à travers une membrane de cellulose avec un domaine de fractionnement de 3000 Daltons. L'analyse du chromatogramme du filtrat permet de constater que le profil phénolique des margines ultrafiltrées est similaire qualitativement à celui des margines brutes. Il ressort donc que les poids moléculaires des 11 CP identifiés dans nos margines sont inférieurs à 3000 Da. Ce résultat est confirmé par les données de la littérature (Tab. 8) qui montrent une variation de 100 à 700 Da du poids moléculaire des polyphénols de l'olivier (**Jerman-Klen, 2014**).

1.5. Contenu phénolique de l'extrait d'acétate d'éthyle et des margines épuisées

Les margines (SP) ont également subi cinq extractions avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer leur fraction phénolique. Cette méthode d'extraction, liquide-liquide, est couramment utilisée pour la récupération de la fraction phénolique des margines (**Obied *et al.*, 2005a**).

La Figure 15 indique qu'il y a eu une récupération totale des CP, initialement identifiés dans les margines brutes, à l'exception des formes glycosylées de l'hydroxytyrosol (Hy-4-glucoside, Hy-1-glucoside) et du tyrosol (Ty-glu). Ces résultats sont comparables à

ceux obtenus par **Romero *et al.* (2002b)** et **Obeid *et al.* (2005)** qui n'ont pas détectés la présence de CP conjugués aux glucides au niveau de leurs extraits phénoliques de grignons humides obtenus en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant.

L'analyse du profil phénolique des margines épuisées après les cinq extractions (Fig. 16), confirme la perte de l'Hy-4-glu et du Ty-glu dans ces dernières. Le caractère polaire de ces composés et leur masse moléculaire plus au moins élevée, justifie leur présence dans les margines épuisées (**Romero *et al.*, 2002b**). Enfin, l'hydroxytyrosol glycol est, en revanche, présent au niveau des deux phases, l'extrait d'acétate d'éthyle et les margines épuisées.

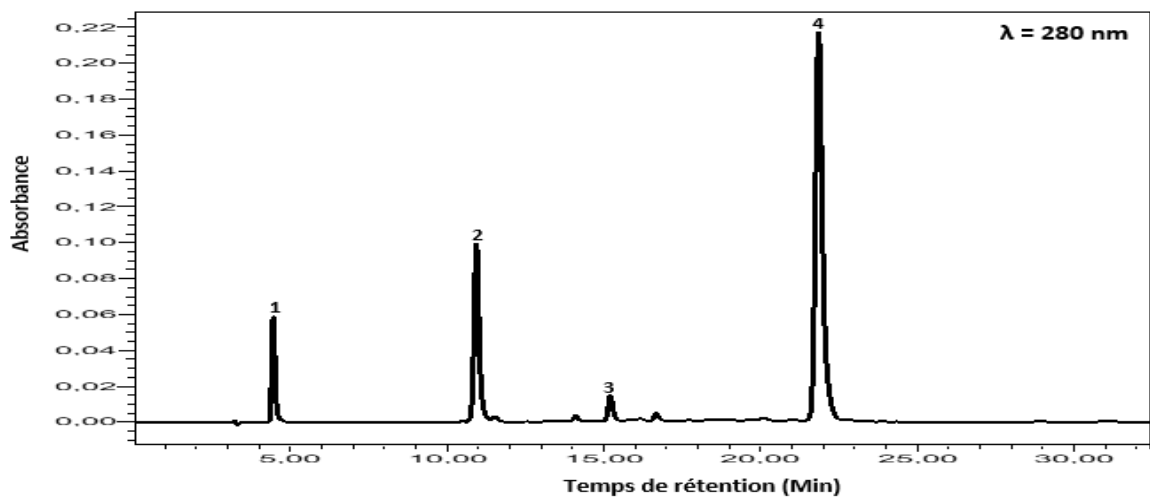


Figure 15 : Chromatogramme d'élution du contenu phénolique de l'extrait d'acétate d'éthyle des margines (variété Sigoise et système presse).

Pics : (1) Hy-gly; (2) Hy; (3) Ty ; (4) acide syringique (étalon interne).

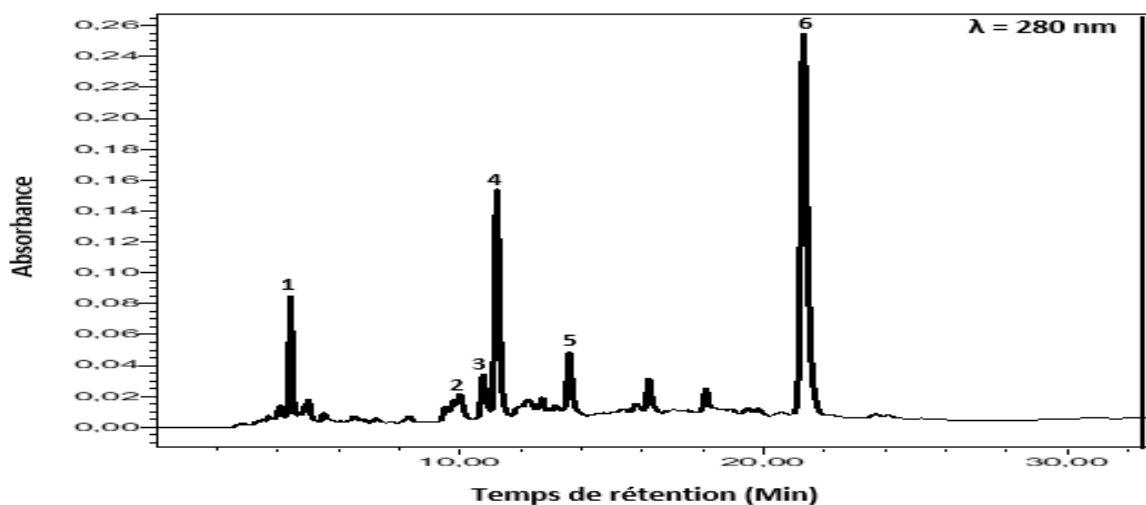


Figure 16 : Chromatogramme d'élution des composés phénoliques des margines épuisées (variété sigoise et système presse).

Pics : (1) Hy-gly; (2) Hy-1-glu; (3) Hy; (4) Hy-4-glu ; (5) Ty-glu ; (6) Acide syringique (étalon interne).

2. Analyse quantitative

Les concentrations des composés phénoliques identifiées dans les échantillons de l'huile d'olives, des grignons d'olives et des margines sont calculées en comparant les surfaces des pics détectés avec celle de l'étalon interne (acide syringique 2 mM). Les concentrations en PT présentées dans notre étude représentent la somme des composés identifiés et quantifiés par HPLC.

Selon **Rodis et al. (2002)**, la fraction phénolique de l'huile d'olive ne représente que 2% de la teneur totale des composés phénoliques des olives, les 98% restants sont surtout perdus avec les margines et les grignons, générées lors de la trituration des olives. Nos résultats confirment cette hypothèse. Les concentrations phénoliques les plus élevées sont enregistrées pour les margines, qui sont dix fois plus riches en PT que les grignons et 30 fois plus riches que l'huile d'olive. En outre, la répartition des polyphénols dans les produits et les sous-produits de l'olivier est en étroite relation avec les conditions climatiques, l'état de maturation des olives, le système de trituration et la variété génétique des olives (**Fiorentino et al., 2003**). De même, de nombreuses études ont montré que certaines variétés d'olives sont plus riches en composés phénoliques que d'autres (**Vinha et al., 2005 ; Gomez et al., 2008 ; Tura et al., 2008**). Cette situation est confirmée dans notre cas où les teneurs les plus élevées en PT, pour nos trois types d'échantillons (huile, grignons, margines), sont enregistrées pour la variété *Blanquette*. Des résultats comparables sont également notés pour la même variété par **Laribi et al. (2011)**. En effet, cette variété réputée pour produire une huile d'excellente qualité.

2.1. Composition phénolique de l'huile d'olive

Les profils phénoliques des 18 échantillons de l'huile d'olive, issus de différentes huileries modernes et traditionnelles, ont présenté une composition différente d'un point de vue quantitatif (Tab. 22). Les huiles d'olive analysées présentent des teneurs en polyphénols totaux qui varient entre 62,69 et 452,22 mg/Kg d'huile. Ces concentrations sont relativement proches de celles des variétés d'olives locales étudiées par **Douzane et al. (2013)** et par **Laribi (2015)** pour lesquelles les teneurs en PT sont comprises entre 109 et 322 mg/Kg et entre 77,63 et 628,72 mg/Kg, respectivement. Cependant, **Ocakoglu et al. (2009)** ont enregistré des teneurs qui oscillent entre 75,46 et 333,37 mg/Kg pour des variétés d'olives turques.

La teneur en composés phénoliques est un paramètre important pour l'évaluation de la qualité de l'huile d'olive. Les phénols contribuent largement à la saveur de l'huile (**Gutiérrez-Rosales et al. 2003**) tant qu'elle est protégée contre l'auto-oxydation (**Pellegrini et al., 2001**;

Mateos et al., 2005). Selon (**Boskou et al., 2006**), une huile d'olive est dite de mauvaise qualité si elle présente un taux en PT inférieur à 200 mg/Kg ; de qualité moyenne si le taux en PT varie entre 200 à 500 mg/Kg ; et de bonne qualité si sa teneur en PT dépasse 500 mg/Kg. En se basant sur cette classification, nos huiles analysées (66,67%) sont de qualité moyenne, les restes sont de mauvaise qualité.

Plusieurs travaux de recherche ont signalé que la composition en polyphénols de l'huile d'olive est largement influencée par le cultivar (**Brenes et al., 1999; Garcia et al., 2003 ; Vekiari et al., 2010**). Cette composition constitue une propriété intrinsèque de la variété permettant la caractérisation variétale des huiles d'olives (**Gómez-Alonso et al., 2002**). L'huile d'olive (BC) de la variété *Blanquette*, issus d'un système continu triphasique a montré la concentration la plus importante en polyphénols totaux (452,22 mg/kg d'huile). **Laribi et al., (2011) et Lancer et al. (2014)** ont enregistré des teneurs moins importantes, soit 365,24 mg/kg et 340 mg/kg, respectivement, pour la même variété. Cette variabilité de la concentration entre les mêmes cultivars dépend de nombreux facteurs, y compris l'agronomie, les saisons et les facteurs environnementaux. De plus, selon, **Klen et Vodopivec (2012)**, le système traditionnel à presse permet un transfert élevé en phénols à l'huile par rapport au système à trois phases. Ceci correspond à l'huile d'olive (BC) qui a montré une concentration importante en polyphénols totaux (395 mg/Kg d'huile), significativement supérieure à celle obtenue par une extraction à presse (202 mg/Kg d'huile). En revanche, les huiles des variétés *Rougette* et *Sigoise*, issus de systèmes traditionnels sont plus riches en PT (300 et 267 mg/Kg d'huile, respectivement) par rapport aux huiles des mêmes variétés, issus d'un système continu à trois phases (187 et 150 mg/Kg d'huile, respectivement). Bien que cette différence n'est pas significative que pour la *Rougette* (Fig. 17).

Même si elle présente parfois des caractéristiques analytiques permettant de la classer dans la catégorie vierge, l'huile extraite dans les huileries à presses souffre souvent de défauts organoleptiques (goût scourtins et margines) à cause d'une mauvaise application des conditions de fabrication et d'hygiène. L'extraction de l'huile d'olive dans les unités équipées de centrifugation à deux phases (huile et grignons humides) présente le meilleur procédé parce qu'il n'altère pas la qualité de l'huile produite. Les opérations de transformation se passent en clos et sont optimisées. Ainsi, l'huile extraite se trouve riche en polyphénols et se caractérise par une meilleure résistance à l'oxydation et donc une durée de conservation plus longue (**Chimi, 2006**).

Les résultats des analyses quantitatives du contenu phénolique des échantillons de l'huile d'olive présentés dans le tableau 20 montrent que le pinorésinol, l'Hy-EA et le Ty-EA

présentent les composés majoritaires des huiles analysées, suivis par l'hydroxytyrosol, le Hy-EDA, le Ty-EDA, le tyrosol et le 1-acétoxy-pinorésinol. Et enfin l'Hy-glycol, le 4-éthylphénol et les flavones (lutéoline et l'apigénine) en très faibles concentrations.

Tableau 20 : Concentrations moyennes des CP des extraits de l'huile d'olive (mg/Kg) quantifiés par HPLC selon la variété et le procédé d'extraction.

Composé	Presse			Continu		
	<i>Rougette</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Rougette</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Sigoise</i>
Hy	69,81± 9	5,14± 2,4	13,92± 1,6	15,34± 6,8	17,24± 9,5	4,29± 0,3
Hy-gly	4,06± 1,3	0,65± 0,5	1,88± 0,3	0,17± 0,2	1,03± 00	1,31± 0,2
Hy-EDA	0,00	12,22± 11	13,28± 4,9	15,17± 23	62,92± 28	15,37± 1,1
Hy-EA	69,30± 19	30,83± 21	32,85± 7,9	29,74± 30	78,96± 16	21,71± 9,1
Ty	44,86± 1,8	8,81± 6,2	28,86± 3,4	2,80± 3,2	8,28± 1,8	8,02± 0,6
Ty-EDA	12,26± 3,3	15,72± 13	16,87± 1,7	12,87± 10	36,80± 4,1	17,84± 3,4
Ty-EA	54,23± 47	62,81± 55	64,35± 28	4,20± 3,3	61,77± 96	49,98± 21
4-EP	5,29± 0,4	1,24± 2,1	0,21± 0,3	6,35± 2,4	0,00	1,08± 0,1
Pino	34,90± 0,6	46,43± 14	65,87± 6,7	75,94± 35	105,86± 35	22,52± 1,5
Acéto-pin	3,04± 4,7	15,96± 5,5	25,23± 2,1	21,21± 7	17,84± 3,1	7,40± 0,4
Lut	1,96± 0,3	1,75± 0,5	2,81± 0,2	2,14± 0,8	2,70± 0,4	0,36± 0,1
Apig	0,64± 0,1	0,62± 0,1	0,68± 00	1,27± 0,4	1,23± 0,4	0,28± 00
PT	300,35 ± 61	202,17 ± 114	266,79 ± 26	187,20 ± 91	394,63 ± 51	150,15 ± 33

Les valeurs sont des moyennes ± l'écart type (n = 2)

Brenes et al. (2001) et Baiano et al. (2009) ont observé que les teneurs en tyrosol et en hydroxytyrosol sont généralement faibles dans l'huile nouvellement extraite mais augmentent graduellement au cours du stockage, parallèlement à une diminution des formes phénoliques complexes telle que le Hy-EDA et le Ty-EDA. Selon **Boskou et al. (2006)**, une huile d'olive est dite vierge-extra si elle contient une concentration supérieure ou égale à 50 mg/kg d'hydroxytyrosol et une concentration ≥ 40 mg/kg de tyrosol. Cela correspond à l'huile (RC) de la variété *Rougette* issus d'une extraction à presse, bien qu'elle n'ait pas présenté le taux le plus élevé en PT.

Il ressort des données du tableau 22 que toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs très appréciables (22,52 à 105,86 mg/Kg) en pinorésinol, un lignane qui présente un

intérêt pharmacologique considérable (**Kawagishi et al., 1994**). La variété *Blanquette* s'est caractérisée par la teneur la plus élevée (105,86 mg/Kg). Le pinorésinol et le 1-acétoxy-pinorésinol sont détectés, pour la première fois, dans les huiles d'olive commercialisées en Espagne par **Brenes et al. (2000)**.

Les taux de lignanes sont plus importants à ceux des flavonoïdes pour toutes nos huiles analysées. Les mêmes résultats sont observés par **García-Villalba et al., (2010)** pour la variété Espagnole *Arbequina*.

Les flavonoïdes sont habituellement présents dans l'huile d'olive en très petite quantité, moins de 2 à 3% des polyphénols totaux (**Mulinacci et al., 2005**). L'apigénine et la lutéoline sont présents dans tous les échantillons, avec des concentrations très faibles, comprises entre 0,28 et 2,81 mg/Kg avec une prédominance de la lutéoline. Les variétés étudiées par **Laribi et al. (2011)** ont, par contre, présenté des taux plus élevés en flavonoïdes.

Le 4-éthylphénol (4-EP) est un composé phénolique qui donne un mauvais goût et une mauvaise odeur à l'huile d'olive (**Brenes et al., 2004**). Il présente donc un indicateur d'une mauvaise qualité de l'huile. Ce composé est détecté, à des faibles concentrations, dans le 61% des huiles analysées. Cela peut être expliqué par le non-respect des conditions d'hygiène dans nos huileries et surtout la mauvaise conservation des olives avant leur trituration. En Algérie, les olives destinés à la trituration sont, couramment, collectées et transportés dans des sacs en plastique qui sont entreposés les uns sur les autres, pour, finalement pourrir aux portes des huileries. Néanmoins, une utilisation de grands cageots pour la collecte préserve les olives d'éventuelles avaries et, par conséquent, la qualité de l'huile n'en sera que meilleure.

2.2. Composition phénolique des grignons d'olives

Les résultats de l'analyse quantitative des contenues phénoliques des 18 échantillons de grignons d'olives issus de la trituration des trois variétés d'olives sont montrés dans le tableau 21. Les concentrations en polyphénols totaux des grignons sont comprises entre 59,02 et 820,26 mg/Kg. Ces valeurs sont supérieures à celles déterminées par **Mouzaoui et al. (2015)** en analysant des grignons générés par différentes huileries algériennes (7,64 et 9,42 mg/Kg). Par contre, elles sont faibles par rapport aux taux en PT enregistrés par **Obeid et al. (2005a)** pour des grignons humides issus d'une extraction à deux phases. L'écart des valeurs trouvées entre les deux types d'échantillons peut être expliqué par la différence de nature des grignons étudiés. En effet, les grignons humides provenant d'un système à deux phases sont plus riches en CP contrairement à ceux issus du système à trois phases ou d'une extraction par presse, car ils contiennent en plus de la peau, la pulpe et le noyau, des margines, ce qui laisse

supposer que cette teneur élevée en PT est due à la présence de ces dernières (Mouzaoui *et al.*, 2015). La variation entre les valeurs trouvées et celles mentionnée dans la bibliographie peut être également expliquée par la méthode d'extraction adoptée et du solvant utilisé.

Tableau 21 : Concentrations moyennes des CP des extraits des grignons (mg/Kg) quantifiés par HPLC selon la variété et le procédé d'extraction.

Composés	Presse			Continu		
	<i>Rougette</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Rougette</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Sigoise</i>
Hy-1-glu	22,84± 1,2	22,74± 4,2	43,33± 0,7	19,49± 10	54,81± 13,8	51,87± 7,0
Hy	11,92± 3,4	1,59± 2,47	5,05± 7,92	6,22± 9,8	13,18± 10,5	1,14± 1,7
Hy-4-glu	88,90± 13	52,65± 8,7	72,33± 41	69,55±103	441,62±152	165,99± 35
Hy-EDA	93,06± 7,9	85,43± 19	47,53± 5,9	11,01± 17	47,42± 13	54,07± 8,2
Ty-glu	12,88± 1,8	4,36± 1,4	4,29± 0,4	3,05± 4,7	17,78± 5,1	4,14± 0,8
Ty	2,82± 2,8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A C	1,01± 0,1	0,22± 0,3	0,00	1,21± 0,39	0,85± 0,11	0,00
Ester-AC	2,99± 0,4	0,67± 1	0,00	0,00	0,58± 0,9	0,00
A p-coum	2,11± 0,5	0,30± 0,4	0,21± 0,3	0,36± 0,3	0,17± 0,2	0,53± 0,4
AV	5,68± 0,5	5,78± 0,6	5,59± 0,81	6,89± 1,22	4,94± 1,28	6,44± 1
Coms	11,35± 1,5	5,13± 2,1	1,56± 0,3	0,73± 1,1	3,79± 1	1,26± 0,2
Rut	41,18± 5,4	20,48± 5,7	9,74± 4,8	7,59± 6,9	21,21± 5,8	12,12± 4,2
Lut	37,99± 3,5	26,35± 4,8	16,28± 2,3	29,86± 2,7	37,16± 1,4	10,87± 1,9
Lut-7-glu	50,12± 7	33,93± 6,2	11,33± 4,8	8,55± 3,1	17,82± 4,8	21,97± 4,1
PT	384,84 ± 41	259,64 ±46	217,24 ±40	164,51 ±155	661,32± 203	330,39 ± 53

Les valeurs sont des moyennes ± l'écart type (n = 2)

La teneur la plus élevée en PT est enregistrée pour les grignons de la variété *Blanquette*, issus d'un système d'extraction continu (661,32 mg/Kg de grignons), et la plus faible pour les grignons de la variété *Rougette* issue du même système (164.51 mg/Kg de grignons). Aucune différence significative n'est détectée pour les deux systèmes d'extraction pour les grignons de la variété *Sigoise* (Fig. 17).

Les isomères glucidiques de l'hydroxytyrosol (Hy-4-glu, Hy-1-glu), le Hy-EDA et l'hydroxytyrosol présentent 73% des PT de nos grignons. Ces résultats sont comparables aux données rapportées par certains auteurs (Lesage –Meesen, 2001; Morsi *et al.*, 2016). Les flavonoïdes viennent en deuxième position avec des concentrations qui varient entre 7,59 et

41,18 mg/Kg pour la rutine ; 10,87 et 37,99 mg/Kg pour la lutéoline et de 8,55 à 50,12 mg/Kg pour la lutéoline-7-glucoside. Ces composés sont également identifiés dans les grignons humides étudiés par **Obeid et al., (2005b)**. Enfin, le salidroside (Ty-glu), l'acide vanillique, le comselogoside, le tyrosol, l'acide caféique, l'ester de l'acide caféique et l'acide p-coumarique viennent en dernière position avec des concentrations très faibles.

2.3. Composition phénolique des margines brutes

Les résultats des analyses quantitatives des contenus phénoliques des 18 échantillons de margines issues de la trituration des trois variétés d'olive sont montrés dans le tableau 22. Les teneurs en PT des margines ont été étudiées par plusieurs auteurs. Des valeurs élevées de 11,5 g/L ont été quantifiées par **Ben-Sassi et al. (2006)** ; 10,7 g/L trouvées par **Vlyssides et al., (2004)**. Des concentrations trop faibles (0,8 g/L et 0,25 g/L) ont été notées par **Paraskeva et al. (2007)** et par **Moussaoui (2007)**, respectivement.

Pour les margines brutes et ultrafiltrées, les résultats, exprimé en mg d'acide syringique /L de margines, ont montré des teneurs en polyphénols totaux comprises entre 1,09 à 12,48 g/L. Ces résultats corroborent parfaitement avec ceux signalés dans la littérature (**Servili et al., 1999**; **Della Greca et al., 2004**; **Obied et al., 2005b** ; **Zbakh et El Abbassi, 2012**).

L'extraction de l'huile d'olive dans les unités équipées de centrifugation à trois phases (huile, grignons et margines) nécessite l'ajout d'importantes quantités d'eau pour séparer les trois phases précitées. Les produits et les sous-produits qui résultent, seront donc appauvries en polyphénols (**Chimi, 2006**; **Dermech et al., 2013**). Cela correspond parfaitement à nos résultats. Les échantillons de margines provenant des huileries traditionnelles à système de presse sont montrées plus riches en polyphénols, avec des concentrations phénoliques qui varient entre 5,68 et 12,48 g/L, par rapport aux margines résultantes d'un procédé continu de trituration (1,09 à 10,82 g/L). Ces résultats sont, également, en accord avec les données rapportées par le **COI (1990)** qui a cité des valeurs en PT comprises entre 1,4 à 14,3 g/L pour les margines générées par les huileries traditionnelles et de 0,4 à 7,1 g/L pour les margines issus des huileries à système tri-phasique.

La variété *Blanquette* a présenté les contenus en PT les plus élevés (12,48 g/L). En deuxième position vient les deux autres variétés *Rougette* et *Sigoise* avec le même contenu (6,8 g/L). Contrairement à ce qui a été observé pour d'autres cultivars d'olives algériens (**Aggoun et al., 2016**), les margines des variétés *Blanquette* et *Rougette*, issus d'un système d'extraction traditionnel à presse ont présenté des taux en polyphénols significativement supérieurs (11,15 et 10,03 g/L, respectivement) aux margines, des mêmes variétés, qui résultent

d'un système continu (9,69 et 1,18 g/L). Cependant, aucune différence significative, entre les deux systèmes, n'a été observée pour la variété *Sigoise* (5,76 et 5,46 g/L) (Fig. 17).

Tableau 22 : Concentrations moyennes des CP des margines (mg/L) quantifiés par HPLC selon la variété et le procédé d'extraction.

Composé	Presse			Continu		
	<i>Rougette</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Rougette</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Sigoise</i>
Hy-gly	668,33±55	431,24±59	261,47±4	146,93±12	234,89± 16	362,81± 7
Hy-1-glu	86,51±11	58,19±8	24,16±2	26,72±4	22,01± 2	89,45± 2
Hy	1303,81±119	2226,57±332	441,37±17	92,51± 14	1253,58± 144	250,59± 24
Hy-4-glu	2088,56±177	1680,83±451	1693,19±88	218,80±10	2611,48± 460	3554,38±218
Ty-glu	252,69±26	320,88±49	123,47±5	32,89± 4	248,04± 21	70,45± 4
Ty	118,60±15	155,45±20	46,96±7	14,32± 2,19	71,30± 9,27	33,35± 3
AC	4,19±1,6	2,52±0,6	0,35±0,5	0,00	3,45± 0,6	3,59± 0,6
Ester-AC	2,41± 0,7	3,14± 0,3	0,84± 0,2	0,00	1,03± 0,3	0,00
Com	5,01± 3	5,18± 2	1,66± 1,13	0,00	0,37± 0,6	2,04± 0,1
EDA-like	2189,24± 258	2355,34±199	1279,39±48	497,22± 42	3511,77± 367	728,74± 29
AE	3531,56± 346	3915,47±256	1886,78±79	66,25± 17	1732,16± 198	373,09± 45
PT	10250,89 ± 650	11154,79 ± 1259	5759,62 ± 136	1095,65 ± 69	9690,06 ± 1121	5468,48 ± 238

Les valeurs sont des moyennes ± l'écart type (n=2)

L'Hy-4-glu (1,97 g/L), l'acide élénolique (1,91 g/L), l'EDA-like (1,76 g/L) et l'hydroxytyrosol (0,92 g/L) présentent 90% des PT des margines (Tab. 24). L'Hy-glycol (0,35 g/L), le salidroside (0,17 g/L), le tyrosol (0,073 g/L) et l'Hydroxytyrosol-1-O-glucoside (0,051 g/L) viennent en deuxième position selon leurs abondances. Et enfin, le comselogside, l'acide caféique et l'ester de l'acide caféique sont présents à l'état de traces.

Les margines générées par les huileries traditionnelles étaient plus riches en hydroxytyrosol et en tyrosol en comparaison avec les huileries modernes. Cela est parfaitement conforme aux valeurs citées par le **COI (1999)**. Nos margines sont également montrées plus riches en Hy et en Ty par rapport à l'huile d'olive et aux grignons d'olive.

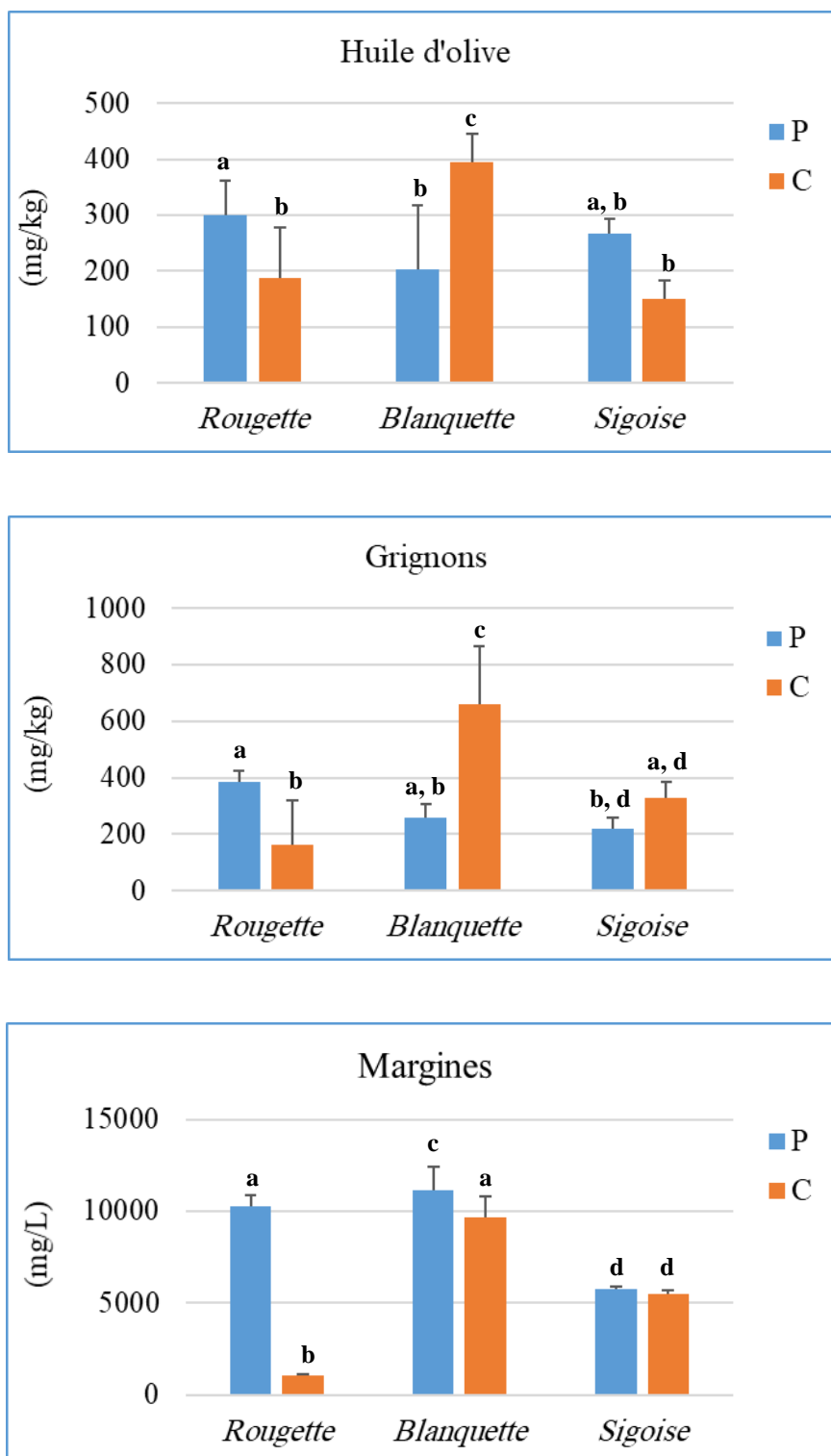


Figure 17 : Polyphénols totaux des produits et sous-produits de l'olivier des variétés *Rougette*, *Blanquette* et *Sigoise*, issus d'un système d'extraction continu (C) ou par presse (P).

Trois échantillons de chaque cultivar ont été analysés en double. Les barres montrent l'écart type. Les mêmes lettres dans les mêmes colonnes ne désignent aucune différence statistiquement significative ($p < 0,05$) selon le test de Duncan.

2.4. Composition phénolique des trois formes des margines

Le profil phénolique des margines ultrafiltrées est quantitativement comparable à celui des margines brutes, avec une récupération totale des CP initialement identifiés (Tab.23)

Un nombre d'extractions égal à cinq, avec un rapport solvant / margines de 1:1 v/v, s'est révélé suffisant pour obtenir une récupération maximale des polyphénols des margines dans plusieurs études (**Lesage-Meessen *et al.*, 2001 ; Della Greca *et al.*, 2004 ; De Marco, *et al.*, 2007**). Cela est en accord avec nos résultats. La caractérisation du profil phénolique de l'extrait d'acétate d'éthyle et des margines épuisées a montré une récupération > 90 % des CP aglycones. Par contre, une perte totale de l'Hy-4-glucoside et du Ty-glucoside. L'hydroxytyrosol-glycol est cependant détecté au niveau des deux phases, l'extrait d'acétate d'éthyle et les margines épuisées, a des concentrations similaires (Tab. 23).

Tableau 23 : Composition phénolique (mg/L) des margines SP brutes, ultra-filtrées, leur extrait phénolique et le SP épuisé.

Composés	SP brutes	SP ultra-filtrées	Extrait SP	SP épuisées
Hy-gly	257,9 ± 00	325 ± 22	132 ± 2	159 ± 8
Hy-1-glu	22,9 ± 4	00	00	00
Hy	427,29 ± 11	465 ± 10	348 ± 2	102 ± 3
Hy-4-glu	1747,69 ± 92	1927 ± 91	54 ± 3	1897 ± 142
Ty-glu	125,29 ± 5	135 ± 1	00	119 ± 9
Ty	41,54 ± 4	54 ± 00	53 ± 2	00
AC	1,07 ± 00	00	00	00
Ester-AC	0,71 ± 0	00	00	00
Coms	1,68 ± 1	00	1 ± 0	00
EDA-like	1252,12 ± 46	1237 ± 13	1118 ± 23	00
AE	1883,75 ± 4	1805 ± 6	1582 ± 15	00
Somme	5761,94 ± 118	5948 ± 129	3288 ± 16	2277 ± 162

Les valeurs sont des moyennes ± l'écart type (n=2)

Il faut noter que l'acidification des margines augmente la solubilité des composés phénoliques dans les solvants organiques (**Obied *et al.*, 2005a**). Cela a été confirmé par **De Marco *et al.* (2007)** en comparant les profils phénoliques d'extraits de margines non-acidifiées et acidifiées. L'échantillon préalablement acidifié est plus riche en PT avec une teneur de 2702 ppm, contre 1150 ppm pour l'extrait des margines brutes.

3. Spectres de masse des composés phénoliques purifiés

L'hydroxytyrosol (Hy), la forme analogue au dialdéhyde du décarboxyméthyl-élénolate (EDA-like) et l'acide élénolique (EA), composés majoritaires des margines brutes SP et leur extrait phénolique (EM-SP), sont purifiés par HPLC analytique.

L'hydroxytyrosol a été étudié par plusieurs auteurs. Cependant très peu de données sont disponibles sur l'EAA et l'EA. A notre connaissance, c'est la première fois que ces deux composés sont identifiés et purifiés à partir des margines monovariétales algériennes. L'identification et la quantification de l'Hy, l'EDA-like et l'EA purifiés sont réalisées par HPLC-MS.

L'Hy ($C_8H_{10}O_2$) est détecté à 280 nm et a exposé un signal à 152 m/z. Par contre, l'EA ($C_{11}H_{13}O_6$) et l'EDA-like ($C_9H_{12}O_4$) sont détectés à 240 nm (Fig. 18).

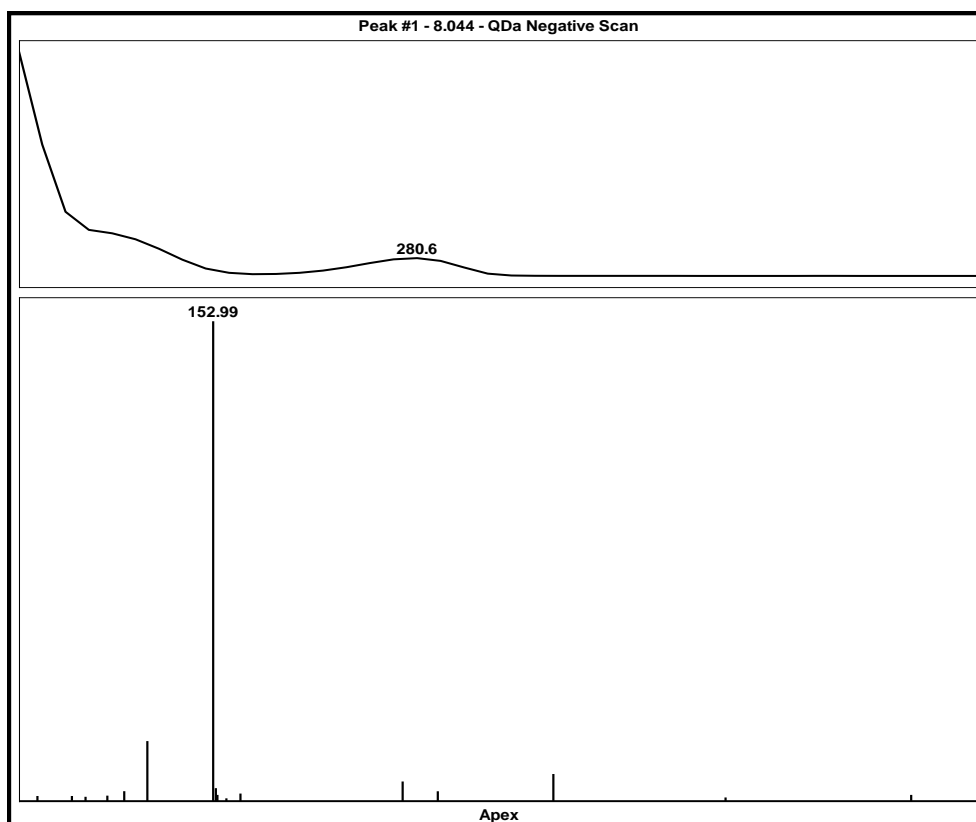


Figure 18 : Spectres UV et spectres de masse, obtenus en mode SCAN, de l'hydroxytyrosol.

L'EA a exposé un signal à 241 m/z (Fig. 19) et l'EDA-like a exposé un signal à 199 m/z (Fig. 20) comme décrit précédemment, pour la première fois, par **Medina *et al.* (2011)**, est caractérisé ensuite comme le E-3-(1-oxobut-2-en-2-yl) acide glutarique par **Rubio-Senen *et al.* (2015b)**. Le spectre de masse de l'EDA-like diffère en un seul atome d'oxygène à celui de l'EDA (m/z 183).

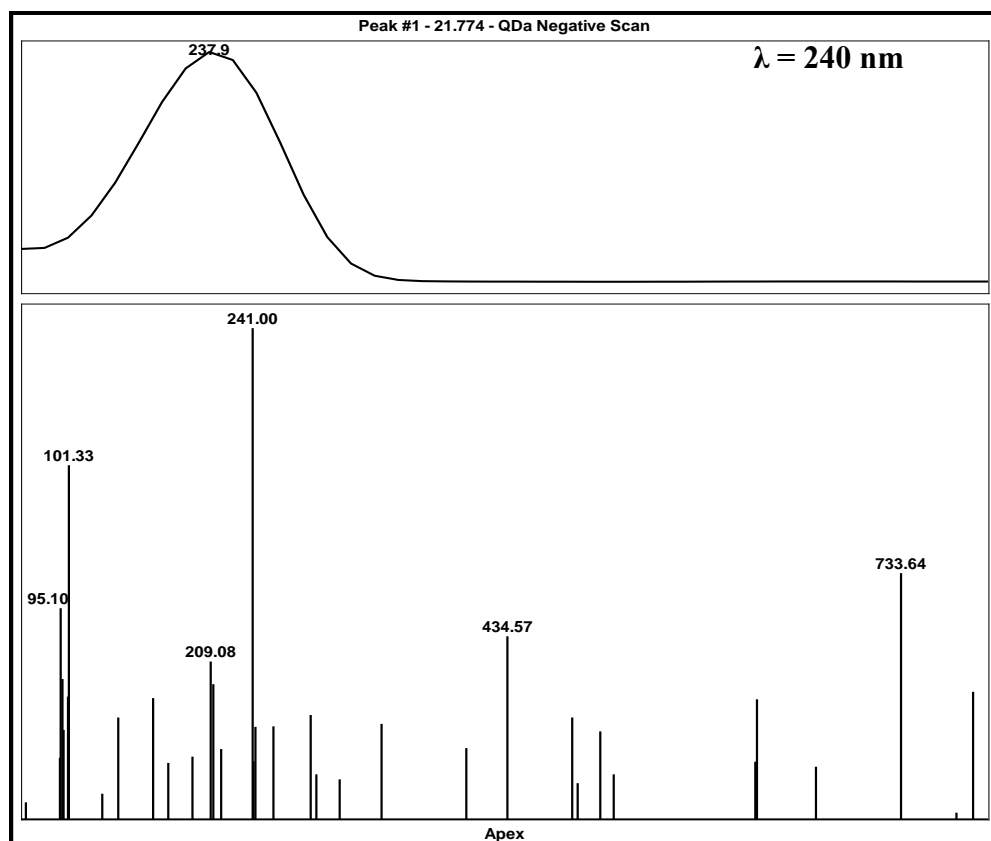


Figure 19 : Spectres UV et spectres de masse, obtenus en mode SCAN, de l'acide élénolique.

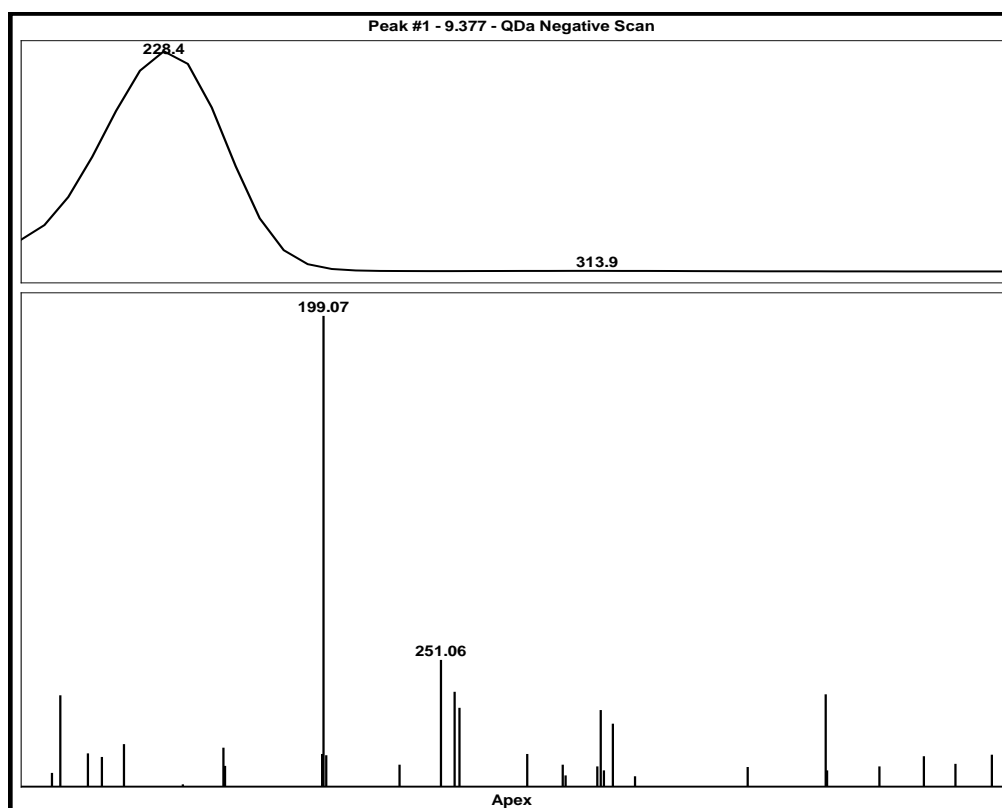


Figure 20 : Spectres UV et spectres de masse, obtenus en mode SCAN, de l'EDA-like.

III. Activité antibactérienne de l'huile d'olive et des margines

Vu la grande résistance des feuilles d'olivier aux attaques microbiennes et d'insectes dans la nature, de nombreuses recherches se sont alors intéressées à l'activité antimicrobienne des composés contenus dans l'huile d'olive et les sous-produits qui résultent de son extraction (**Bisignano *et al.*, 1999**).

Il faut signaler que l'activité antibactérienne des grignons d'olives n'a pas été testée, dans cette étude, vu les faibles quantités disponibles de leurs extraits phénoliques.

1. Effet bactéricide de l'huile d'olive

Trois échantillons d'huile d'olive brutes sont sélectionnés pour l'essai de l'activité antibactérienne contre *E. coli* (CECT 434), *P. fluorescens* (CECT 378), *E. faecalis* (CECT 481) et *S. aureus* (CECT 239) à une seule concentration (100%). Ces espèces, responsables de diverses infections intestinales et urinaires chez les êtres humains, sont couramment utilisées dans les tests antimicrobiens (**European Standard EN 1276, 1997**).

Les trois échantillons sont retenus sur la base de leur concentration respective en PT à savoir : l'huile la plus riche en PT (BC = 452,22 mg/Kg d'huile), contenu moyen en PT (SP = 371,23 mg/Kg) et l'huile à faible teneur en PT (RC = 125,97 mg/Kg) (Tab. 24). La solution PBST utilisée dans cette expérience, sert à augmenter la mixture entre la phase aqueuse (inoculum) et la phase huileuse ce qui assure un bon contact entre la bactérie et l'huile.

Après 30 minutes de contacts avec les souches-test, seule l'huile *Blanquette*, issue d'une extraction à 3-phases (BC) a montré un effet antibactérien contre les bactéries Gram positif (Fig. 21). Cette huile a réduit l'inoculum initial de *S. aureus* et *E. faecalis* de plus de 3 unités logarithmiques (3- Log). Cependant, aucun effet n'est observé contre les bactéries Gram négatifs (*E. coli* et *P. fluorescens*). Les deux autres huiles RC et SP sont inactives vis-à-vis de toutes les souches testées. Comparativement à notre étude, **Laincer *et al.* (2014)** ont eux aussi détecté une bonne activité antimicrobienne des huiles d'olive vierges algériennes contre les Gram positifs (*S. aureus* et *Bacillus subtilis*). Cette activité bactéricide a été attribuée aux composés phénoliques.

Plusieurs travaux de recherche ont signalé le rôle incontestable des composés phénoliques de l'huile d'olive dans l'inhibition d'innombrables bactéries pathogènes (**Radford *et al.*, 1991; Bisignano *et al.*, 1999 ; Keceli et Robinson, 2002; Furneri *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2006; Brenes *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2007**). Cependant cet effet est contesté. Ainsi, dans leur étude, **Medina *et al.* (2006)** ont démontré le potentiel d'inhibition de *Listeria monocytogenes* par les composés phénoliques présents dans l'huile d'olive après une heure de

contact. Dans cette étude, l'utilisation de l'huile d'olive vierge extra dans la préparation de la mayonnaise a réduit le taux *Salmonella enteritidis* de 3-Log par rapport au taux initialement inoculé. Bien que cet effet n'a pas été observé pour d'autres huiles végétales comestibles (maïs, tournesol, soja, colza et coton), vu leur pauvreté en polyphénols. Ces découvertes ont ouvert la possibilité d'utiliser l'huile d'olive vierge extra comme agent de conservation des aliments afin d'empêcher la croissance d'agents pathogènes d'origine alimentaire et retarder l'altération des aliments.

Tableau 24 : Composition phénolique (mg/Kg) des échantillons de l'huile d'olive choisis pour les tests de l'activité antibactérienne.

Composés	RC	BC	SP
Hy	10,93 ± 0,09	5,22 ± 00	9,04 ± 0,68
Hy-gly	00 ± 00	1,04 ± 0,01	2,05 ± 0,33
Hy-EDA	00 ± 00	26,47 ± 0,42	16,01 ± 3,62
Hy-EA	10,72 ± 0,64	99,07 ± 10,47	66,07 ± 2,16
Ty	0,93 ± 0,63	10,66 ± 0,58	19,17 ± 2,27
Ty-EDA	18,01 ± 4,25	38,04 ± 0,54	28,07 ± 0,63
Ty-EA	6,94 ± 0,45	185,32 ± 20,89	142,01 ± 4,06
4-EP	87,70 ± 0,38	00 ± 00	00 ± 00
Pino	51,96 ± 3,31	61,86 ± 0,52	62,12 ± 6,01
1-Acetoxy-pino	15,90 ± 1,49	21,68 ± 1,48	23,89 ± 2,26
Lut	1,91 ± 0,49	2,18 ± 0,21	2,01 ± 0,10
Apig	0,99 ± 0,21	0,71 ± 0,01	0,79 ± 0,02
Somme	125,97 ± 8,08	452,22 ± 34,69	371,23 ± 13,02

Les valeurs sont des moyennes ± l'écart type (n=2)

L'action antimicrobienne des composés de l'huile d'olive a été également étudiée *in-vitro* contre *Helicobacter pylori*, l'agent responsable de la plupart des ulcères peptiques et des cancers gastriques (Romero *et al.*, 2007). Les polyphénols les plus bactéricides étaient l'Hy-EDA et le Ty-EDA. Medina *et al.* (2013) ont signalé que la présence du tyrosol et de l'hydroxytyrosol dans la structure dialdéhydrique de base (EDA) augmente leur caractère lipophile et leur efficacité antibactérienne qui a été supérieure à celles des désinfectants synthétiques.

Les résultats obtenus dans ce travail sont en accord avec les études précédentes, L'huile d'olive (BC) présente les concentrations les plus élevées en dérivés d'oleuropéine (Hy-EDA) et dérivés ligstroside (Ty-EDA) par rapport aux huiles RC et SP (Tab. 24), ce qui explique sa forte activité antibactérienne. (Bergsson *et al.*, 2001) ont, par ailleurs, démontré que les acides gras et les monoglycérides présents dans les olives sont avérés avoir un large spectre d'activité microbicide contre les bactéries et les levures.

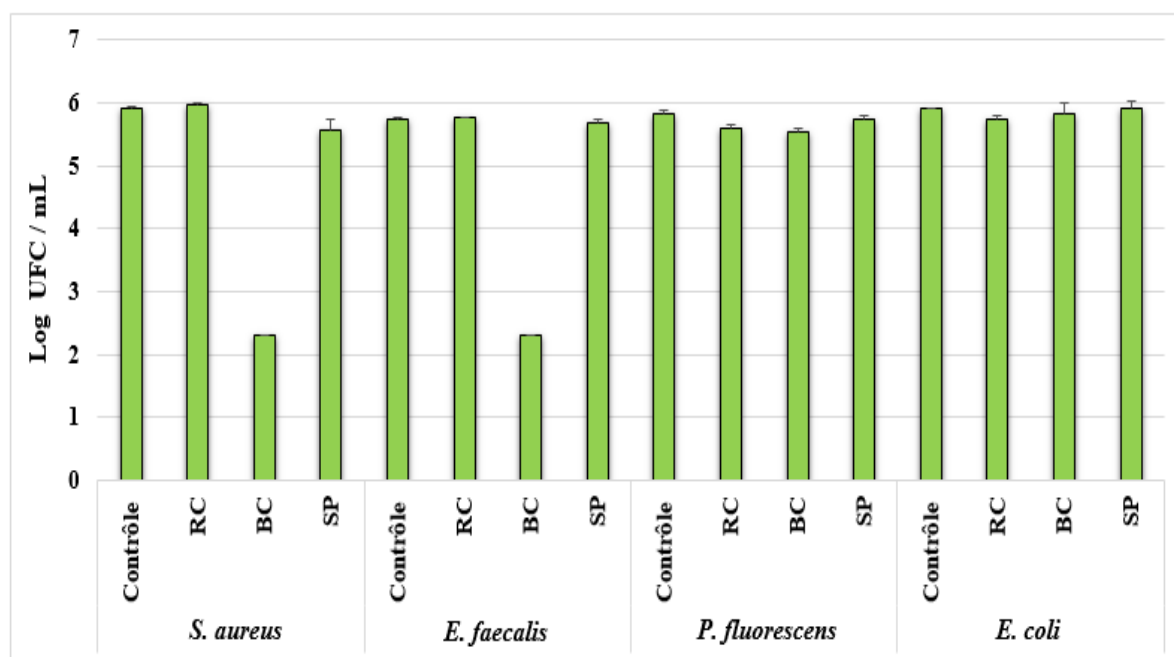


Figure 21 : Effet bactéricide des huiles d'olive RC, BC et SP sur les quatre souches test (les barres représentent l'écart-type).

2. Effet bactéricide des margines brutes

Les propriétés antimicrobiennes des extraits des feuilles d'olivier et de l'huile d'olive ont été étudiées depuis des siècles dans la médecine traditionnelle. Cependant, ces propriétés ont été que récemment exploitées pour les sous-produits de l'olivier (grignons et margines). Nombreuses études ont mis en évidence l'activité antimicrobienne des polyphénols des margines dans les pays du bassin méditerranéen (Obeid *et al.*, 2007b ; Ozedmir, 2009 ; Vegelas *et al.*, 2010 ; Krid *et al.*, 2011; Tafesh *et al.*, 2011; Larif *et al.*, 2015 ; Lefouidi *et al.*, 2015 ; Rubio Senent *et al.*, 2015 ; Roila *et al.*, 2016 ; Senani *et al.*, 2018). Mais, à notre connaissance, aucun travail n'a déjà testé l'effet antibactérien des margines brutes monovariétales générées par les huileries algériennes. En outre, la plupart des études sur l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques des margines ont porté sur des applications

agronomiques ou environnementales. Néanmoins, cette activité a été rarement testée contre les agents pathogènes de l'Homme (Leouifoudi *et al.*, 2015).

Trois échantillons de margines brutes sont sélectionnés pour les tests de l'activité antibactérienne en fonction de leurs concentrations en polyphénols totaux. Il s'agit des margines (BC) de la variété *Blanquette* qui ont montré la plus haute teneur en composés phénoliques (10 828 mg /L), soit dix fois plus que les margines RC de la variété *Rougette* (1096 mg / L), les deux ont été obtenus par un système d'extraction d'huile d'olive en continu à trois phases et, enfin, les margines (SP) de la variété *Sigoise* générées par un système traditionnel à pression (SP), qui ont montré une concentration intermédiaire en polyphénols totaux (5762 mg /L) (Tab. 25). Selon Yakoub *et al.* (2010) ont démontré que les composés phénoliques à pH acide exercent un effet antimicrobien. De ce fait, les pH des margines à tester ont été ajusté à 5,5 le jour de l'expérience.

Tableau 25 : Composition phénolique (mg/L) des trois margines brutes choisies pour les tests de l'activité antibactérienne.

Composés	RC	BC	SP
Hy-gly	149,81 ± 21,49	230,34 ± 3,69	257,9 ± 00
Hy-1-glu	27,29 ± 04,66	23,75 ± 0,41	22,9 ± 41
Hy	108,22 ± 05,36	1408,77 ± 62,78	427,29 ± 11
Hy-4-glu	210,89 ± 10,71	3150,03 ± 72,82	1747,69 ± 92
Ty-glu	32,77 ± 03,25	265,34 ± 2,10	125,29 ± 5
Ty	14,23 ± 02,87	75,90 ± 7,28	41,54 ± 4
AC	00 ± 00	3,54 ± 1,07	1,07 ± 07
Ester-AC	00 ± 00	1,44 ± 0,11	0,71 ± 0,14
Coms	00 ± 00	1,11 ± 0,65	1,68 ± 1,05
EDA-like	465,10 ± 31,25	3828,24 ± 359,23	1252,12 ± 46
AE	87,50 ± 02,12	1840,04 ± 131,15	1883,75 ± 04
Somme	1095,82 ± 60,30	10828,53 ± 344,18	5761,94 ± 118

Les valeurs sont des moyennes ± l'écart type (n=2)

Six dilutions des trois échantillons de margines (RC, BC et SP) stérilisées par filtration (0,22 µm) sont inoculées avec une population d'environ 10⁶ UFC/mL des quatre souches bactériennes sélectionnées *E. coli* (CECT 434), *P. fluorescens* (CECT 378), *E. faecalis* (CECT 481) et *S. aureus* (CECT 239). Un contrôle négatif de l'eau distillée stérile à pH 5,5 est également testé pour chaque bactérie. Les concentrations minimales bactéricides (CMB)

sont déterminées en dénombrant les survivants après 24 heures d'incubation (**Brenes et al., 2011; Medina et al., 2011; Rubio-senent et al., 2015b**).

La plupart des extraits de plantes montrent une activité contre les bactéries à Gram positif, mais l'activité contre les Gram négatif et les champignons est un véritable succès (**Obeid et al., 2007b**). Nos margines brutes testées, *in-vitro*, ont montré un très bon effet bactéricide à large spectre, après seulement 30 minutes de contact avec les souches test (Tab. 26).

L'activité antibactérienne la plus élevée correspond aux margines BC qui présentent également le contenu phénolique le plus élevé. Cet échantillon a réduit 3 unités logarithmiques la croissance des bactéries Gram négatif (*E. coli* et *P. fluorescens*) pour une concentration en polyphénols totaux de 2,5%, soit 270 mg/L. Aucune pousse bactérienne n'est, également, observée chez les bactéries Gram positifs (*S. aureus* et *E. faecalis*) pour la même concentration (Fig. 22). Les différentes activités contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif peuvent être rationalisées en considérant les différences de composition de la paroi cellulaire. Les bactéries à Gram négatif ont un composant lipopolysaccharide dans leur membrane externe qui les rend plus résistantes aux composés antibactériens (**Obeid et al., 2007b**).

Les margines SP, qui présentent un taux moyen en PT, ont par contre montré une CMB de 10% pour *E. coli* et une CMB de 5% (288 mg/L) pour le reste des souches (*S. aureus*, *E. faecalis* et *P. fluorescens*) (Fig. 23). Une même tendance est observée pour un extrait phénolique de margine issu d'une variété italienne *Moraiolo*. Cet extrait était également très actif contre *P. fluorescens*, agent responsable de l'altération de la Mozzarella avec une CMB de 8 mg/mL (**Roila et al., 2016**). Enfin, l'activité la plus faible est observée pour les margines RC pauvres en PT avec une CMB de 60% pour *S. aureus* et *E. coli* et une CMB de 80% pour *P. fluorescens*. Aucune inhibition n'a été cependant observée contre *E. faecalis* pour ces mêmes concentrations (Fig. 24).

La qualité microbiologique des margines a été étudiée par plusieurs auteurs. L'absence de bactéries pathogènes dans ces effluents oléicoles peut expliquer leur capacité à inhiber la croissance des bactéries (**Esmail et al., 2015**). L'activité antibactérienne mis en évidence pour nos margines est en corrélation avec la teneur en polyphénols totaux trouvée dans chaque échantillon ($R^2 = - 0,87$).

Plusieurs études ont montré l'effet antimicrobien des extraits phénoliques des margines, mais très peu de chercheurs ont testé les margines à l'état brut, sans extraction

préalable. **Capasso et al. (1995)** ont montré que les margines fraîches avaient un très fort effet bactéricide, à leur concentration initiale, sur *Pseudomonas syringae* et *Corynebacterium michiganense*, deux bactéries phyto-pathogènes. Les margines brutes étudiées par **Esmail et al. (2015)** étaient également actifs sur *S. aureus* et *E. coli* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0,125 mg/ml. Enfin, pour des margines tunisiennes brutes, stockées durant six mois en obscurité et à température ambiante, il a été enregistré une CMB de 10% contre *Pseudomonas savastanoi*, l'agent causal du chancre de l'olivier (**Krid et al., 2011**).

Nos margines brutes étudiées ont montré un effet bactéricide remarquable à très petites concentrations. Ces résultats sont très intéressants et suggèrent l'utilisation des margines micro-filtrées et diluées comme désinfectants. Les coûts élevés des technologies d'extraction des polyphénols sont par conséquent évités.

Tableau 26 : Les concentrations minimales bactéricides des margines brutes (RC, BC et SP) sur les quatre souches test.

Margines	CMB (%)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>
RC	60%	> 80%	60%	80%
SP	5%	5%	10%	5%
BC	2,5%	2,5%	2,5%	2,5%

L'action antimicrobienne des composés phénoliques est liée à leur capacité à perturber l'intégrité de la paroi bactérienne en se liant au peptidoglycane (**Yoda et al., 2004**). Plusieurs autres mécanismes d'inhibition des bactéries ont été décrits tels que la production de peroxyde d'hydrogène lors de l'auto-oxydation des tanins et les effets mutagènes sur l'ADN bactérien (**Smith et al., 2003; In Krid 2011**). Alors que, la plupart des effets pharmacologiques des polyphénols sont principalement dus à leur groupe phénolique. En fait, la localisation et le nombre de groupes hydroxyle sur les composés phénoliques augmentent leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Falleh et al., 2008**).

Enfin, il faut signaler que les margines brutes et leurs extraits phénoliques sont avérés inactifs contre la plupart des champignons (**Obeid et al., 2007b; Esmail et al., 2015**). Cela n'est pas exceptionnel, car l'activité antifongique exige une hydrophobicité importante (caractère lipophile) alors que les biophénols des margines sont essentiellement hydrophiles car les composants lipophiles passent dans l'huile d'olive au cours de la trituration des olives (**Obeid et al., 2007b**).

3. Effet bactéricide des margines ultra-filtrées sur *S. aureus*

De nombreux chercheurs ont indiqué que les composés phénoliques sont les principales substances antimicrobiennes chez les olives et les margines, bien qu'il soit controversé d'attribuer cette bio-activité à un composé spécifique ou à la fraction polymérique de ce liquide. En effet, les eaux de végétation des olives sont caractérisées par une composition chimique complexe. Elles sont principalement constituées de polysaccharides, de lipides, de protéines et de composés phénoliques (Vegelas *et al.*, 2010).

Nous avons, en premier lieu, essayé d'éliminer l'activité antibactérienne possible des hauts polymères présents dans les margines par le test de l'activité antibactérienne des margines SP ultra-filtrées, à travers une membrane de cellulose de la taille des pores de 3000 Da, sur *S. aureus* CECT 239. Les résultats sont présentés sur la figure 25. Il est à noter que les margines SP brutes ont présenté un effet presque similaire sur les quatre souches bactériennes étudiées. *S. aureus* a été donc choisie, au hasard, comme bactérie test pour le reste des expériences de l'activité antibactérienne.

Après 30 minutes de contact, les margines ultra-filtrées ont exercé la même activité que les margines brutes sur *S. aureus*, avec une CMB de 5%. Cela confirme que l'activité bactéricide des margines est due à des composés de faible masse moléculaire (< 3000 Da). Bien que, certaines études ont attribué cette activité à des composés de masse moléculaire élevée présents dans les produits dérivés des olives (Sayadi *et al.*, 2000).

4. Effet bactéricide de l'extrait phénolique des margines et des margines épuisées sur *S. aureus*

Afin d'élucider les composés responsables de cette activité antibactérienne, les margines SP ont subi une extraction par épuisement à l'acétate l'éthyle. L'extrait phénolique obtenu et les margines épuisés sont inoculés avec *S. aureus* CECT 239. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 25. A notre surprise, l'extrait d'acétate d'éthyle n'a réduit que de 2-Log la croissance de *S. aureus* pour à une concentration de 5%. Quant à la CMB, elle est atteinte pour une concentration de 10%. Ces résultats sont conformes avec les travaux de Moreno *et al.* (1989) et Esmail *et al.* (2015). Ces auteurs ont également noté que les extraits phénoliques des margines sont moins actifs que les margines brutes. En revanche dans un autre travail publié par Senani-Oularbi *et al.* (2018), l'extrait phénolique s'est avéré plus actif sur *Aspergillus flavus* comparativement aux margines brutes.

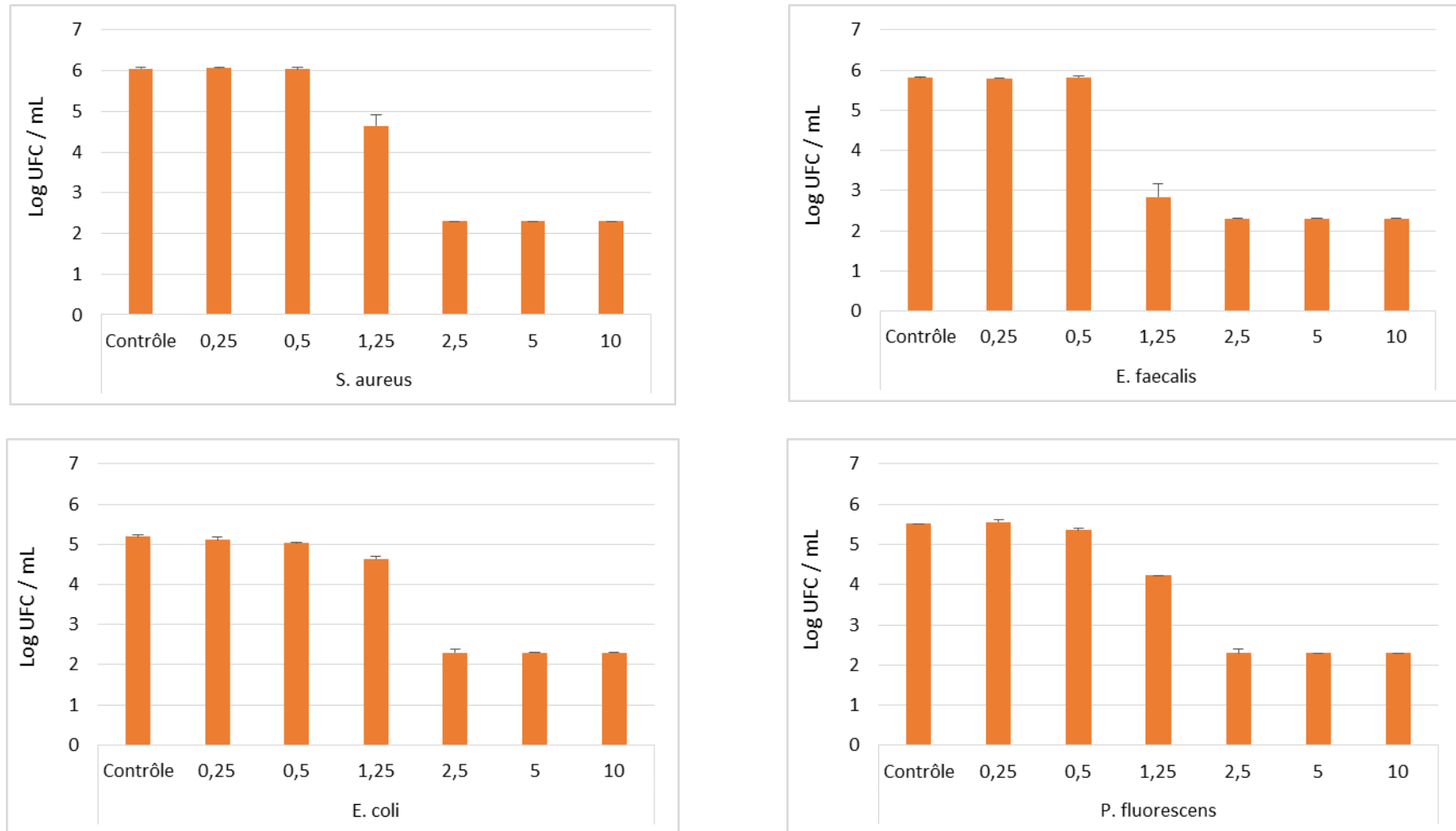


Figure 22 : Effet bactéricide des margines brutes BC sur les quatre souches test, après 30 min de contact (les barres représentent l'écart-type).

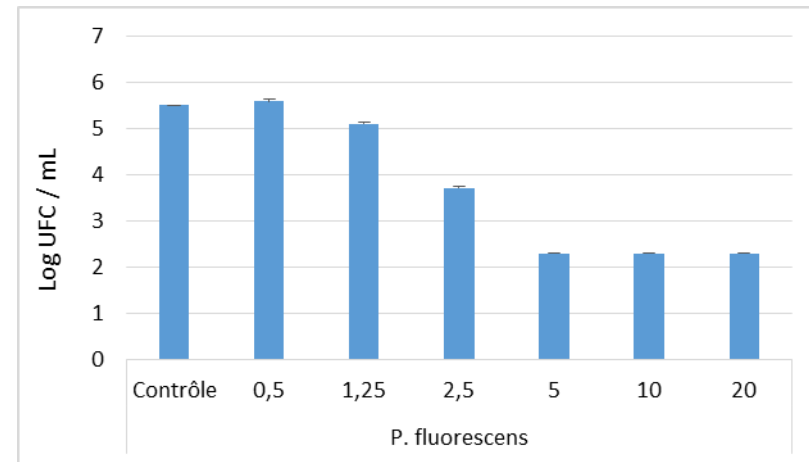
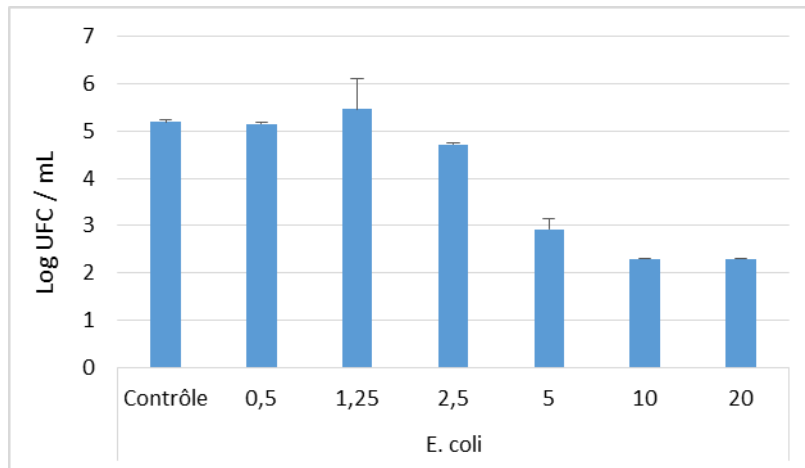
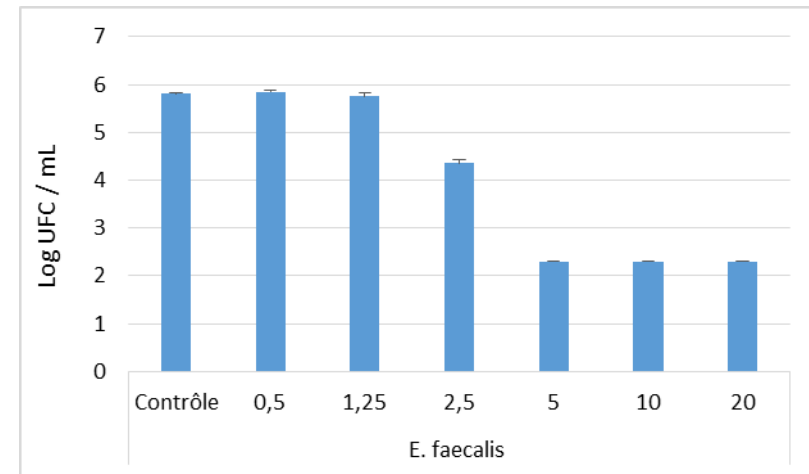
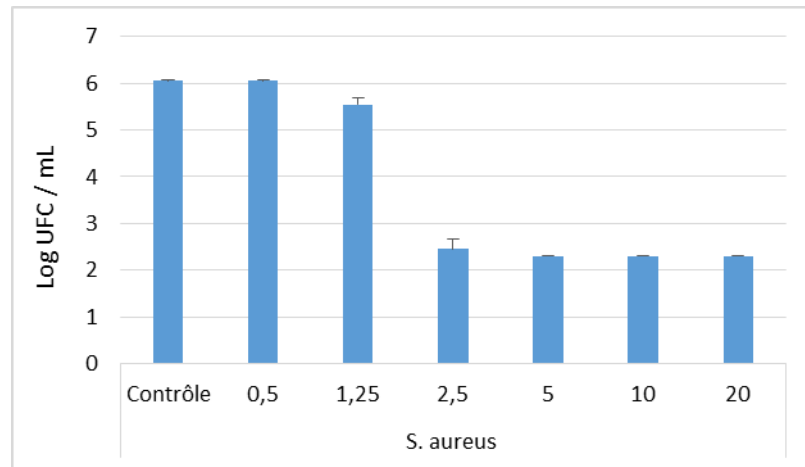


Figure 23 : Effet bactéricide des margines brutes SP sur les quatre souches test, après 30 min de contact (les barres représentent l'écart-type).

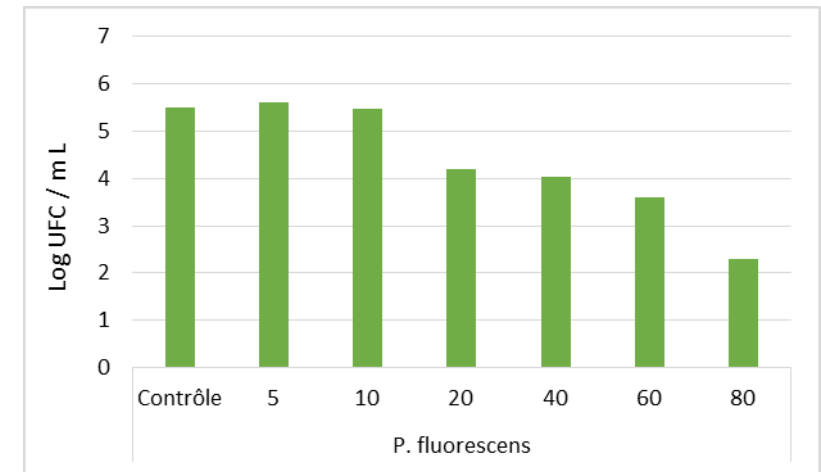
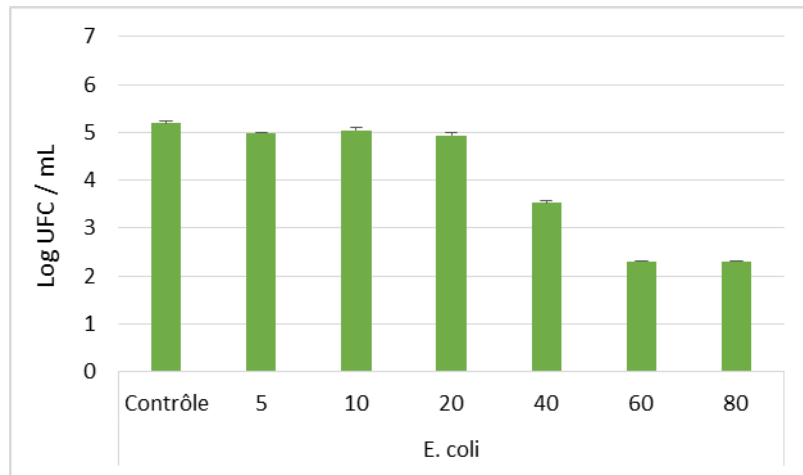
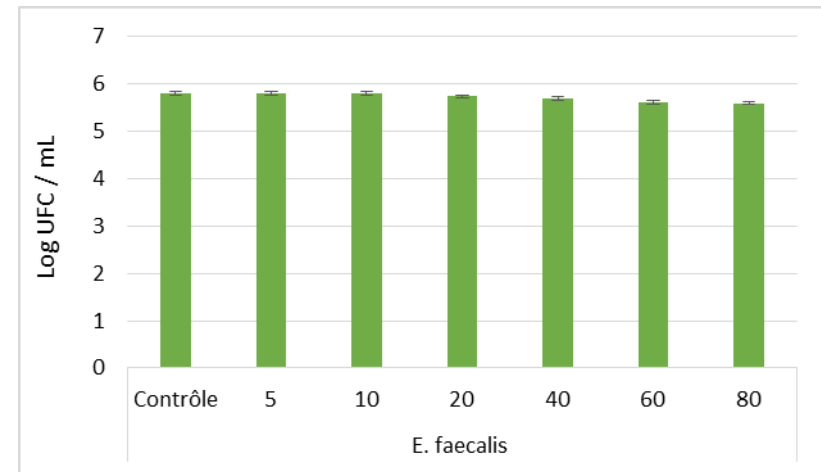
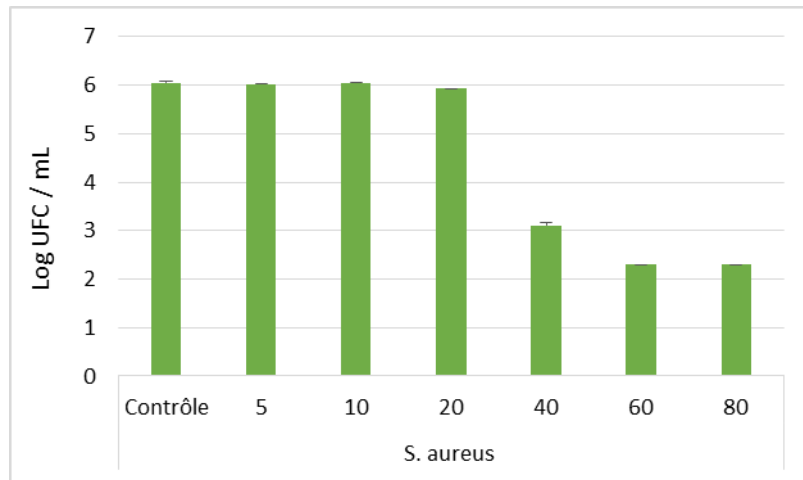


Figure 24 : Effet bactéricide des margines brutes RC sur les quatre souches test, après 30 min de contact (les barres représentent l'écart-type).

De même, l'effet antibactérien d'extraits phénoliques de margines marocaines sur *S. aureus*, en utilisant la technique de diffusion en gélose, est également signalé par **Larif *et al.* (2015)** et **Leouifoudi *et al.* (2015)**. Ces discordances pourraient être attribuées à la composition chimique de l'extrait qui influence son activité bactéricide (**Roila *et al.*, 2016**).

Il est important de signaler que les margines épuisées ont permis de réduire 3-Log UFC/mL de *S. aureus* à une concentration de 40%, malgré leur faible teneur en PT. Durant l'extraction, certains CP comme l'hydroxyrosol, l'EDA et l'EA diffusent dans l'extrait d'acétate d'éthyle. Par conséquent, l'activité antibactérienne de l'extrait augmente et celle des margines épuisées diminue. Ces trois composés sont susceptibles d'être responsables de l'effet bactéricide de nos margines.

Les phénols glucosylés (Hy-4-glu et Ty-glu) perdus durant l'extraction à l'acétate d'éthyle participent probablement aussi à l'effet bactéricide, cela est justifié par l'effet antibactérien exercé par les margines épuisées contre *S. aureus*.

Il faut rappeler que les échantillons de l'huile d'olive ont exercé un effet bactéricide très limité par rapport aux margines brutes et leur extrait phénolique. Cela est justifié par la teneur très élevée en composés phénoliques des margines. La récupération de ces polyphénol offre la double opportunité d'obtenir des biomolécules à haute valeur additive d'un côté et de réduire la toxicité de ces effluents d'un autre côté (**El Abbassi *et al.*, 2012**).

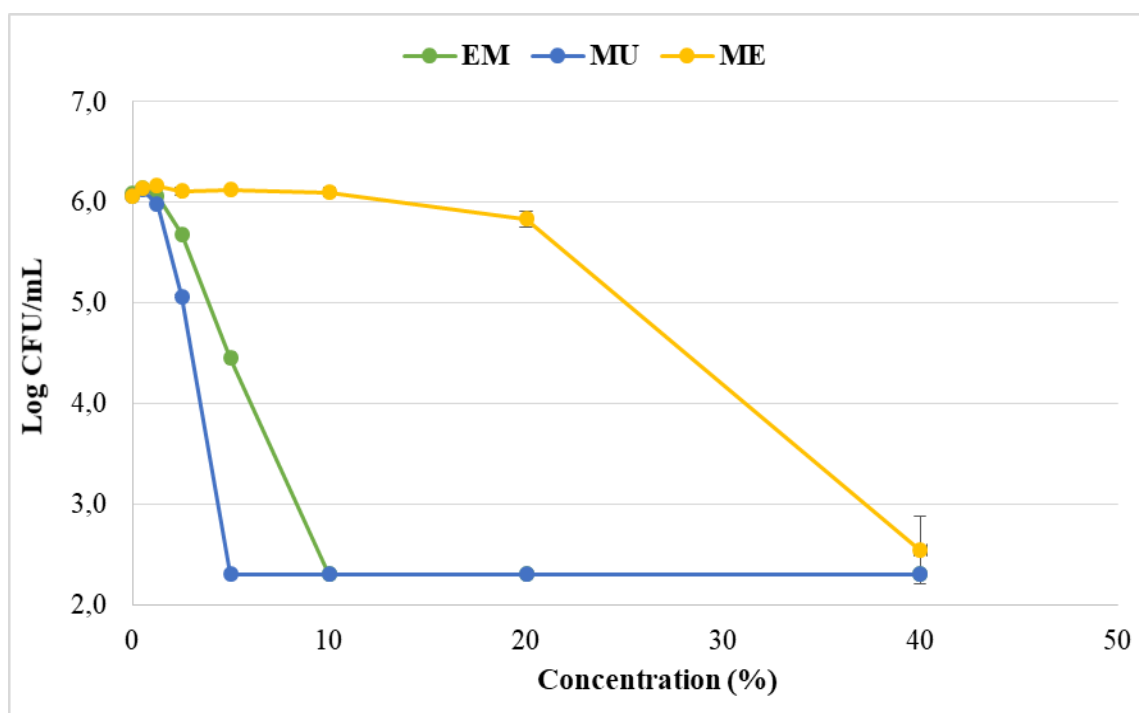


Figure 25 : Effet bactéricide des margines ultrafiltrées (MU), extrait de margines (EM) et les margines épuisées (ME) sur *S. aureus* (les barres représentent l'écart-type).

5. Effet bactéricide des composés phénoliques purifiés sur *S. aureus*

L'activité antimicrobienne des margines a été largement étudiée et nombreux composés ont été attribués comme responsables, mais aucun composé individuel n'explique cette bioactivité par lui-même. **Capasso *et al.* (1995)** ont proposé le méthylcatéchol en tant que substance antimicrobienne principale des margines, les acides phénoliques (l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique et l'acide 4-hydroxybenzoïque) (**Aziz *et al.*, 1998**), le tyrosol (**Del Rio *et al.*, 2003**), les flavonoïdes (lutéoline et quercétine) (**Baidez *et al.*, 2007**) et l'oleuropéine (**Korukluoglu *et al.*, 2008**). Un extrait phénolique de margines très riche en hydroxytyrosol a montré une puissante activité antifongique et antibactérienne contre les agents phyto-pathogènes (**Yangui *et al.*, 2009**). Cependant, il a été récemment démontré que les substances bactéricides les plus puissantes dans les produits et les sous-produits oléicoles sont des composés analogues au glutaraldéhyde tels que le Hy-EDA, le Ty-EDA et l'EDA (**Medina *et al.*, 2009**).

Dans cette étude, l'hydroxytyrosol, l'EDA-like et l'acide élénolique purifiés, ont été récupérés dans une solution d'acide acétique (1,2%, pH = 5) afin d'ajuster leur pH qui doit être acide à cause de la phase mobile qui contient l'HCl. Les trois composés sont ensuite testés individuellement à différentes concentrations contre *S. aureus* (Tab. 27). Un mélange des trois composés a été également testé sur la même souche. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 26. Les deux contrôles négatifs, eau distillée stérile et la solution tampon, n'ont montré aucun effet sur *S. aureus*.

Tableau 27 : Gamme des concentrations des composés purifiés testées contre *S. aureus*.

mg/L	20%	10%	5%	2,50%
Hy	68,82	31,41	15,7	7,85
EDA-like	149,6	74,8	37,4	18,7
EA	320	160	80	40

L'hydroxytyrosol n'a montré aucune activité contre *S. aureus*, Ces résultats négatifs n'indiquent pas automatiquement l'absence de l'activité, mais ceci pourrait être dû aux faibles concentrations testées. L'hydroxytyrosol était aussi inactif contre les bactéries lactiques, par contre, il a réussi à inhiber la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* et de *Enterococcus faecium* à une concentration de 5,2 mM et a présenté une activité considérable contre *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* et *Escherichia coli* (**Medina *et al.*, 2007**).

Bien qu'il a inhibé la croissance de quatre espèces de bactéries lactiques (**Fleming et al., 1973**), l'acide élénolique était également inactif contre *S. aureus* aux concentrations testées. En revanche, l'EDA-like, à une concentration de 150 mg/L, a réduit 3 unités logarithmiques de la population de *S. aureus* (Fig. 26). Cette concentration correspond au contenu d'EDA-like dans l'extrait phénolique des margines SP diluées à environ 13%. Cette activité antibactérienne est, par conséquent, en accord avec la CMB de l'extrait d'acétate d'éthyle (10 %). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par **Medina et al. (2007)** où L'EDA-like, purifié à partir des saumures d'olives de table, a exercé une activité antibactérienne puissante contre plusieurs bactéries et champignons phyto-pathogènes comparativement à l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol. L'EDA, purifié à partir d'un extrait phénolique d'alperujo, a également réduit la population de *Pseudomonas syringae* de plus de 4-Log à une concentration de 18 mg/mL (**Rubio-Senent et al., 2015a**). La présence d'une structure dialdéhydique dans la molécule de l'EDA, lui confère une forte activité antimicrobienne, qui est similaire à celle des biocides glutaraldéhydes commerciaux. Ces derniers sont capables de dénaturer la paroi des bactéries ou d'inhiber la synthèse de leurs acides nucléiques (**Medina et al., 2008**).

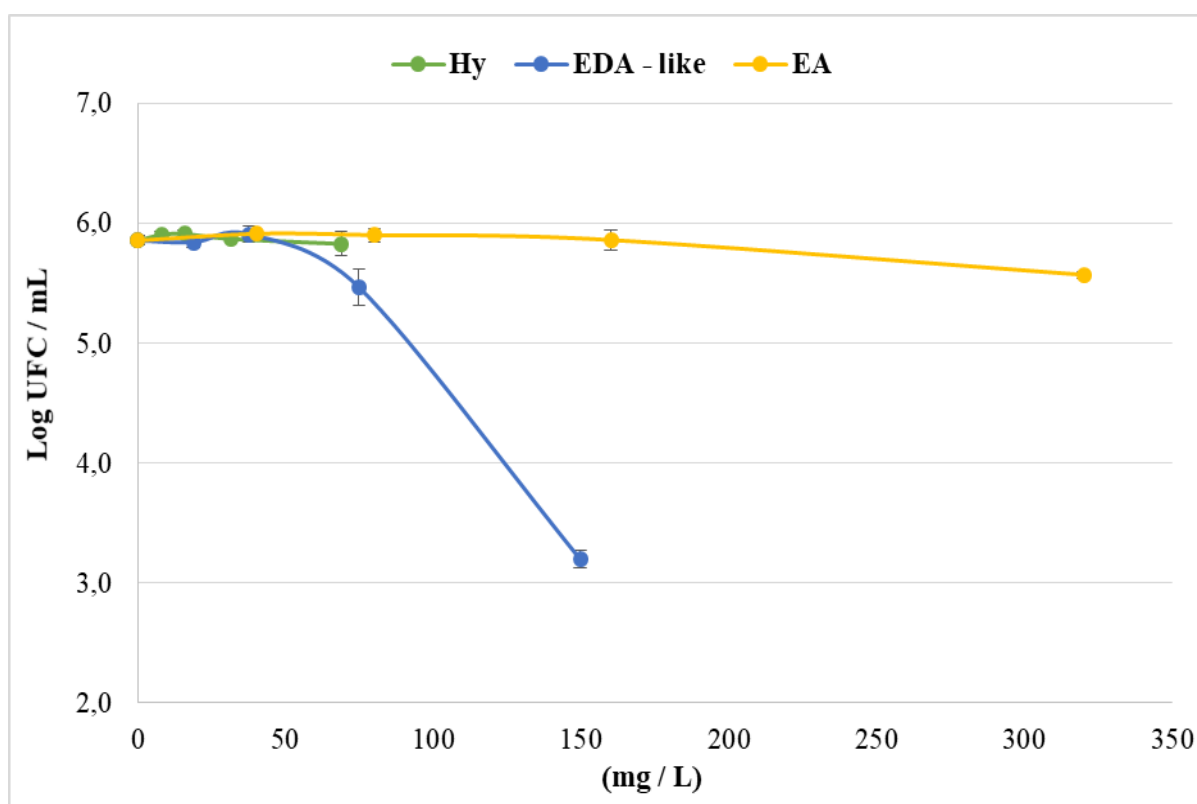


Figure 26 : Effet bactéricide des composés purifiés (Hy, EDA-like et AE) sur *S. aureus* (les barres représentent l'écart-type).

En résumé, il a été démontré dans cette étude que le principal composé antimicrobiens dans nos margines est la forme analogue au dialdéhyde du décarboxyméthyl-élénolate (EDA-like). Les inhibiteurs traditionnels (oleuropéine, oleuropéine-aglycone, hydroxytyrosol et l'acide élénolique) sont inefficaces ou absents dans nos échantillons. L'EDA-like est présent en très fortes concentrations dans nos margines, ce qui fait d'elles une excellent source d'agents antimicrobiens.

D'après **Nychas *et al.* (1990)** et **Sousa *et al.* (2006)**, l'activité et le mode d'action des polyphénols dépendent de leur concentration. Il faut noter que le mélange des trois composés (Hy, EDA-like et EA) à 10% a montré une action inhibitrice contre *S. aureus*, cela est traduit par une apparition de quelques colonies, avec un aspect étrange, après 48h d'incubation. **Della Greca *et al.* (2001)** ont également signalé une modification de la forme et de la couleur des cellules d'algues quatre jours après leur exposition aux margines. Le mélange n'a, malheureusement, pas été testé à une concentration de 20% à cause des très faibles quantités disponibles des composés purifiés.

L'activité biologique d'un composé peut se modifier en présence d'autres molécules (**Larif *et al.*, 2015**). Plusieurs auteurs ont constaté que l'effet bactéricide des sous-produits oléicoles est dû à l'action synergique des composés phénoliques de faible masse moléculaire. La plupart des phénols testés individuellement (hydroxytyrosol, ses formes glucosylées, l'Hyglycol, EDA-like, lutéoline et oleuropéine) n'étaient pas efficaces ou ont montré une activité plus limitée par rapport aux extraits (**Medina *et al.*, 2007; Obeid *et al.*, 2007; Tafesh *et al.*, 2011**).

Cela est en parfait accord avec nos résultats. Ainsi, nos margines brutes ou leurs extraits phénoliques pourraient être plus utiles que leurs CP séparés. Bien entendu, ces résultats préliminaires, *in vitro*, doivent être confirmés *in vivo*, en prenant notamment en considération les études sur la toxicité exercée par les margines sur l'homme, les animaux et les végétaux.



Conclusion
Et
Perspectives

Conclusion et perspectives

Les objectifs de ce travail consistent à une valorisation des produits et des sous-produits oléicoles algériens à travers la caractérisation de leur fraction phénolique par rapport à la variété et au système de trituration des olives, et enfin, l'évaluation de l'activité antibactérienne de leurs polyphénols.

Concernant les résultats relatifs à l'influence de la variété et le système de trituration des olives sur la teneur en polyphénols totaux des échantillons analysés, nous avons pu retenir les constatations suivantes :

- Des différences significatives entre les deux procédés d'extraction étudiés (continu à trois phases et discontinu à presse) ont été observé pour les échantillons de l'huile d'olive, des grignons et des margines des variétés *Blanquette* et *Rougette*. Cependant, aucune différence concluante n'a été remarquée pour la variété *Sigoise*.
- La variété *Blanquette* contient des teneurs appréciables en composés phénoliques et s'avère intéressante pour une bonne valorisation agronomique (expansion des surfaces de ces plantations) ;
- Les concentrations phénoliques les plus élevées ont été enregistrées pour les margines, qui sont dix fois plus riches en PT (1091,19 à 12484,10 mg/L) que les grignons d'olives (59,02 à 820,26 mg/Kg) et 30 fois plus riches que l'huile d'olive (62,69 à 452,22 mg/Kg).

L'analyse qualitative des produits et des sous-produits de l'olivier étudiés a permis l'identification de 24 composés phénoliques. Ces composés appartiennent à cinq classes phénoliques, à savoir les alcools phénoliques, les acides phénoliques, les lignanes, les flavonoïdes et les sécoiridoïdes et leurs dérivés ;

Les profils phénoliques des huiles d'olives analysées sont qualitativement et quantitativement différents de ceux des grignons et des margines. Les extraits de l'huile sont pauvres en acides et en alcools phénoliques, mais plutôt riches en lignanes (Pinorésinol et 1-acétoxy-pinorésinol), en séco-iridoïdes aglycones (Hy-EA, Ty-EA) et leurs dérivés (Hy-EDA, Ty-EDA) ; les extraits phénoliques des grignons sont plutôt riches en formes conjuguées de l'hydroxytyrosol (Hy-1-glu, Hy-4-glu, Hy-EDA) et en flavonoïdes (Rutine, lutéoline, lutéoline-7-glu); Quant aux margines brutes, elles sont riches en acide élénolique, en EDA-like, en Hy-4-glu et en hydroxytyrosol.

L'hydroxytyrosol et le tyrosol sont détectés dans les trois types d'échantillons analysés (huile, grignons, margines) avec des concentrations variables. Ces phénols simples résultent de la bioconversion (hydrolyse) de l'oleuropéine et du ligstroside qui sont les deux bio-phénols majeurs des olives.

L'acidification et le stockage des margines favorisent l'hydrolyse totale des composés phénoliques complexes (séco-iridoïdes et leurs dérivés) en monomères phénoliques comme l'Hy, le Ty, l'EDA et l'AE.

En ce qui concerne le volet de l'évaluation de l'activité antibactérienne des margines et des huiles d'olive *in vitro*, il s'avère que l'effet bactéricide varie considérablement en fonction de la nature et de la concentration en polyphénols de l'échantillon testé, qui sont eux même fonction de la variété et du procédé de trituration. A notre connaissance, ce travail présente la première étude de l'activité antibactérienne des margines brutes monovariétales, générées par les huileries algériennes. Dans ce contexte, les résultats de cette étude indiquent clairement l'effet bactéricide de l'huile d'olive par rapport aux margines brutes. Cela est justifié par l'importante charge phénolique margines.

L'activité antibactérienne observée pour l'huile obtenue de la variété *Blanquette* est probablement engendré par les acides gras.

Les margines brutes ont, cependant, montré un très bon effet bactéricide à large spectre Cette activité antibactérienne est en parfaite corrélation avec la teneur en polyphénols totaux trouvée dans chaque échantillon. Les polyphénols constituent les composés responsables de cet effet bactéricide. Cela est confirmé par le test des margines ultrafiltrées et leur extrait phénolique contre *S. aureus*. Les margines ultrafiltrées ont présenté une CMB similaire à celle des margines non-filtrées. Alors que, l'extrait phénolique des margines s'avère moins actif par rapport aux margines brutes. Ces résultats sont intéressants et suggèrent l'utilisation des margines brutes, micro-filtrées et diluées comme désinfectants. Cette proposition découle de certaines pratiques observés dans la région de la Kabylie où les mammites des vaches sont traitées par application directe des margines brutes.

Nos margines et nos huiles d'olive semblent avoir une meilleure activité à l'égard des bactéries Gram positif que sur les Gram négatif. Cette résistance est probablement due à l'architecture de la bicouche lipidique des bactéries Gram négatif qui constitue une barrière pour les polyphénols.

Parmi les trois composés phénoliques majoritaires et purifiés de l'extrait des margines, seul l'EDA-like a inhibé la croissance de *S. aureus* (150 mg/L). Ainsi, le principal composé antibactérien des margines étudiées est la forme dialdéhyde du décarboxyméthyl-élénolate

(EDA-like). La structure dialdehydique de ce composé lui confère une forte activité antimicrobienne similaire à celle des biocides glutaraldéhydes commerciaux. En outre, il faut signaler que c'est la première fois que ce composé est identifié et purifié à partir des margines algériennes.

Dans l'ensemble, les margines issus des huileries algériennes constituent une source précieuse de bio-phénols naturels, doués d'une activité antibactérienne remarquable, pouvant servir dans l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire ou en agriculture. La récupération de ces polyphénol offre la double opportunité d'obtenir des biomolécules à haute valeur additive d'un côté, et de réduire le caractère polluant des margines d'un autre côté.

Dans des travaux futurs, nous essayerons :

- d'étaler le travail de la caractérisation de la fraction phénolique des margines à l'ensemble des variétés du verger oléicole algérien et la réétudier sur plusieurs saisons ;
- d'élargir le panel de l'activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo* ;
- d'étudier l'éventuelle toxicité exercée par les margines sur les animaux, les végétaux et l'homme.



Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

Abu Reidah I.M. (2013) Characterization of phenolic compounds in highly-consumed vegetable matrices by using advanced analytical techniques. *Thèse de Doctorat, université Granada (Espagne)*, 255p.

Achak M., Ouazzani N., Mandi L. (2009) Traitement des margines d'une huilerie moderne par infiltration-percolation sur un filtre à sable. *Revue des sciences de l'eau, Journal of Water Science*; 22: 421-433.

Aggoun-Arhab M. (2016) Caractérisation de la composition en microconstituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière. *Thèse de Doctorat, Université Frères Mentouri-Constantine (INATAA)*, 144p.

Aggoun M., Arhab R., Cornu A., Portelli J., Barkat M., Graulet B. (2016) Olive mill wastewater microconstituants composition according to olive variety and extraction process. *Food Chemistry*; 209: 72–80.

Ahmed L. (2016) Récolte d'olives à Guelma : Accroissement spectaculaire de plus de 300%. *Le Maghreb. Le quotidien de l'économie*, publié le 27-02-2016.

Aissam H. (2003) Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. *Thèse de Doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah (Fes, Maroc)*, 156p.

Ait Allouache Kafia (2018) Oléiculture : Les ambitions de l'Algérie. El Moudjahid. Quotidien national d'informations.

Aldini G., Piccoli A., Beretta G., Morazzoni P., Riva A., Marinello C. et al. (2006) Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. *Coratina*. *Fitoterapia*; 2: 121-128.

Allouche N., Fki I., Sayadi S. (2004) Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric Food Chem*; 52 (2): 267–73.

Alu'datt M.H., Alli I., Ereifej K., Alhamad M., Al-Tawaha A.R., Rababah T. (2010) Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chemistry*; 123: 117-122.

Amirante P., Baccioni L., Clodoveo M.L., Dugo G., Leone A., Tamborrino A. (2005) Prove sperimentali di estrazione olearia con un nuovo mini impianto gestibile nelle aziende agricole ; un caso di filiera corta. *Olive e Olio, ann VIII* ; 11(12) ; 56-61.

Amoretti M.C., Comet G. (1985) Le livre de l'olivier. *EDISUD*, 191p.

Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Ryan D. (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*; 125: 989-1009.

Artajo L.S., Romero M.P., Tovar M.J., Motilva M.J. (2006) Effect of irrigation applied to olive trees (*Olea europaea L.*) on phenolic compound transfer during olive oil extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*; 108: 19-27.

Augusto Ballus C., Dillenburg Meinhart A., Campos F.A., Teixeira Godoy H. (2015) Total Phenolics of Virgin Olive Oils Highly Correlate with the Hydrogen Atom Transfer Mechanism of Antioxidant Capacity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; 92 (6): 843-851.

Aziz N. H., Farag S. E., Mousa L. A. A., Abo- Zaid M. A. (1998) Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*; 93 (374): 43-54.

Baali H. (2015) L'huile d'olive reste chère à Guelma, malgré une production oléicole prometteuse. *Quotidien la Liberté* ; publié le 12-12-2015.

Baccouri O., Guerfel M., Baccouri B., Cerretani L., Bendini A., Lercker G. (2008) Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, 109: 743-754.

Bahorun T. (1997) Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.

Baiano A., Gambacorta G., Terracone C., Previtali M.A., Lamacchia C. (2009) Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *Journal of Food Science*; 74 (2): 177-183.

Baidez A. G., Gomez P., Del Rio J.A., Ortuno A. (2007) Disfunctionality of the xylem in *Olea europaea L.* Plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolics in plant defense mechanism. *J. Agric. Food Chem*; 55: 3373-3377.

Barbera A.C., Maucieri C., Ioppolo A., Milani M., Cavallaro V. (2014) Effects of olive mill wastewater physico-chemical treatments on polyphenol abatement and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum Lam.*) germinability. *Water Res*; 1(52): 275-81.

Barranco D., Rallo L. (2000) Olive cultivars in Spain. *Hortechology*; 10: 107-110.

Barboni T. (2006) Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. *Thèse de Doctorat, Université de Corse-Pascal-Paoli (France)*, 266p.

Belkessam A. (2013) L'Algérie a triplé ses plantations d'oliviers en dix ans. *L'actualité économique de l'environnement en Méditerranée*, publié le 15 Janvier 2013.

Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Maria Gomez- Caravaca A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. et al. (2007) Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils : a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules* ; 12 : 1679-1719.

Bengana M., Bahouche A., Lozano-Sánchez J., Amir Y., Youyou A., Segura-Carretero A. (2013) Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of *Chemlal* extra-virgin olive oil. *Food Research International*; 54: 1868-1875.

- Benhammou N. (2012)** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. *Thèse de Doctorat, Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen*, 96p.
- Benhayoun G., Lazzeri Y. (2007)** L'olivier en Méditerranée, du symbole à l'économie. *Harmattan, Paris*, 137 p.
- Benlemlih M., Ghanam J. (2012)** Polyphenols d'huile d'olive, trésors santé. *Medicatrix*, 128p.
- Benrachou N., Henchiri C., Djeghaba Z. (2010)** Caractérisation de trois huiles d'olive issues de trois cultivars de l'Est algérien. *Synthèse*; 22 : 12-22.
- Benrachou S. (2013)** Etude des caractéristiques physicochimiques et de la composition biochimique d'huiles d'olive issues de trois cultivars de l'Est algérien. *Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba*, 85p.
- Ben-Sassi A., Boularbah A., Jalouad A., Walker G., Boussaid A. (2006)**. A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry* ; 41 : 74–78.
- Benyahia N., Zein K. (2003)** Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. *2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries. Lausanne (Suisse)*, 7p.
- Bergsson G., Arnfinnsson J., Steingrímsson O., Thomar H. (2001)** Elimination *in vitro* de *Candida albicans* par des acides gras et des monoglycérides. *Antimi-Crob. Agents Chemother*; 45: 3209-3212.
- Beuchamp G. K., Keast R. S., Morel D., Lin J. (2005)** Enzymes in an inflammation pathway are inhibited by oleocanthal, a component of olive oil. *Nature*; 437: 45–46.
- Bianco A., Uccella N. (2000)** Biophenolic components of olives. *Food Research International*; 33: 475-485.
- Bianco A., Mazzei R.A., Melchioni C., Romeo G., Scarpati M.L., Soriero A. et al. (1998)** Microcomponents of olive oil Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl)ethanol. *Food Chemistry*; 63: 461-464.
- Bianco A., Coccioli F., Guiso M., Marra C. (2001)** The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxyl-isochromans. *Food Chemistry*; 77: 405-411.
- Bianco A., Buiarelli F., Cartoni G. P., Coccioli F., Jasionowska R., Margherita P. (2003)** Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters. *Journal of Separation Science*; 26(5): 409–416.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A. (1999)**. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 51: 971–974.
- Blekas G., Psomiadou E., Tsimidou M. (2002)** On the Importance of Total Polar Phenols to Monitor the Stability of Greek Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*; 104 : 340-346.

- Bonoli M., Bendini A., Cerretani L., Lercker G., Tochi T.G. (2004)** Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; 52: 7026-7032.
- Boskou G., Salta F.N., Chrysostomou S., Mylona A., Chiou A., Andrikopoulos N.K. (2006)** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*; 94: 558-564.
- Boskou D., Blekas G., Tsimidou M. (2006).** Olive oil composition *In olive oil: Chemistry and Technology*, Boskou D., Ed. *The American Oil Chemists' Society Press*, 41-72.
- Botía J. M., Ortuño A., Benavente-García O., Báidez A.G., Frías J., Marcos D. et al. (2001)** Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea L.* fruits: Their influence on olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49: 355-358.
- Bouaziz M., Grayer R.J., Simmonds M.S.J., Damak M., Sayadi S. (2005)** Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 236-241.
- Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M., Sayadi S. (2008)** Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*; 108: 253-262.
- Bouaziz M., Jemai H., Khabou W., Sayadi S. (2010)** Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* ; 90 : 1750-1758.
- Bouzenoune F., Boudersa F., Bensaad A., Harkat F., Siad N. (2009)** Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. *Méd et mal infect* ; 39 (2): 142-143.
- Bracci T., Sebastiani L., Busconi M., Fogher C., Belaj A., Trujillo I. (2009)** SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Sci Hortic*; 122: 209–215.
- Brenes M., García A., García P., Rios J.J., Garrido A. (1999)** Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 47: 3535-3540.
- Brenes M., Hidalgo F., Garcia A., Rios J., Zamora R. (2000)** Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc*; 77: 715-720.
- Brenes M., Garcia A., Garcia P., Garrido A., (2001)** Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; 49 (11): 5609-5614.
- Brenes M., Romero C., García A., Hidalgo F.J., Ruiz-Méndez V. (2004)** Phenolic compounds in olive oils intended for refining: formation of 4-ethylphenol during olive paste storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52: 8177-8181.
- Brenes M., Medina E., Romero C., De Castro A. (2007)** Antimicrobial activity of olive oil. *Agro Food Industry Hi-tech*; 18: 6–8.
- Brenes M., Garcia A., Santos B.L., Medina E., Romero C., De Castro A. et al. (2011)** Olive glutaraldehyde-like compounds against plant pathogenic bacteria and fungi. *Food Chemistry*, 125: 1262–1266.
- Bruneton J. (1993)** Pharmacognosie et phytochimie. *Plantes médicinales plants, Paris France Lavoisier* ; 278-279.

Capasso R., Cristinzio G., Evidente A., Scognamiglio F. (1992a) Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry*; 31: 4125-4128.

Capasso R., Evidente A., Scognamiglio F. (1992b) A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochem Anal*; 3: 270-275.

Capasso R., Evidente A., Visca C. (1994) Production of hydroxytyrosol from olive oil vegetation waters. *Agrochimica*; 37:165-171.

Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A., Cristinzio G. (1995) Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*; 79: 393-398.

Caponio F., Alloggio V., Gomes T. (1999) Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*; 64: 203-209.

Cardinali A., Linsalata V., Lattanzio V., Ferruzzi M.G. (2011) Verbascosides from olive mill waste water : Assessment of their bioaccessibility and intestinal uptake using an *in vitro* digestion/caco-2 model system. *Journal of Food Science*; 76: 48-54.

Cardoso S.M., Guyot S., Marnet N., Lopes-da-Silva J.A., Renard C., Coimbra M.A. (2005) Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 85: 21-32.

Ceccon L., Saccu D., Procida G., Cardinali S. (2001) Liquid chromatographic determination of simple phenolic compounds in waste waters from olive oil production plants. *J. AOAC Int*; 84: 1739-1744.

Chimi H. (2006) Technologie d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. *Bulletin mensuelle d'information et de liaison du PNTTA (Maroc)*, 7p.

Cioffi G., Pesca S., De Caprariis P., Braca A., Severino L., De Tommasi N. (2010) Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*; 1: 105-111.

Clodoveo M.L. (2012) Malaxation: influence on virgin olive oil quality. Past, present and future an overview. *Trends in Food Science & Technology*; 25: 13-23.

Conseil Oléicole International (C.O.I) (1990). Disponible sur <http://www.internationaloliveoil.org/>

Conseil Oléicole International (C.O.I) (2003) Classification des huiles d'olive. Normes internationales applicables à l'huile d'olive et à l'huile de grignon d'olive. Disponible sur <http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/3619-normaf/5>

Conseil Oléicole International (C.O.I.) (2009) Production mondiale d'huile d'olive. Disponible sur <http://www.internationaloliveoil.org/>

Conseil Oléicole International (C.O. I.) (2017) Chiffres du marché mondial de l'huile d'olive. Disponiblesur: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>

Cortesi N., Azzolini M., Rovellini P., Fedeli E. (1995) Minor polar components of virgin olive oils: hypothetical structure by LC-MS. *Riv. Ital. Sost. Grasse*; 22: 241-251.

Cowan M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*; 12: 564-570.

Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. (2006) Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, *Edt Blackwell Publishing Ltd*; 208-302.

Daâssi D., Lozano-Sánchez J., Borrás-Linares I., Belbahri L., Woodward S., Zouari- Mechichi H., et al. (2014) Olive oil mill wastewaters: Phenolic content characterization during degradation by *Cori-olopsis gallica*. *Chemosphere*; 113: 62-70.

Dadci K. (2009) Une association pour sauver l'olivier. Campagne oléicole 2009-2010 à Guelma *Quotidien El-Watan*, publié le 18-11-2009.

Dadci K. (2015) Filière oléicole à Guelma : Echec dans la valorisation d'un produit stratégique. *Quotidien El-Watan*, publié le 14-12-2015.

Dadci K. (2017) Hausse prévisionnelle de la récolte oléicole. *Quotidien El-Watan*, publié le 06 -11-2017.

D'Angelo S., Ingrosso D., Migliardi V., Sorrentino A., Donnarumma G., Baroni A., et al. (2005) Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*; 38: 908-919.

De La Torre-Carbot K., Jauregui O., Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., López-Sabater M.C. (2005) Characterisation and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 4331-4340.

Della Greca M., Previtera L., Temussi F., Zarrelli A. (2004) Low-molecular-weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochem*; 15: 184-188.

Della Greca M., Monaco P., Pinto G., Pollio A., Previtera L., Temussi F. (2001) Phytotoxicity of low-molecular weight phenols from olive mill wastewaters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*; 67: 352-359.

Del Rio J. A., Baidez A. G., Botía J. M., Ortuno A. (2003) Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea L.*) and their influence on resistance against *Phytophthora sp.* *Food Chem*; 83: 75-78.

De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R. (2007) Characterisation and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chemistry* 104: 858-867.

Dermeche S., Nadour M., Larroche C., Moulti-Mati F., Michaud P. (2013) Olive mill wastes: Bio-chemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* ; 48 : 1532-1552.

Dierkes G., Krieger S., Dück R., Bongartz A., Schmitz O.J., Hayen H. (2012) High-performance liquid chromatography-mass spectrometry profiling of phenolic compounds for evaluation of olive oil bitterness and pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 60: 7597-7606.

Di Giovacchino L. (1989) Olive Processing Systems. Separation of the Oil from the Must. *Olivae*; 26: 21-29.

Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P. (2012) Extrait de feuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie* ; 10-18.

D.S.A. (2018) Direction des services agricoles, wilaya de Guelma.

Douzane M., Tamendjari A., Abdi A. K., Daas M.S., Mendid F., Bellal, M. M. (2013) Phenolic compounds in mono-cultivar extra virgin olive oils from Algeria. *Grasas y Aceites*; 64: 285-294.

Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A.M., Kraj A., Desiderio D.M., Nibbering N.M. (2008) Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications. *Wiley*; 372p.

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

El Hajjouji H. (2007) Evolution des caractéristiques physico-chimiques, spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries d'olive au cours de traitements biologique et chimique. *Thèse de Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse (France)*, 138p.

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

El Hajjouji H., Pinelli E., Guirese M., Merlina M., Revel J.C., Hafidi M. (2007) Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the Vicia faba micronucleus test. *Mutat Res*; 634: 25-31.

El Hajjouji H., Bailly J.R., Winterton P., Merlina G., Revel J.C., Hafidi M. (2008) Chemical and spectroscopic analysis of olive mill waste water during a biological treatment. *Bioresource Technology*; 99: 4958-4965.

El Riachy M., Priego-Capote F., León L., Rallo L., Luque De Castro M. D. (2011) Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*; 113 (6): 678-691.

Erdohan Z.Ö., Turhan K.N. (2011) Olive leaf extract and usage for development of antimicrobial food packaging. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Edition A. Méndez Vilas* ; 1094-1101.

Esmail A., Chahboun N., Mennane Z., Amiyare R., Abed H., Barrahi M (2015) Étude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis-à-vis de souches pathogènes. *J. Mater. Environ. Sci* ; 6 (3): 869-876.

Esmail A., Abed H., Firdaous M., Chahboun N., Mennane Z., Berny E., et al. (2014) Étude physico-chimique et microbiologique des margines de trois régions du Maroc (Ouazzane, Fès Boulman et Béni Mellal). *J. Mater. Environ. Sci* ; 5(1) : 121-126.

Espín J.C., Soler-Rivas C., Cantos E., Tomás-Barberán F.A., Wichers H.J. (2011) Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J Agric Food Chem*; 49 (3):1187-1193.

European Standard EN 1276 (1997) Chemical disinfectants and antiseptics quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used.

Fabiani R., De Bartolomeo A., Rosignoli P., Servili M., Montedoro G. F., Morozzi G. (2002) Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention*; 11: 351-358.

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et al. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biol.* 331, 372–379.

Fedeli E. (1999) Qualité (stockage, conservation et conditionnement de l'huile), réglementation et contrôle. Séminaire international sur les innovations scientifiques et leurs applications en oléiculture et oléotechnique. *Conseil Oleicole International* ; 1-20.

Feki M., Allouche N., Bouaziz M., Gargoubi A., Sayadi S. (2006) Effect of storage of olive mill wastewaters on hydroxytyrosol concentration. *European Journal of Lipid Science and Technology*; 108: 1021-1027.

Fernandez-Bolanos J., Rodriguez G., Rodriguez R., Heredia A., Guillen R.; Jimenez A. (2002) Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of twophase olive oil processing or “alperujo”. *J. Agric. Food Chem*; 50: 6804-6811.

Ferreira I.C.F.R., Martins N., Barros L. (2017) Phenolic Compounds and Its Bioavailability: In Vitro Bioactive Compounds or Health Promoters. *Advances in Food and Nutrition Research*; 82: 1-44.

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

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

Fleming H. P., Walter W. M., Etchells J.L. (1973) Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Appl. Microbiol*; 26: 777-782.

Fu S., Segura-Carretero A., Arráez-Román D., Menéndez J.A., De la Torre A., Fernández-Gutiérrez A. (2009) Tentative characterisation of novel phenolic compounds in extra virgin olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 57: 11140-11147.

Furneri P.M., Piperno A., Saija A., Bisignano G. (2004) Antimicrobial activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 48(12): 4892-4894.

Galli E., Pasetti L., Fiorelli F., Tomati U. (1997) Olive-mill waste water composting. Microbiological aspect. *Waste Management and Research*. 15: 323-330.

- Gaouar Benyelles N., Ilias F., Beghdad C., Gaouar M., Medjdoub K., Allelopathy J. (2014)** Olive antimicrobial activity against its pathogens in Tlemcen region, Algeria. *Allelopathy Journal*; 34 (1):133-141.
- Garcia A., Brenes M., Garcia P., Romero C., Garrido A. (2003)** Phenolic content of commercial olive oils. *Eur. Food Res. Technol* ; 216 : 520-525.
- Garcia-Castello E., Cassano A., Criscuoli A., Conidi C., Drioli E. (2010)** Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *Water Res*; 44: 3883–3892.
- Garcia-Villalba R., Carrasco-Pancorbo A., Oliveras-Ferraros C., Vazquez-Martin A., Menendez J. A., Segura-Carretero A. et al. (2010).** Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 51: 416-429.
- Garrabé E., Cavallo J.D., Fabre R., Hernandez E. (1998)** Antibiogramme par diffusion en gélose : essai de standardisation de l'inoculum par la méthode «Presto ABG ®». *Revue Française des Laboratoires* ; 307: 65-69.
- Ghanbari R., Anwar F., Alkharfy K. M., Gilani A.H., Saari N. (2012)** Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea L.*) A review. *Int. J. Mol. Sci*; 13: 3291–3340.
- Gómez-Alonso S., Salvador M.D., Fregapane G. (2002)** Phenolic compounds profile of *Cornicabra* virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50 (23): 6812-6817.
- Gomez-Rico A., Fregapane G., Salvador M.D. (2008)** Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Res Int*; 41: 433-440.
- Green P. S. (2002)** A Revision of *Olea L. (Oleaceae)*, *Kew Bulletin*; 57 (1): 91-140.
- Guergour N. (2010)** Un plan pour la relance de l'oléiculture. Le Soir d'Algérie, publié le 07-03-2017.
- Guignard, J.L. (2000)** Biochimie végétal. 2^{ème} Edition Dunod ; 188 p.
- Gutiérrez F., Villafranca M.J., Castellano J.M. (2002)** Changes in the main components and quality indices of virgin olive oil during oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; 79 (7): 669-676.
- Gutierrez-Rosales F., Ríos J.J., Gomez-Rey L. (2003)** Main polyphenols in the bitter Taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*; 51: 6021-6025.
- Hadacek F., Greger H. (2000)** Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*; 11 (3): 137-147.
- Hafidi M., Amira S., Revel J.C. (2005)** Structural characterization of olive mill waster-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and 13C NMR. *Process Biochemistry* ; 40 : 2615-2622.

Hakkinen S. (2000) Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Thèse de Doctorat, université de Kuopio Dissertation (Finland); 77p.

Hamadi C. (2006) Technologie d'extraction des huiles d'olives et gestion de sa qualité. Ministère de l'Agriculture et du développement rural et des pêches maritimes, *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA (Maroc)*; 141: 1-4.

Hamden K., Carreau S., Lajmi S., Aloulou D., Kchaou D., Elfeki A. (2008) Protective effect of 1,7-estradiol on hyperglycemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes induced by alloxan in male rat pancreas and liver. *Steroids*; 94: 495-501.

Hamdi M. (1991) Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. *Thèse de Doctorat. Université de Provence. Marseille (France)*; 168 p.

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

Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., Kinoshita T. (1998) Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*; 48: 125-129.

Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P. (1998) Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. *2nd edition, CRC Press*; 976p.

Haslam E. (1989) Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. *CUP Archive* ; 230p.

Herbert R.B. (1989) The biosynthesis of secondary métabolite, 2éme Ed. *Chapman and Halle*; 2: 11-115.

Hilliard J.J., Krause H.M., Bernstein J.I. (1995) A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv. Exp. Med. Biol*; 390: 59-69.

Inarejos-García A.M., Gómez-Rico A., Desamparados Salvador M., Fregapane G. (2009) Influence of malaxation conditions on virgin olive oil yield, overall quality and composition. *European Food Research and Technology*; 228: 671-677.

Innocenti M., La Marca G., Malvagia S., Giaccherini C., Vincieri F.F., Mulinacci N. (2006) Electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*; 20: 2013-2022.

Jackman R.L., Yada R.Y., Tung, M.A. (1987) A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. *J. Food Biochem*; 11: 279-308.

Jerman Klen T. (2014) Olive fruit phenols in olive oil processing: the fate and antioxidant potential. *Thèse de Doctorat, Université de Nova Gorica (Slovénie)*; 137p.

Kalua C.M., Bedgood D.R., Bishop A.G., Prenzler P.D. (2006) Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54: 7641-7651.

Kanakis P., Termentzi A., Michel T., Gikas E., Halabalaki M., Skaltsounis A.L. (2012) From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Medica*; 79: 1576-1587.

Karchesy J.J., Bae Y., Chalker-Scott L., Helm R.F., Foo L.Y. (1989) Chromatography of proanthocyanidins in Chemistry and Significance of Condensed Tannins. *Eds. Plenum Press, New York* ; 139-152.

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. *Thèse de Doctorat, Université de Sfax, école nationale d'ingénieurs de Sfax (Tunisie)*; 151p.

Kawagishi S., Oosawa T., Katsuzaki H. (1994) Pinoresinol Glucoside, Sesame Seed Extract) Containing Glycoside, and Its Use for Preventing Oxidation of Lipids, *Jpn. Patent*; 1–5.

Keceli T., Robinson R. K. (2002) Antimicrobial activity of phenolic extracts from virgin olive oil. *Milchwissenschaft* ; (57) : 436- 440.

Kerboua M. (2003) La production et la consommation d'huile d'olive à l'horizon 2010 en Algérie. *Olivea*; 99: 56-58.

Khodja I. (2011) Valorisation des sous-produits de l'activité oléicole ; République Algérienne démocratique et populaire, *Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement centre National des Technologies de Production plus Propre (CNTPP)* ; 8p.

Klen T.J., Vodopivec B.M. (2012) The fate of olive fruit phenols during commercial olive oil processing: Traditional press versus continuous two- and three-phase centrifuge. *LWT -Food Science and Technology*; 49: 267-274.

Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit A. (2008) Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of Food Safety*; 28: 76-87.

Krid S., Bouaziz M., Triki M.A., Gargouri A., Rhouma A. (2011) Inhibition of olive knot disease by polyphenols extracted from olive mill waste water. *Journal of Plant Pathology*; 93 (3): 561-568.

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.

Laincer A., Laribi R., Tamendjari A., Arrar L., Rovellini P., Venturini S. (2014) Olive oils from Algeria: Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities. *Grasas y Aceites* ; 65 : 1-10.

Laincer F., Iaccarino N., Amato J., Pagano B., Pagano A., Tenore G. et al. (2016) Characterization of monovarietal extra virgin olive oils from the province of Béjaïa (Algeria). *Food Research International* ; 89 : 1123-1133.

Lakhtar H. (2009) Culture du *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines. *Thèse de Doctorat. Université Paul Cézanne, Aix Marseille III (France)* ; 151p.

Laribi R., Rovellini P., Deflaoui L., Aidli A., Mettouchi S., Arrar L., et al. (2009) Evolution of biophenolic compounds in virgin olive oil during olive ripening of Algerian cultivars. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* ; 86 : 151-161.

Laribi R., Lincer F., Tamendjari A., Keciri S., Arrar L. Venturini S. (2011) Caractérisation de dix variétés d'huile d'olive algérienne : étude du profil en composés phénoliques par HPLC. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*; 38 : 161-171.

Laribi R. (2015) Les composés phénoliques de quelques variétés de l'huile d'olive algérienne : identification et propriétés. *Thèse de Doctorat, Université Farhat Abbès*; 77p.

Larif M., Ouhssine M., Soulaymani A., Elmidaoui A. (2015) Potential effluent oil mills and antibacterial activity polyphenols against some pathogenic strains. *Res Chem Intermed*; 41:1213-1225.

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

Lee O.H., Lee B.Y., Lee J., Lee H.B., Son J.Y., Park C.S., et al. (2009) Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bior source Technology*; 100: 6107-6113.

Leouifoudi I., Harnafi H., Ziad A. (2015) Olive mill waste extracts: Polyphenols content, antioxidant, and antimicrobial activities. *Advances in Pharmacological Sciences* ; 1-11.

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

Liu M. J., Li J. X., Guo H. Z., Lee K. M., Qin L., Chan K. M. (2003) The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. *Life Science*; 73: 883-892.

López O.J.M., Innocenti M., Ieri F., Giaccherini C., Romani A., Mulinacci N. (2008) HPLC/DAD/ESI/MS detection of lignans from Spanish and Italian *Olea europaea L.* fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*; 21: 62-70.

López-Miranda, J. (2010) Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report. Jaén and Córdoba (Spain). *Nutr., Metab. Cardiovasc. Dis*; 20: 284-294.

Lough W.J., Wainer I.W. (1995) High performance liquide chromatography: fundamental principles and practice. *Blackie Academic and professional*; 276p.

Lozano-Sánchez J., Giambanelli E., Quirantes-Piné R., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A. et al. (2011) Wastes generated during the storage of extra virgin olive oil as a natural source of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; 59: 11491-11500.

Macheix J.J., Christian J.A., Allemand J. (2005) Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Collection biologie, Presses polytechniques, Romandes* ; 192p.

Macheix J.J. (1996) Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle. *Acta Botanica Gallica* ; 143 (6): 473-479.

Maiuri M. C., De Stefano D., Di Meglio P., Irace C., Savarese M., Sacchi R., et al. (2005). Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedeberg's Archives Pharmacology* ; 371: 457-465.

M.A.D.R.P (2015) Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural et de la pêche.

Mateos R., Espartero J.L., Trujillo M., Rios J.J., León-Camacho M., Alcludia F. et al. (2001) Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49: 2185-2219.

Mateos R., Trujillo M., Perez-Camino C., Moreda W., Cert A. (2005) Relationships between oxidative stability, triacylglycerol composition, and antioxidant content in olive oil matrices. *J. Agric. Food Chem*; **53**: 5766-5771.

McDonald S., Prenzler P.D., Antolovich M., Robards K. (2004) Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*; 73: 73-84.

McDonald S., Prenzler P.D. Antolovich M., Robards K. (2001) Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*; 73: 73-84.

Mebirouk M. (2002) Rejets des huileries, développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols dans la margine, *CMPP News*; 11p.

Medina I., Satue-Gracia M.T., German J.B., Frankel E.N. (1999) Comparison of natural polyphenol antioxidants from extra virgin oil with synthetic antioxidants in tuna lipids during thermal oxidation. *J. Agric. Food Chem.*; 47: 4873-4879.

Medina E., De Castro A., Romero C., Brenes M. (2006) Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oil and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54: 4954-4961.

Medina E., Brenes M., Romero C., García A., De Castro A. (2007) Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 55: 9817-9823.

Medina E., Romero C., Brenes M., De Castro A., García A. (2008) Profile of antilactic acid bacteria compounds during the storage of olives which are not treated with alkali. *European Food Research and Technology*; 228: 133-138.

Medina E., Brenes M., Garcia A., Romero C., De Castro A. (2009) Bactericidal Activity of Glutaraldehyde-like Compounds from Olive Products. *Journal of Food Protection*; 72 (12): 2611-2614.

Medina E., Romero C., De los Santos B., De Castro A., García A., Romero F., et al. (2011) Antimicrobial activity of olive solutions from stored alpeorujo against plant pathogenic microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 59: 6927-6932.

Medina E., De Castro A., Romero C., Ramírez E., Brenes M. (2013) Effect of antimicrobial compounds from olive products on microorganisms related to health, food and agriculture. Microbial pathogens and strategies for combating them. *Science, technology and education*; 1087-1094.

- Medjkouh L., Tamendjari A., Alves R.C., Araújo M., Oliveira B. M. P. P. (2016)** Effect of *Bactrocera oleae* on phenolic compounds and antioxidant and antibacterial activities of two Algerian olive cultivars. *Food Funct*; 7: 43-72.
- Menani M. (2011)** Guelma : L'olivier fête sa journée. Publié dans le Quotidien d'Oran; le 30-11-2011.
- Menani M. (2013)** Guelma : Place à l'olivier. Publié dans le Quotidien d'Oran; le 30-11-2013.
- Mendil M. (2009)** L'oléiculture : Expériences algériennes. *Filaha Innove* ; 4 :1-6.
- Mendil M., Sebai A. (2006)** Catalogue national des variétés de l'olivier. ITAF (Alger); 100p.
- Merken H.M., Beecher G.R. (2000)** Measurements of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem*; 48: 577-599.
- Merghem R. (2009)** Elements de biochimie végétale. *Ed. Bahaeddine*; 171p.
- Meyer V.R. (2010)** Practical high-performance liquid chromatography. *Wiley*; 426p.
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. (1993)** Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 41: 2228-2234.
- Morelló J.R., Romero M.P., Motilva M.J. (2004)** Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52: 6002-6009.
- Moreno E., Quevedo-Sarmiento J., Ramos-Cormenzana A. (1989)** Antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills. *Encyclopedia of Environmental Control Technology*; 4: 731-757.
- Morsi K.S., Galal S.M., Alabdulla O. (2016)** Antioxidative Activity of Olive Pomace Polyphenols Obtained by Ultrasound Assisted Extraction. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*; 10(11): 95-100.
- Moussouni A. (2009)** L'oléiculture : Technologie et développement. *Filaha Innove* ; 4 : 8-9.
- Moussaoui R. (2007)** Valorisation des sous-produits de l'huilerie d'olive : grignons et margines. *Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammri, Tizi Ouzou* ; 133p.
- Mouzaoui K., Yazzag I., Moulti-Mati F. (2015)** Composés phénoliques des grignons d'olive provenant d'huileries traditionnelles et modernes : essai de purification de l'oleuropeine et de l'hydroxytyrosol. *Sciences & technologie* ; 41: 38-43.
- Muanda F.N. (2010)** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydant et étude de leurs propriétés biologiques. *Thèse de Doctorat. L'université Paul Verlaine-Metz (France)* ; 215p
- Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C., Vincieri, F. F. (2001)** Polyphenolic content in olive oil wastewaters and related olive samples. *J. Agric. Food Chem* ; 49 (8) : 3509- 3514.
- Mulinacci N., Giaccherini C., Innocenti M., Romani A., Vincieri F. F., Marotta F. et al. (2005)** Analysis of extra virgin olive oils from stoned olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 85: 662-670.

- Muzzalupo I. (2012)** Olive germplasm. *Italian catalogue of olive varieties*; 420p.
- Nacz M., Shahidi F. (1991)** Critical evaluation of quantification methods of rapeseed tannins. *Presented at 8th International Rapeseed Congress, Saskatoon (Canada)*; 48p.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999).** Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (USA)*; 32p.
- Nefzaoui A. (1987)** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. *L'économie de l'olivier (Tunis)* ; 153-173.
- Nefzaoui A. (1991)** Valorisation des sous-produits de l'olivier. *Fourrages et sous-produits méditerranéens (Zaragoza) CIHEAM* ; 101-108.
- Niaounakis M., C. P.Halvadakis (2004)** Olive-mill wastemanagement: Literature Review and Patent Survey. *Typhitho-George Dardanos Publications, Athens (Greece)*; 430p.
- Niaounakis M., Halvadakis C.P. (2006)** Olive processing waste management literature review and patent survey. *Elsevier: Waste Management Series*; 5: 23-64.
- Noubih A., Abderrabba M., Provost E. (2007)** Temperature and addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *J. Chem. Thermodynamics*; 39: 297-303.
- Nychas G.J.E., Tassou S.C., Board R.G. (1990)** Phenolic extract from olives: inhibition of *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*; 10: 217-220.
- Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R Jr., Prenzler P.D., Robards K. (2005a)** Investigation of Australian Olive Mill Waste for Recovery of Biophenols. *J Agric Food Chem*; 53 (26): 9911-9920.
- Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Stockmann R. (2005b)** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 823-837.
- Obied H.K., Bedgood Jr D.R., Prenzier P.D., Robards K. (2007a)**Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*; 603: 176-189
- Obied H.K., Bedgood Jr. D.R., Prenzler P.D., Robards K. (2007b)** Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*; 45: 1238-1248.
- Obied H. K., Bedgood D. R., Jr., Prenzler P. D., Robard K. (2008)** Effect of processing conditions, prestorage, treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 56: 3925-3932.
- Ocakoglu D., Tokatli F., Ozen B., Korel F. (2009)** Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*; 113: 401-410.
- ONFAA. (2014)** Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires. *Marché International de l'huile d'olive*; 01: 1-8.

O’Kennedy R., Thornes R.D. (1997) Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. *John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y;* 360p.

Owen R.W., Mier W., Giacosa A. (2000) Phenolic compounds and squalene in olive oils : the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, simple phenols, secoiredoids, lignan-sandsqualene. *Food Chem. Toxicol;* 38: 647-59.

Owen R.W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., et al. (2003) Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem Toxicol;* 41: 703-717.

Özdemir Z., (2009) Growth inhibition of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* and *Pseudomonas syringae* pv *tomato* by olive mill wastewaters and citric acid. *Journal of Plant Pathology;* 91: 221-224.

Panizzi, L., Scarpati, M.L., Oriente, E.G. (1960) Structure of oleuropein, bitter glycoside with hypotensive action of olive oil. *Note II. Gazz. Chim. Ital.;* 90: 1449-1485.

Paraskeva C.A., Papadakis V.G., Tsarouchi E., Kanellopoulou D. G., Koutsoukos P. G. (2007) Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. *Desalination;* 213: 218-229.

Paredes C., Roig A., Bernal M.P., Sanchez Monedero M.A., Cegarra J. (2000) Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biology and Fertility Soils;* 32: 222-227.

Pellegrini N., Visioli F., Buratti S., Brighenti F. (2001) Direct analysis of total antioxydant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *J. Agric. Food Chem;* 49: 2532-2538.

Peralbo-Molina A., Priego-Capote F., Dolores Luque de Castro M. (2012) Tentative identification of phenolic compounds in olive pomace using liquid-chromatography-tandem mass spectrometry with a quadropole-quadropole-time-of-flight mass detector. *Journal of Agricultural and Food Chemistry ;* 60 : 11542-11550.

Pereira A.J., Pereira A.P., Ferreira I.C., Valentão P., Andrade P.B., Seabra R., et al. (2006) Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *J Agr Chem;* 54: 8425-8431.

Pérez A.G., Romero C., Yousfi K., García J.M. (2008) Modulation of olive oil quality using NaCl as extraction coadjuvant. *Journal of the American Oil Chemists Society;* 85: 685-691.

Pérez J., De la Rubia T., Moreno J., Martínez J. (1992) Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environ. Toxicol. Chem;* 11: 489-495.

Perrin J.L. (1992) Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l’olive et de son huile. *Etude et recherche ;* 4 : 25-31.

Pietta P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products;* 63: 1035-1042.

Pietta P., Gardana C., Pietta A. (2003) Flavonoids in herbs; In ; flavonoids in helth and disease. *Rice-Evans C., Packer L. eds, New York;* 43-69.

Phillips T.M., Corradini D. (2010) Handbook of HPLC, *CRC Press;* 715p.

Radford S. A., Tassou C. C., Nychas G. J. E., Board R. G. (1991) The influence of different oils on the death rate of *Salmonella enteritidis* in homemade mayonnaise. *Lett. Appl. Microbiol;* 12: 125-128.

Raederstorff D., Wang-schmidt Y., Wertz K. (2010) Use of hydroxytyrosol as anti-aging agent. *DSM IP Assets BV*; 20p.

Ramírez E., Medina E., Brenes M., Romero C. (2014) Endogenous enzymes involved in the transformation of oleuropein in Spanish table olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 62: 9569-9575.

Ramos-Cormenzana A., Juirez-Jimenez B., Garcia-Pareja M.P. (1996) Antimicrobial Activity of Olive Mill Wastewaters (Alpechin) and Biotransformed Mill Wastewater Waste-Olive Oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 283-290.

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

Rebour H. (2005) Situation actuelle de l'oléiculture en Algérie, Alger ; 46 : 1-6.

Riachy M.E., Priego-Capote F., León L., Rallo L., Luque de Castro M.D. (2011) Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* ; 113 : 678-691.

Ribereau-Gayon P. (1968) Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod, Paris* ; 254p.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure-Antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*; 20: 933-956.

Rigane G., Ben Salem R., Sayadi S., Bouaziz M. (2011) Phenolic composition, isolation, and structure of a new deoxyloganic acid derivative from Dhokar and Gemri-Dhokar olive cultivars. *Journal of Food Science*; 76: C965-C973.

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

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.

Roila R., Branciarri R., Ranucci D., Ortenzi R., Urbani S., Servili M. et al. (2016) Antimicrobial activity of olive mill wastewater extract against *Pseudomonas fluorescens* isolated from mozzarella cheese. *Italian Journal of Food Safety*; 5: 57-60.

Romani A., Mulinacci N., Pinalli P., Vincieri F., Cimato A. (1999) Polyphenolic content in five Tuscan cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem*; 47: 964-967.

Romeo G., Uccella N. (1996) Olive biophenols: taste supermolecules in Mediterranean aliment culture. *Tetrahedron-Eppos*; 21: 33-80.

Romero C., García P., Brenes M., García A., Garrido A. (2002a) Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties. *European Food Research and Technology*; 215: 489-496.

Romero M.P., Tovar M.J., Girona J., Motilva M.J. (2002b) Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. Cv. *Arbequina*) grown under different deficit irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50 (19): 5349-5354.

Romero C., Medina E., Vargas J., Brenes M., De Castro A. (2007) In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem*; 55: 680-686.

Romero C., Medina E., Mateo M. A., Brenes M. (2018) New by-products rich in bioactive substances from the olive oil mill processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 98 (1): 225-230

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.

Roila R., Branciarri R., Ranucci D., Ortenzi R., Urbani S., Servili M. et al. (2016) Antimicrobial activity of olive mill wastewater extract against *Pseudomonas fluorescens* isolated from mozzarella cheese. *Italian Journal of Food Safety*; 5: 57-60.

Rovellini P., Cortesi N. (2002) Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oils: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*; 79: 1-14.

Rubio-Senent F., Martos S., Lama-Muñoz A., Fernández-Bolaños J. G., Rodríguez- Gutiérrez G., Fernández-Bolaños J. (2015a). Isolation and identification of minor secoiridoids and phenolic components from thermally treated olive oil by-products. *Food Chemistry*; 187: 166-173.

Rubio-Senent F., Martos S., García A., Fernández-Bolaños J. G., Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernández-Bolaños J. (2015b). Isolation and characterization of a secoiridoid derivative from two-phase olive waste (alperujo). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 63: 1151-1159.

Rupasinhe H. P. V., Boulter-Bitzer J., Ahn T., Odumeru J. A. (2006) Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms in vitro and aerobic microbial growth in fresh-cut apples. *Food Res. Int.*; 39: 575-580.

Ryan D., Robards K., Lavee S. (1999) Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography*; 832: 87-96.

Ryan D., Antolovich M., Herlt T., Prenzler P.D., Lavee S., Robards K. (2002) Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50: 6716-6724.

Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S. Ashida H., Kanazawa K. (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruit and teas. *J Agric Food Chem* ; 51: 571-581.

Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006) Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed Lavoisier. Paris*; 398p.

Savarese M., De Marco E., Sacchi R. (2007) Characterisation of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*; 105: 761-770.

Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F. (2000) Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill waste water biotreatment. *Process Biochem*; 35: 725-735.

Shahidi F., Naczk M. (2003) Phenolics in Food and Nutraceuticals, 2nd Edition, *CRC Press LLC (Florida)*; 576p.

Senani-Oularbi N., Riba A., Moulti-Mati F. (2018) Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production by olive mill wastewater. *Bioscience Research*; 15 (1): 369-380.

Servili M., Baldioli M., Mariotti F., Montedoro G. F., Metzidakis I. T., Voyiatzis D. G. (1999a). Phenolic composition of olive fruits and virgin olive oil: distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during the oil mechanical extraction process. *Acta Horticulturae*; 474: 609-613.

Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchioni, A., & Montedoro, G. (1999b). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters and pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic Resonance characterization. *Journal of the American Oil Chemists Society*; 76: 873-882.

Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G., Morozzi G. (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in oil. *Journal of Chromatography A* ; 1054: 113-127.

Sih C.J., Ravikumar P.R., Huang F.C., Buckner C., Whitlock H., (1976) Isolation and Synthesis of Pinoresinol Diglucoside, a Major Antihypertensive Principle of Tu-Chung (*Eucommia ulmoides*, Oliver), *J. Am. Chem. Soc.*; 98: 5412–5413.

Simoes M., Pereira M.O., Machado I., Simoes L.C., Vieira M.J. (2006) Comparative antibacterial potential of selected aldehyde-based biocides and surfactants against planktonic *Pseudomonas fluorescens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*; 33: 741-749.

Sivakumar G., Briccoli Bati C., Ucella N. (2005) HPLC-MS screening of the antioxidant profile of Italian olive cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*; 41: 588-591.

Smith A.H., Imlay J.A., Mackie R.I. (2003) Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. *Applied and Environmental Microbiology*; 69: 3406-3411.

Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Calhella R., Andrade P.B., Valentao P., Seabra R. et al. (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives ‘*Alcaparra*’. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 14: 8533-8538

Steehler J.K. (2009) Introduction to Mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation. 4th Edition (by J. Throck Watson and O. David Sparkman). *Journal of chemical Education*; 86: 810p.

Suárez M., Maciá A., Romero M.P., Motilva M.J. (2008) Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*; 1241: 90-99.

Suárez M., Romero M.P., Motilva M.J. (2010) Development of a phenol-enriched olive oil with phenolic compounds from olive cake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 58: 10396-10403.

Susamci E., Romero C., Tuncay O., Brenes M. (2017) An explanation for the natural de-bittering of Hurma olives during ripening on the tree. *Grasas y Aceites*; 68(1): 82-90.

Swinny E., Markham K. (2003) Application of flavonoid analysis and identification techniques : isoflavones (phytoestrogens) and 3-deoxyanthocyanins. In : flavonoids in health and disease. *Rice-Evans C. Packer L. eds, New York*; 97-122.

Tafesh A., Najami N., Jadoun J., Halahlil F., Riepl H., Azaizeh H. (2011) Synergistic Antibacterial Effects of Polyphenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 1-9.

Takaç S., Karakaya A. (2009) Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater. *Recent Patents on Chemical Engineering*; 2: 230-237.

Takahashi T., Kokubo R., Sakaino M. (2004) Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Lett. Appl. Microbiol*; 39: 60-64.

Tsagariki E., Lazarides H.N., Konstantinos B.P. Olive mill waste water treatment. *Springerlink*; 133-157.

Tsuchiya H., Iinuma M. (2000) Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*; 7: 161–165.

Tuck K.L., Tan H.W., Hayball P.J. (2000) Synthesis of tritium-labeled hydroxytyrosol, a phenolic compound found in olive Oil. *J Agric Food Chem*; 48(9): 4087-4090.

Tuck K.L., Hayball P.J. (2002) Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 13: 636-644.

Tura D., Failla O., Bassi D., Pedo S., Serraiocco A., (2008) Cultivar influence on virgin olive (*Olea europaea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae*; 118 (2): 139-148.

Tura D., Gigliotti C., Pedo S., Failla O., Bassi D., Serraiocco A. (2007) Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europaea* L.) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae* ; 112: 108-119.

Vagelas I., Kalorizou H., Papachatzis A., Botu M. (2009) Bioactivity of olive oil mill wastewater against plant pathogens and post harvest diseases. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*; 23 (2): 1217-1219.

Vagelas I.K., Kalorizou A.H., Papachatzis A., Botu M. (2010) Bioactivity of olive oil mill wastewater against post-harvest diseases. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*; 23 (2): 1217-1219.

Vazquez-Roncero A. (1978). Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile. *Rev. Fr Corps Gras*; 25: 21-26.

Vekiari S.A., Oreopoulou V., Kourkoutas Y., Kamoun N., Msallem M., Psimouli V. et al. (2010). Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the *Throumbolia* and *Koro-neiki* varieties from Southern Greece. *Grasas y Aceites*; 61(3): 221-231.

Veillet S. (2010) Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive: Entre Tradition et Innovation. *Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Marseille (France)*; 153p.

Vierhuis E., Servili M., Baldioli M., Schols H.A., Voragen A.G., Montedoro G.F. (2001) Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *J Agric Food Chem.*; 49(3): 1218-1223.

Vinha A.F., Ferreres F., Silva B.M., Valentao P., Goncalves A., Pereira J.A. et al. (2005) Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea L.*): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem*; 89: 561-568.

Visioli F., Galli C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences*; 55 (24): 1965-1971.

Visioli F., Bellomo G., Montedoro G.F., Gallic (1995) Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*; 117: 25-32.

Visioli F., Galli C. (1998) Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 46(10): 4292-4296.

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

Visioli F., Galli C., Bonnet F., Mattei A., Patelli R., Galli G. et al. (2000) Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*; 468: 159-160.

Visioli F., Poli A., Galli C. (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*; 22 (1): 65-75.

Visioli F., Caruso D., Grande S., Bosisio R., Villa M., Galli G. et al. (2005) Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr. Mar*; 44 (2):121-127.

Vlyssides A.G., Loizides M., Karlis P.K. (2004) Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*; 12: 603-611.

Winkelhausen E., Pospiech R., Laufenberg G. (2005) Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bulletin of the chemists and technologists of Macedonia*; 24: 41-46.

Yaakoub A., Chahlaoui A., Elyachioui M., Chaouch A. (2010) Traitement des margines à ph neutre et en conditions d'aérobie par la microflore du sol avant épandage. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*; 149: 43-56.

Yadava R.N., Tiwari L. (2005) A potential antiviral flavone glycoside from the seeds of *Butea monosperma*. *O. Kuntze. J. Asian. Nat. Prod. Res*; 7: 185-188.

Yahiaoui O.H., Lounicia N., Abdia N., Drouichea N., Ghaffourc A., Pausd N. et al. (2011) Treatment of olive mill wastewater by the combination of ultrafiltration and bipolar electrochemical reactor processes. *Chemical Engineering and Processing*; 50: 37-41.

Yangui T., Rhouma A., Triki M.A., Gargouri K., Bouzid J., (2008) Control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strains. *Crop Protection*; 27(2): 189-197.

Yangui T., Dhouib A., Rhouma A., Sayadi S. (2009) Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill waste water as a natural disinfectant and its effect on seeds vigor response. *Food Chem*; 117: 1-8.

Yoda Y., Hu Z.Q., Zhao W.H., Shimamura T. (2004) Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *Journal of Infection and Chemotherapy*; 10: 55-58.

Yorulmaz A., Tekin A., Turan S. (2011) Improving olive oil quality with double protection: Destoning and malaxation in nitrogen atmosphere. *European Journal of Lipid Science and Technology*; 113: 637-643.

Zafra A., Juarez M.J.B., Blanc R., Navalon A., Gonzalez J., Vilchez J.L. (2006) Determination of polyphenolic compounds in wastewater olive oil by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*; 70: 208-213.

Zbakh H., 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.



Annexes

Annexe 1 : Milieux de culture utilisés

- **Gélose nutritive**

Poudre "Lab-Lemco" (extrait de viande)	05 g
Peptone bactériologique neutralisé	10 g
NaCl	05 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

pH = 7,2

- **Gélose cœur-cervelle**

- Extrait cœur-cervelle	17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine	10 g
- Phosphate disodique	2,5 g
- Glucose	02 g
- NaCl	05 g
- Agar	15 g
- Eau distillée	1000 mL

pH = 7,4

- **Bouillon nutritif**

Poudre "Lab-Lemco" (extrait de viande)	05 g
Peptone bactériologique neutralisé	10 g
NaCl	05 g
Eau distillée	1000 mL

pH = 7,2

- **Bouillon cœur-cervelle**

- Extrait cœur-cervelle	17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine	10 g
- Phosphate disodique	2,5 g
- Glucose	02 g
- NaCl	05 g
- Eau distillée	1000 mL

pH = 7,4

- **Eau physiologique (0,9%)**

- NaCl	09 g
- Eau distillée	1000 mL

- **Eau peptonée (0,1%)**

- Peptones	01 g
- Eau distillée	1000 mL

Annexe 2 : Solutions chimiques utilisées

- **Étalon interne**

L'étalon interne 2 mM est préparé comme suit :

- ✓ Dissoudre 0,039 mg d'acide syringique dans 100 mL du DMF pour les extraits phénoliques de l'huile d'olive ;
- ✓ Dissoudre 0,039 mg d'acide syringique dans 100 mL du DMSO pour les extraits phénoliques des grignons d'olives ;
- ✓ Dissoudre 0,039 mg d'acide syringique dans 100 mL de l'eau distillée pour les margines brutes, ultra-filtrées et épuisées ;
- ✓ Dissoudre 0,039 mg d'acide syringique dans 100 mL d'acétate d'éthyle pour l'extrait phénolique des margines.

- **Solution PBST**

La solution PBST est préparée par mélange du phosphate de sodium dibasique (100 mM) avec le phosphate de sodium monobasique (100 mM) avec un rapport de 2:1. Le NaCl (150 mM) a été ensuite ajouté au mélange avec un ratio de 1 :1. Enfin, le Tween 20 a été incorporé à raison de 0,25% (p/p) de la concentration finale de la solution.

- **Solution tampon d'acide acétique**

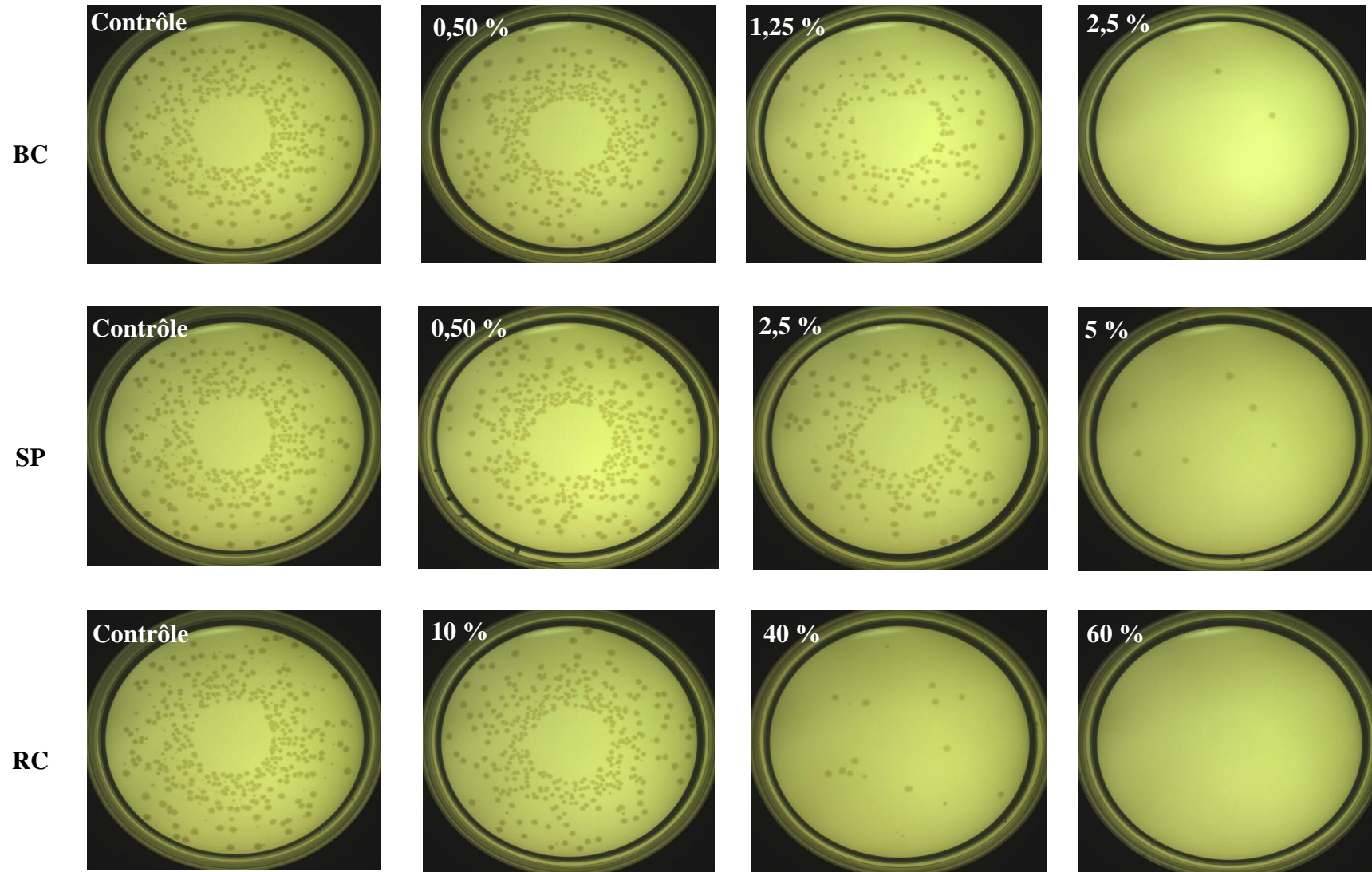
La solution tampon d'acide acétique est préparé par le mélange de 74 mL de la solution A, plus 176 mL de la solution B :

- Solution A : acide acétique glacial (0.2 M) = 2,88 mL dans 250 mL de l'eau distillée ;
- Solution B : acétate de sodium (0,2 M) = 6,80 g dans 250 mL d'eau distillée

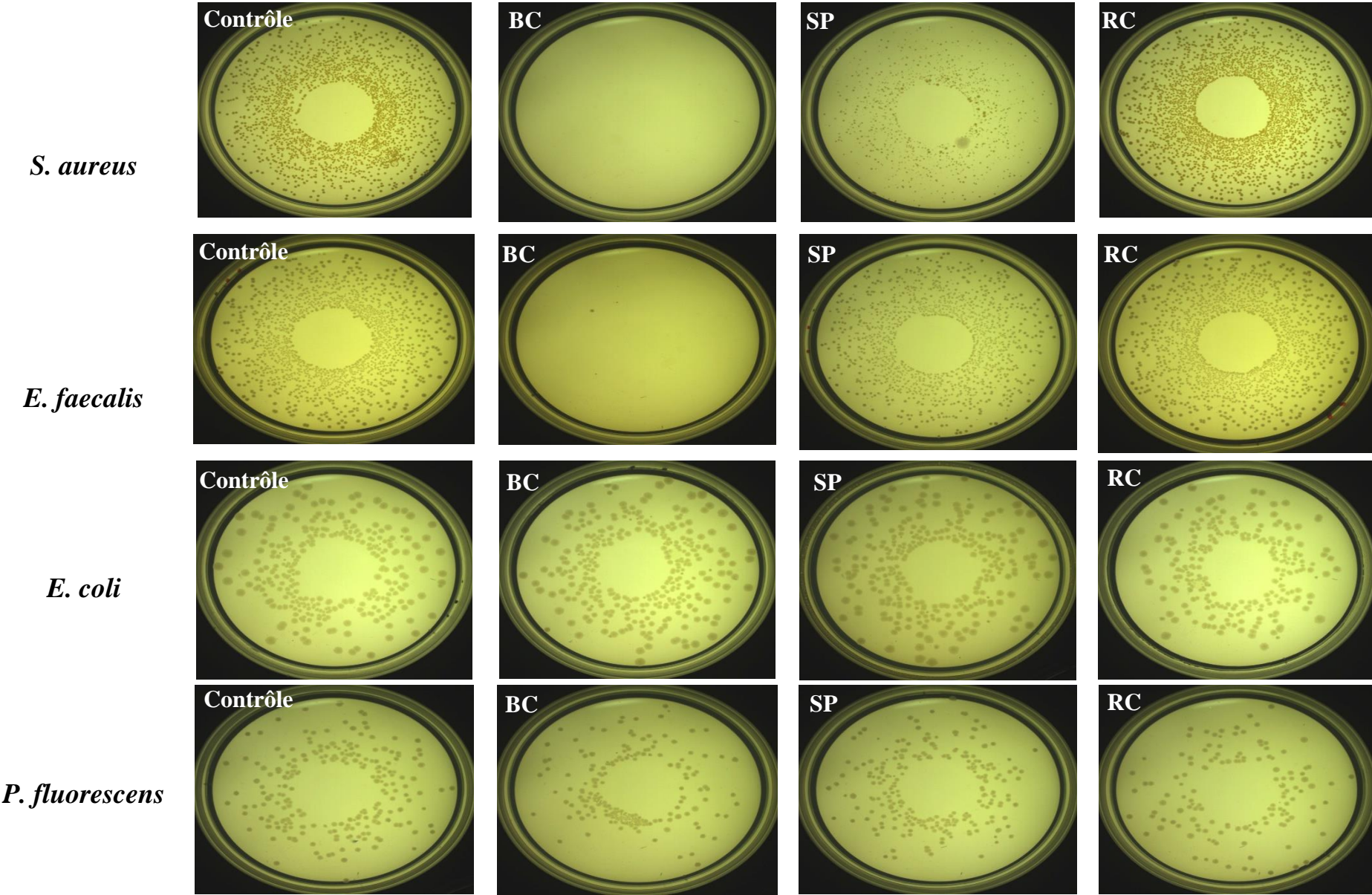
On obtient à la fin une solution à pH = 5,02.

Annexes 3 : Photographies de l'activité antibactérienne

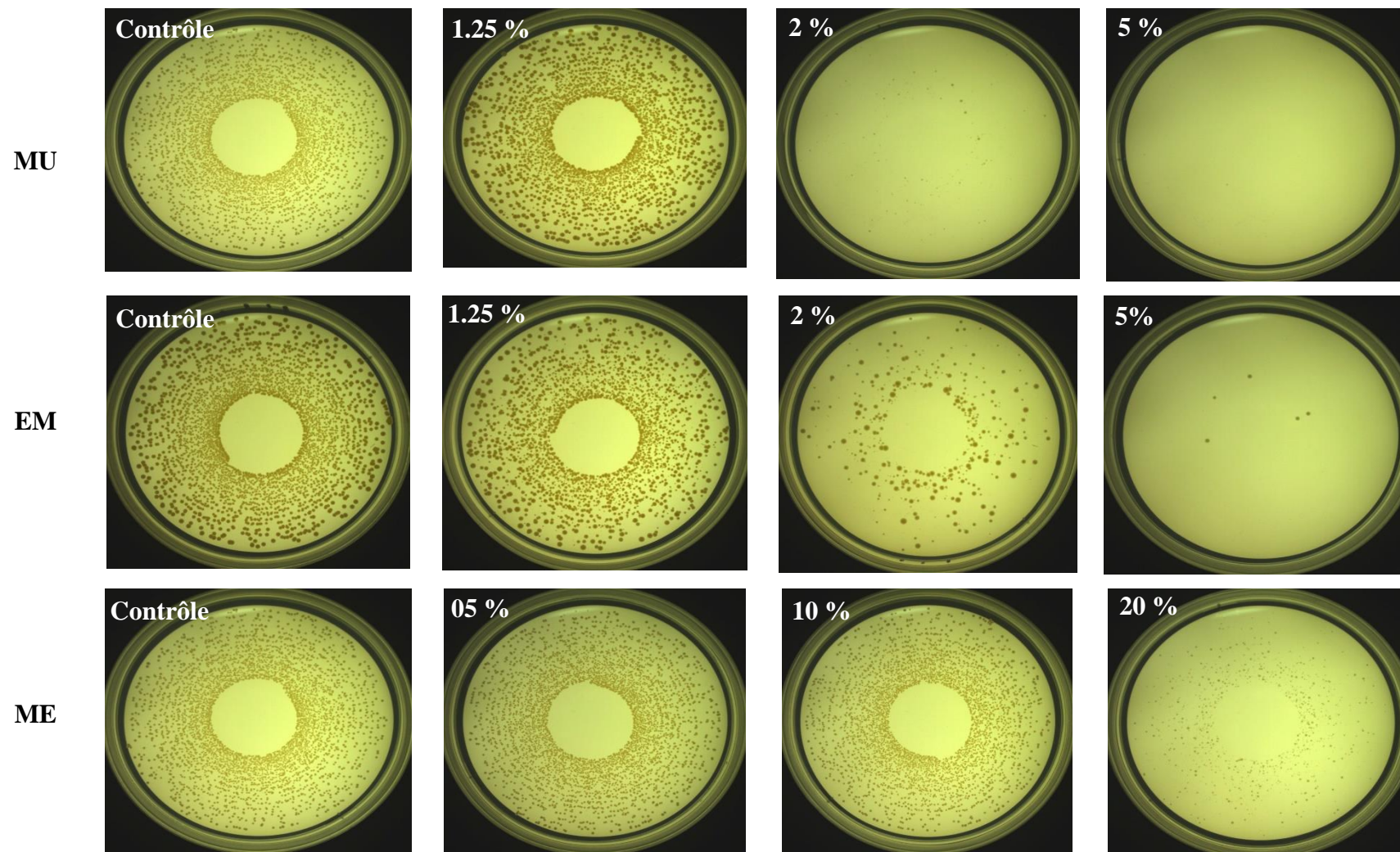
Effet bactéricide des margines brutes (BC, SP et RC), à différentes concentrations, sur *E. coli*.



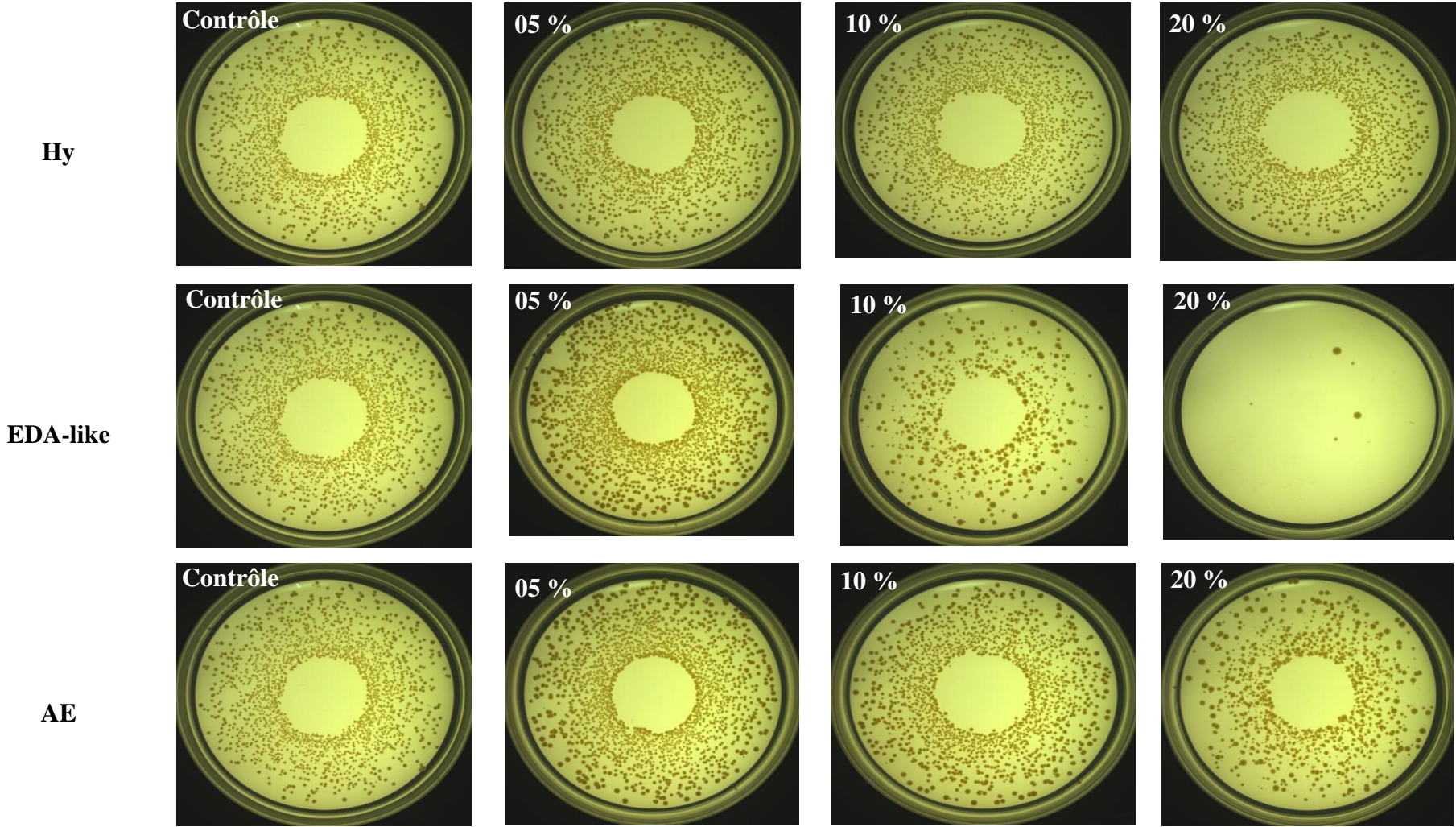
Effet bactéricide des huiles d'olive (BC, RC et SP) sur les quatre souches test.



Effet bactéricide des margines ultra-filtrées (MU), extrait phénolique des margines (EM) et les margines épuisées (ME) sur *S. aureus*.



Effet bactéricide de l'Hy, L'EDA-like et l'AE sur *S. aureus*.



Annexe 4 : Travaux scientifiques

Publication internationale :

- **Yakhlef W., Arhab R., Romero C., Brenes M., De Castro A., Medina E.** Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products. *LWT - Food Science and Technology*; 93 (2018) 323-328.

Communications internationales :

- **Yakhlef W., Kheddouma A., Arhab R.** « Etude de l'activité antibactérienne des polyphénols issus de l'olivier » Séminaire International des Biotechnologies Appliquées à l'Agriculture, la Santé et l'Environnement (SIBAASE I). Khenchela, 17-19 Avril **2016**.
- **Yakhlef W., Kheddouma A., Arhab R.** « Valorisation des sous-produits oléicoles de la région de Guelma et mise en évidence de leur activité antibactérienne » Séminaire International sur les Sciences Alimentaires. (SISA). Constantine, 14-16 Octobre **2014**.

Communications nationales

- **Yakhlef W., Kheddouma A., Arhab R.** « Valorisation des déchets liquides résultants de la trituration de l'huile d'olive dans l'est algérien » premier séminaire national sur la Biodiversité, l'environnement et la Sécurité Alimentaire (Biosec). Boumerdès, 20 et 21 Octobre **2015**.
- **Yakhlef W., Kheddouma A., Arhab R.** « Valorisation des déchets oléicoles liquides en microbiologie » la conférence nationale sur les sciences et technologies de l'environnement (CNSTE). Skikda, 03 et 04 Juin **2015**.
- **Yakhlef W., Kheddouma A., Arhab R.** « Valorisation des effluents oléicoles de l'Est algérien et étude de leur effet antibactérien » la conférence nationale sur la pollution et déchets industriels (CNPDI). Skikda, 04 et 05 Juin **2014**.
- **Yakhlef W.** « Valorisation des rejets liquides oléicoles et étude de leur impact sur l'environnement » 2^{ème} Séminaire National : Eau, Environnement et Biodiversité (2SNEEB). Khenchela, 27 et 28 Mai **2014**.
- **Yakhlef W., Kheddouma A., Arhab R.** « Comparaison de l'effet antibactérien des polyphénols totaux issus des margines de l'Est algérien » 1^{er} Séminaire National : Etat des lieux, conservations et possibilités de valorisation des ressources biologiques dans l'Est algérien. Mila, 11-12 Mars **2014**.



Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products

Wahiba Yakhlef^a, Rabah Arhab^b, Concepción Romero^c, Manuel Brenes^c, Antonio de Castro^c, Eduardo Medina^{c,*}

^a Department of Molecular and Cellular Biology, Abbes Laghrour University, Khenchela, Algeria

^b Department of Nature and Life Sciences, Larbi Ben M'Hidi University, Oum El Bouaghi, Algeria

^c Food Biotechnology Department, Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Campus Universitario, Building 46, Ctra. Utrera, Km 1, 41013, Seville, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Olive cultivars
Olive oil
Olive mill wastewaters
Polyphenols
Antimicrobials

ABSTRACT

This work characterized the phenolic profile of virgin olive oil, pomace, and olive mill wastewater (OMWW) of the three Algerian cultivars Blanquette, Rouquette and Sigoise, which were generated by traditional discontinuous press and 3-phase centrifugal extraction processes. Results revealed the cv. Blanquette as the cultivar with the highest phenolic content and no conclusive differences between the oil extraction processes were found. The antimicrobial activity exerted by OMWW and olive oils was attributed to their phenolic content, especially glutaraldehyde-like compounds. The most bactericidal OMWW, which presented the highest phenolic concentration (10,828 mg/L), showed a minimal bactericidal concentration (MBC) of 2.5% for all target microorganisms. In addition, a concentration of 452 mg/kg of total polyphenols in the olive oil reduced more than 3 log units from the initial inoculum in 30 min. Olive derived products showed a remarkable antimicrobial activity that makes them a good source of natural antimicrobials.

1. Introduction

Olea europaea L. represents one of the most important crops in Mediterranean countries. According to the International Olive Oil Council, Algeria is the ninth largest producer country of olive oil in the world, with around 87.5 tons in the 2015/16 season (IOC, 2017). For olive oil production, fruits are harvested from the tree from November to February, crushed in a grinder and malaxed to increase the released oil yield. The oil extraction from the olive paste can be conducted according to different processes: (i) traditional discontinuous press, (ii) 3-phase centrifugal, and (iii) 2-phase centrifugal extraction systems (Klen & Vodopivec, 2012). Three different products are generated with the traditional discontinuous press and the 3-phase system, (olive oil, pomace, and olive mill wastewater (OMWW)), and only two (olive oil and pomace) with the 2-phase system.

Virgin olive oil, unlike other vegetable oils, is consumed directly without refining, preserving its characteristic aroma and organoleptic properties. Olive oil is appreciated worldwide for its nutritional value, flavor and for its healthy properties. The increasing popularity of olive oil is due to its high concentration in monounsaturated fatty acid (oleic acid), but the presence of minor compounds such as phenolic compounds also contributes to the nutritional valorization of this fat; in

particular, these substances possess antioxidant, antimicrobial and antitumoral activities, among others (Brenes, Medina, Romero, & de Castro, 2007; D'Angelo et al., 2005; Visioli et al., 2005). The phenolic profile and the quality of olive oils depends on several factors such as cultivar (Laincer et al., 2016), maturation of the fruits, time of harvesting, and the oil extraction process used (Bengana et al., 2013; Laribi et al., 2009).

Even though less eco-friendly, traditional press process and 3-phase centrifugal processes are still in use in many olive mills in Algeria that generate large amounts of OMWW. The seasonal production of OMWW receives insufficient treatment in the plant with a final destination in large ponds for evaporation or dumping in the soil or rivers, with the concomitant environmental and management problems due to their high polluting load and toxicity (Chatzistathis & Koutsos, 2017; McNamara, Anastasiou, O'Flaherty, & Mitchell, 2008). The chemical characteristics of these OMWW can vary from different origins, but they present a high concentration of organic substances such as sugars, proteins, carotenoids, tocopherols (Dermeche, Nadour, Larroche, Moulti-Mati, & Michaud, 2013) and phenolic compounds (El-Abbassi, Kiai, & Hafidi, 2012), and could be considered as a potential source of valuable natural biocompounds with a feasible recovery (Rubio-Senent, Martos, Lama-Muñoz et al., 2015). Precisely, olive products and by-

* Corresponding author.

E-mail address: emedina@ig.csic.es (E. Medina).

products possess an antimicrobial activity against phytopathogenic bacteria and fungi which have been associated with their phenolic compounds concentration (Brenes et al., 2011). The presence of polyphenols in this waste product open up the possibility of using it in agriculture as fertilizer or for restoration of degraded soils making this by-product more valuable (Chatzistathis & Koutsos, 2017; Medina et al., 2011).

The objective of the present work was i) to study the polyphenols composition present in virgin olive oil, pomace and OMWW from Algerian olive oil mills, considering extraction processes (traditional discontinuous press and 3-phase centrifugal system) and olive cultivars (Sigoise, Blanquette and Rougette); ii) to determine *in vitro* the antimicrobial activity of Algerian virgin olive oil and OMWW and their bioactive phenolic compounds against bacteria, in order to highlight their bactericidal potential.

2. Material and methods

2.1. Olive samples and extraction process

A total of 54 samples of olive oil (18), pomace (18) and olive mills waste waters (OMWW) (18) were collected in December from various mills located in Roknia, Bouati Mahmoud, Guelma, Bouchegouf and Medjez Sfa, all of them in the region of eastern Algeria (36° 28' 00" N, 7° 27' 00" E) during the season 2016/2017. Samples were from three different olive cultivars (cv. Rougette (R), cv. Blanquette (B) and cv. Sigoise(S)) and were obtained by two different extraction methods, traditional by pressure (P) and 3-phase continuous by centrifugation (C). Three lots of each combination were studied. Samples of olive oil were filtrated through cellulose paper and kept at ambient temperature until analyses. Pomace samples were extracted immediately with dimethyl sulfoxide (DMSO), and OMWW were acidified with phosphoric acid at pH 2 in order to avoid the oxidation of the phenolic compounds. Both were kept frozen at -30°C for further analysis after two months of storage.

2.2. Phenolic compounds analysis by HPLC

The phenolic composition of olive oils was studied according to Medina, de Castro, Romero, and Brenes (2006). Briefly, an extraction of 0.6 mL of olive oil was obtained using 3×0.6 mL of *N,N*-dimethylformamide (DMF). The extract was washed with hexane, and N_2 was bubbled into the DMF extract to eliminate the residual hexane. Then, the extract was filtered (0.2 μm pore size) and 20 μL were injected into the chromatograph. The extraction of phenolic compounds from pomace was based on methodology reported elsewhere (Romero, Medina, Mateo, & Brenes, 2017). Around 10 g of pomace was mixed in an Ultra-Turrax homogenizer (Ika, Breisgau, Germany) with 30 mL DMSO. After 30 min of resting contact, the mixture was centrifuged at $6000 \times g$ for 5 min (22°C). Then, an aliquot of 250 μL of DMSO extract was mixed with 250 μL of internal standard (0.2 mM syringic acid in DMSO) and 500 μL of DMSO. For the case of OMWW, 250 μL of samples were centrifuged and mixed with 250 μL of internal standard (2 mM syringic acid in distilled water) and 500 μL of distilled water. Finally, all samples were filtered through a 0.22 μm pore size nylon filter and an aliquot (20 μL) was injected into the chromatograph. The chromatographic system consisted of a Waters 717 plus autosampler, a Waters 600 E pump, a Waters column heater module and a Waters 996 photodiode array detector (PDA). For olive oils samples was also used a Jasco FP-920 fluorescence detector (Jasco, Tokyo, Japan). They were connected in series and operated with Empower 2.0 software (Waters Inc.). A 25 cm \times 4.6 mm i.d., 5 μm Spherisorb ODS-2 (Waters) column at a flow rate of 1 mL min $^{-1}$ and a temperature of 35°C was used in all experiments. Separation was achieved by gradient elution using (A) water (pH 2.5 adjusted with 0.15% phosphoric acid) and (B) methanol described by Ramírez, Medina, Brenes, and Romero (2014). Phenolic

compounds were monitored at 240, 280 and 320 nm with the PDA detector and the fluorescence detector only for olive oil samples. The evaluation of each compound was performed using a regression curve with the corresponding standard. Hydroxytyrosol (Hy), luteolin, luteolin 7-glucoside, rutin and apigenin were purchased from Extrasynthese SA (Genay, France). Hydroxytyrosol glycol, tyrosol (Ty), 4-ethylphenol, caffeic, *p*-coumaric and vanillic acids were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Hydroxytyrosol 1-O-glucoside, salidroside, ester of caffeic acid and comselogoside were quantified using the response factors of Hy, Ty, caffeic acid, and *p*-coumaric acid, respectively. Hydroxytyrosol 4-O-glucoside, pinosresinol, 1-acetoxypinosresinol, the elenolic acid (EA), the oleuropein aglycon (HyEA) and ligustroside (TyEA), and the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid free (EDA) or linked to hydroxytyrosol (HyEDA) or tyrosol (TyEDA) were obtained by semi-preparative HPLC (Medina, Brenes, Romero, García, & de Castro, 2007; Medina, Romero, Brenes, de Castro, & García, 2008). The analyses were performed in duplicate.

The identification of the isolated phenolic compounds from the extract was made using a HPLC-MS system described by Susamci, Romero, Tuncay, and Brenes (2017). The chromatographic system consisted of a Waters 2695 Alliance with a pump, column heater and autosampler modules, and the detection was carried out with a Waters 2998 photodiode array detector and a mass single-quadrupole detector (QDa, Waters, USA). The QDa mass detector was operated in the negative mode (ESI $^{-}$), the capillary voltage was set at 0.8 kV, the cone voltage to 15 V, and nitrogen was used as nebulizer gas with de-solvation temperature set at 600°C . The flow rate was 1 mL/min, and the column, solvent and gradient conditions were the same as mentioned above.

Total phenolic compounds in olive oils is the sum of Hy, Hy glycol, Tyr, 4-ethylphenol, pinosresinol, 1-acetoxypinosresinol, apigenin, vanillin, luteolin, *p*-coumaric acid, EDA, HyEDA, TyEDA, EA, HyEA and TyEA. Total phenolic compounds in pomace is the sum of Hy, Hy 1-O-glucoside, Hy 4-O-glucoside, Ty, salidroside, HyEDA, rutin, luteolin, luteolin 7-glucoside, *p*-coumaric acid, vanillic acid, caffeic acid, ester of caffeic acid, and comselogoside. Total phenolic compounds in OMWW is the sum of Hy, Hy glycol, Hy 1-glucoside, Hy 4-glucoside Ty, salidroside, EDA-like, HyEDA, EA, caffeic acid, ester of caffeic acid and comselogoside.

2.3. Isolation of phenolic compounds

OMWW SP (generated from Sigoise cultivar by a traditional extraction by pressure) was selected because it contained less solids in suspension and was easier to handle. A 1:1 (v:v) mixture of OMWW SP and ethyl acetate was vortexed for 1 min and then centrifuged at 9.000 g for 5 min. This step was repeated five times. Ethyl acetate extract was evaporated under vacuum in a rotavapor at 35°C and suspended in distilled water (pH 5) using the same initial volume. A blank of ethyl acetate extract with water was also performed. Furthermore, the OMWW (SP) was centrifuged at 9.000 g for 5 min and ultrafiltered through a membrane of 3000 Da (Whatman, Sigma-Aldrich).

Phenolic compounds (Hy 1-O-glucoside, EDA-like and EA) were isolated from the ethyl acetate extract by analytical HPLC. The column, gradient and equipment were the same as those used for the phenolic compound analysis. Aqueous mobile phase was acidified with 2 N HCl (522 $\mu\text{L/L}$). Fractions were collected peak-by-peak manually. The pooled extract for each peak was evaporated under vacuum to dryness, and the residue was dissolved in acetic acid/sodium acetate buffer (pH 5.0). Finally, the concentration of each compound was measured by HPLC. A control run of HPLC was also performed injecting deionized water and collecting the corresponding fractions.

2.4. Bacterial strains and culture conditions

Pseudomonas fluorescens (CECT 378), *Staphylococcus aureus* (CECT

239), *Escherichia coli* (CECT 434), and *Enterococcus faecalis* (CECT 481) were obtained from the Spanish Type Culture Collection (Burjasot, Valencia, Spain). *P. fluorescens*, *S. aureus*, and *E. coli* were cultured in nutrient broth prepared with (g/L) “Lab-Lemco” powder (Oxoid) 5, Neutralized bacteriological peptone (Oxoid) 10, NaCl 5 and agar 15 for solid medium (pH 7.2). *E. faecalis* was cultured in Brain Heart Infusion (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) with or without 1.5% agar. *P. fluorescens* was cultured at 29 °C, and other strains were cultured at 37 °C. These strains were chosen as they are commonly used in antimicrobial testing (European Standard EN 1276, 1997). All strains were kept at - 80 °C in the adequate culture broths with glycerol (15–20%) until use. Every target strain was cultured twice in its corresponding broth, from the frozen stock, before testing, and overnight cultures were routinely used for inoculum preparation.

2.5. Antimicrobial assays

Three olive oils and OMWW (RC, SP and BC) were selected according to the concentration of total polyphenols: low, intermediate and high phenolic concentration, respectively. RC was obtained from Rougette cultivar by 3-phase continuous extraction, BC from Blanquette cultivar by 3-phase continuous extraction, and SP from Sigoise cultivar by traditional pressure extraction.

An antimicrobial test was performed with all strains against the selected OMWW. The pH of the OMWW were adjusted to 5.5, filtered through 0.22 µm of diameter, and diluted with sterile water at pH 5.5 before use. One mL of OMWW (at concentrations of 0.25, 0.50, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 and 60%) was inoculated and mixed with 50 µL of an overnight culture of the target microorganism diluted with saline solution (0.85 g/100 mL NaCl) to get an initial population between 5.51 and 6.07 log CFU/mL. The mixture was incubated at room temperature for 30 min and vortexed occasionally. After treatment, culturable survivors were determined by plating these mixtures or the corresponding decimal dilutions (0.1% peptone water) on the appropriate solid media plating with a Spiral Plater (Don Whitley Sci. Ltd., model WASP 2, Shipley, U.K.). Colonies were enumerated with an automated counter (Counterstat, IUL Instruments, Barcelona, Spain). A control with water was performed and the antimicrobial test was performed in duplicate. The minimal bactericidal concentrations (MBC) of OMWW under these experimental conditions were determined as the lowest concentrations at which 3-log drops in CFU per milliliter were obtained (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999).

The bactericidal activity assay of olive oil was based on the method reported by Medina et al. (2006). A 2 mL mixture (1:1) of olive oil with sterilized phosphate-buffered saline with Tween 20 (Sigma-Aldrich) was inoculated with 50 µL of the refreshed target strain previously diluted with saline solution to obtain an initial inoculum between 5.90 and 5.70 log CFU/mL. The mixture was incubated at room temperature for 30 min with occasional shaking and then plated to count survivors on appropriate media. Controls with no oil were also performed. Trials were carried out in duplicate. This test was performed with the oils RC, BC and SP against all strains.

The strain *S. aureus* CECT 239 was chosen for testing the effect of the ethyl acetate extract of OMWW SP, the OMWW extracted, ultra-filtered and isolated compounds. A mixture of 200 µL of isolated compounds at different concentrations was inoculated with a 50 µL of an overnight culture of the microorganism diluted with saline solution (0.85 g/100 mL NaCl) to get an initial population of 5.86 log CFU/mL. The mixture was incubated at room temperature for 30 min and viable count was determined by plating as mentioned before. Isolated compounds were tested at a concentrations range of 8–69 mg/L for Hy, 19–150 mg/L for EDA, and 40–320 mg/L for EA. They corresponded to concentrations found in the OMWW SP diluted at 2.5–20%. Isolated compound solutions were prepared diluting with sterile acetic acid/sodium acetate buffer at pH 5.5. The experiments were carried out in duplicate and a blank with mobile phases from HPLC was performed as

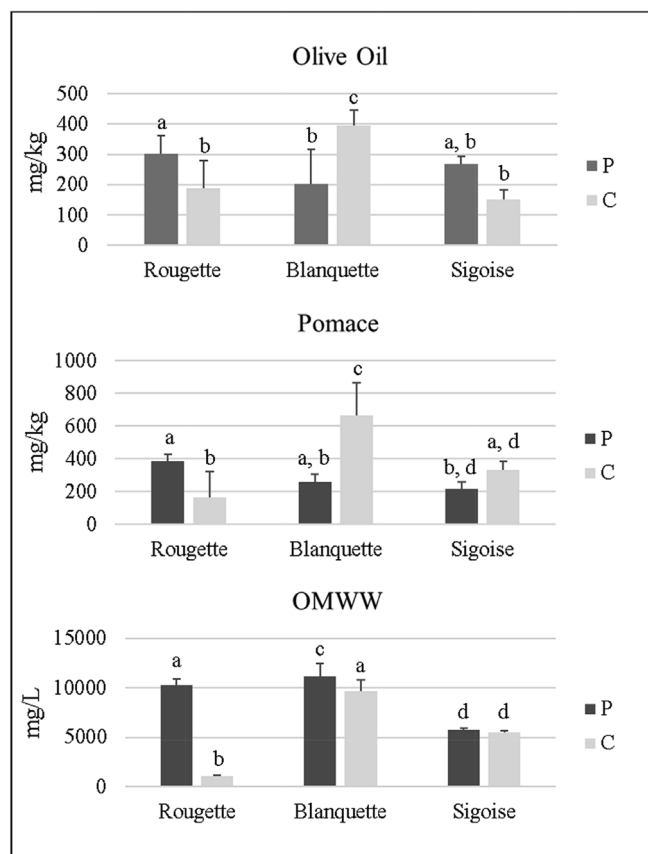


Fig. 1. Total phenolic compounds in olive products from cv. Rougette, cv. Blanquette and cv. Sigoise. See section 2.2 for the sum of single phenolic compounds. Three samples of each cultivar were run in duplicates. P corresponds to traditional discontinuous by pressure, and C corresponds to 3-phase continuous by centrifugation. Bars show standard deviation. Same letters within the same columns designates no statistically significant differences ($p < 0.05$) according to the Duncan's New Multiple Range Test.

a control.

2.6. Statistical analysis

Data were expressed as mean values and standard deviations (SD) were calculated. Comparison among mean variables was carried out by the Duncan's multiple range tests and the differences considered significant when $p < 0.05$. Statistica software version 7.0 was used for data processing (Statistica for Windows, Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

3.1. Phenolic compounds in olive products

The phenolic composition in olive products obtained by traditional discontinuous and 3-phase centrifugal systems for the three Algerian cultivars studied is shown in Fig. 1, Figs. S1 and S2. Virgin olive oil obtained from cv. Blanquette by 3-phase centrifugal system showed the highest concentration of total phenols (395 mg/kg of oil), significantly higher than for traditional pressure extraction (202 mg/kg of oil). By contrast, Rougette and Sigoise cultivars presented higher phenolic concentrations extracted by traditional system (300 and 267 mg/kg of oil, respectively) than 3-phase (187 and 150 mg/kg of oil, respectively), although this difference was only significant for the cv. Rougette. The same tendency was observed for the phenolic composition in olive pomace (Fig. 1). The highest phenolic concentration was found for the cv. Blanquette by the 3-phase extraction (661 mg/kg of pomace) and the lowest for the cv. Rougette with the same system (165 mg/kg of

pomace). There were no significant differences between the extraction systems for the cv. Sigoise. The virgin olive oils analyzed presented a phenolic content in line with those obtained by Douzane et al. (2013). However, other authors have quantified higher concentrations of phenolic compounds for the Blanquette cultivar (Laincer et al., 2016). This variability of concentration among the same cultivars depends on many factors, including geography, agronomy, seasons and environmental factors. According to Klen and Vodopivec (2012), the traditional press system provides a higher transfer rate of phenols to oil than the 3-phase centrifuge. This corresponds to the Rougette and Sigoise cultivars studied, whereas it is not fulfilled for the Blanquette cultivar. Regarding the oil extraction system in this study, there were no conclusive differences between the different oil extraction processes.

The majority of phenols of the olive fruits were flushed away with the wastewater generated in olive oil production, only 0.3–1.5% from total polyphenols are found in the olive oil (Klen & Vodopivec, 2012). The highest phenolic concentration was found in the OMWW, which ranged from 10,030 to 1184 mg/L for the Rougette cultivar, 11,155 and 9690 mg/L for the Blanquette cultivar, and 5760 and 5469 mg/L for the Sigoise cultivar by traditional pressure system and 3-phase respectively. OMWW from Rougette and Blanquette cultivars exhibited much higher polyphenols by traditional than 3-phase extraction systems, unlike that observed for other Algerian olive cultivars (Aggoun et al., 2016). Otherwise, there were no significant differences for the Sigoise cultivar.

3.2. Antimicrobial activity of olive products

Three OMWW (RC, BC and SP) were selected for antimicrobial tests according to their concentration in total polyphenols (Table 1). The OMWW generated from cv. Blanquette BC showed the highest phenolic content (10,828 mg/L), ten times more than OMWW RC from cv. Rougette (1096 mg/L). Both were obtained by a 3-phase continuous olive oil extraction system. The OMWW from cv. Sigoise generated by traditional pressure system (SP) showed an intermediate concentration in total polyphenols (5762 mg/L). Among all the phenolic compounds, Hy, Hy 4-O-glucoside, EDA-like and EA composed around 90% of the total phenols and derivatives. To a lesser extent, hydroxytyrosol glycol, Hy 1-O-glucoside, tyrosol and salidroside showed lower concentrations, being very low or null for caffeic acid and caffeic acid ester (Table 1). No oleuropein concentration was found in any samples.

Several dilutions of these OMWWs were inoculated with selected microbial strains to get the MBC shown in Table 2. After 30 min of incubation at room temperature, the highest antimicrobial activity corresponded to OMWW BC, which also presented the highest phenolic content. This OMWW reduced 3 log units of the 4 strains tested when the concentration of total polyphenols was 2.5%. The OMWW SP showed a MBC of 10% for *E. coli* and 5% for the rest of the microorganisms. The lowest activity was observed for OMWW RC that

Table 1
Phenolic composition (mg/L) of OMWWs and their extracts used for the antimicrobial assays.

Compound	RC	BC	SP	SP extract	Extracted SP	SP ultrafiltered
Hy Glycol	150 ^a (21)	230 (4)	258 (0)	132 (2)	159 (8)	325 (22)
Hy 1-O-Glucoside	27 (5)	23.8 (0)	23 (4)	–	–	–
Hydroxytyrosol	108 (5)	1409 (63)	427 (11)	348 (2)	102 (3)	465 (10)
Hy 4-O-Glucoside	211 (11)	3150 (73)	1748 (92)	54 (3)	1897 (142)	1927 (91)
Salidroside	33 (3)	265 (2)	125 (5)	–	119 (9)	135 (1)
Tyrosol	14 (3)	76 (7)	425 (4)	53 (2)	–	54 (0)
Caffeic acid	–	3 (1)	1 (0)	–	–	–
Ester of caffeic	–	1 (0)	1 (0)	–	–	–
Comselogoside	–	1 (1)	2 (1)	1 (0)	–	–
EDA-like	465 (31)	3828 (359)	1252 (46)	1118 (23)	0 (0)	1237 (13)
EA	87 (2)	1840 (131)	1884 (4)	1582 (15)	0 (0)	1805 (6)
Total phenols	1096 (60)	10828 (344)	5762 (118)	3287 (16)	2277 (162)	5949 (129)

^a Data are the mean of duplicates. Standard deviation shown in parentheses. Abbreviation: cv. Rougette (R), cv. Blanquette (B), cv. Sigoise(S), traditional by pressure (P) and 3-phase continuous by centrifugation (C). See section 2.2 for phenolic compounds abbreviations.

Table 2
MBCs of OMWWs against target bacteria.

OMWW	MBC (%)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>
RC	60	> 60	60	> 60
SP	5	5	10	5
BC	2.5	2.5	2.5	2.5

showed a MBC of 60% for *S. aureus* and *E. coli* and more than 60% for *E. faecalis* and *P. fluorescens*.

As mentioned, OMWWs are sources of phenolic compounds which are known to exhibit antimicrobial effects (Leoufoudi, Harnafi, & Zyad, 2015; Thielmann, Kohlen, & Hauser, 2017), but this activity cannot be assigned to a particular substance or to the polymeric fraction of this liquid. To elucidate the compounds responsible for this antimicrobial activity, OMWW SP was subjected to a phenolic extraction with ethyl acetate. The extract was enriched in Hy, Tyr, EDA-like and EA (Table 1), and the extracted OMWW held Hy 4-O-glucoside and salidroside. Only the Hy glycol was found in both phases at similar concentration. In parallel, the OMWW SP was ultrafiltered through a membrane of 3000 Da to remove the polymers so that simple phenols remained in the filtered OMWW at the same concentration than the original (Table 1). The SP extract of phenolic compounds, the extracted OMWW SP and the ultrafiltered OMWW SP were inoculated with *S. aureus* and the antimicrobial activity is shown in Fig. 2A. After 30 min of contact, the ultrafiltered OMWW SP exerted the same MBC (5%) as the non-filtered. The extract of OMWW SP at 5% reduced around 2 log units and reached the MBC at 10% presenting good bactericidal properties. Nevertheless, the extracted OMWW SP reached the MBC at a concentration of 40%. During the extraction, certain phenolic compounds such as Hy, EDA-like and EA diffused to the ethyl acetate extract and, consequently, the antimicrobial activity in the extracted OMWW decreased. Some of these compounds were isolated from the extract by HPLC, identified by MS-HPLC. The MS spectra of isolated compounds exhibited a signal at *m/z* 153 and 241 for hydroxytyrosol and EA respectively, as previously described by Medina et al. (2007). EDA-like exhibited a signal at *m/z* 199 (Fig. S3) as previously described for the first time by Medina et al. (2011), and subsequently characterized as (E)-3-(1-oxobut-2-en-2-yl) glutaric acid (Rubio-Senen, Martos, García et al., 2015).

Isolated compounds were tested individually against *S. aureus* (Fig. 2B). Neither hydroxytyrosol nor EA showed antimicrobial activity at concentrations studied. The same results were obtained for hydroxytyrosol, its glucosides, and tyrosol against lactic acid bacteria (Medina et al., 2007). Only the EDA-like compound showed antimicrobial activity at a concentration of 150 mg/L, which corresponded

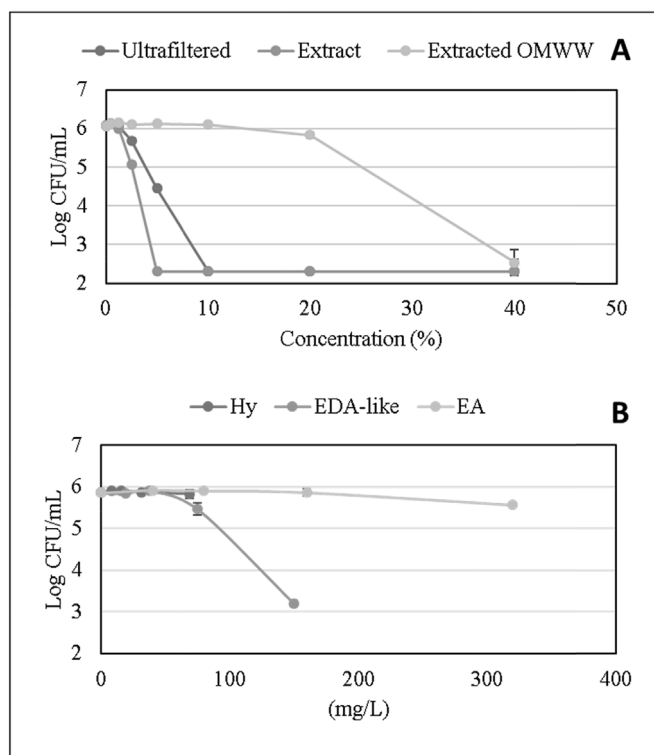


Fig. 2. Antimicrobial activity of OMWW SP extract (panel A) and isolated phenolic compounds (panel B) against *S. aureus* after 30 min of contact. Bars means standard deviations. See section 2.1 for abbreviations.

to the content found in the OMWW extract when it was diluted to around 13%. Hence, this antimicrobial activity agrees with the MBC found for the extract.

The antimicrobial activity of OMWW has widely been studied and several compounds have been attributed as responsible (Capasso et al., 1995; Obied, Bedgood, Prenzler, & Robards, 2007) but any individual compound explained this bioactivity by itself. However, it has been demonstrated that the most bactericidal compounds in olive products are glutaraldehyde-like compounds such as HyEDA and EDA (Medina, Brenes, García, Romero, & de Castro, 2009). EDA is an oleuropein derivative well studied in table olive elaborations (Medina et al., 2008). The presence of a dialdehydic structure in the molecule of EDA confers a strong antimicrobial activity, which is similar to that of the commercial biocide glutaraldehyde (Medina et al., 2009). In alperujo, the compound EDA-like is detected in high concentrations (Medina et al., 2011) and its origin has been suggested to be the antimicrobial EDA by a hydrolytic reaction during the storage and/or processing. The MS spectra differ in an oxygen atom from m/z 183 and 199 for EDA and EDA-like respectively. Although EDA-like had less antimicrobial activity against *Pseudomonas savastoni* (Medina et al., 2011), the high amount of EDA-like compound present in the OMWW explains their bactericidal properties against bacteria and other phytopathogenic microorganisms (Medina et al., 2011; Rubio-Senent et al., 2015).

3.3. Antimicrobial activity of virgin olive oil

In the same way as OMWW, three virgin olive oils were selected for antimicrobial activity testing against target microorganisms. BC oil showed the highest concentration in total polyphenols (452 mg/kg of oil), followed by SP (370 mg/kg of oil) and RC (126 mg/kg of oil) (Table 3). Among the phenolic compounds, Hydroxytyrosol and tyrosol derivatives are the most abundant in the olive oil, where HyEA, HyEDA, TyEA and TyEDA are the majority. Also, the lignans pinoreosin and 1-acetoxypinoresin were found at high concentrations in all the olive

Table 3
Phenolic compounds (mg/kg of oil) of olive oils used in the antimicrobial assays.

Compounds	Olive Oil		
	RC	BC	SP
Hydroxytyrosol	11 ^a (1)	5 (0)	9 (0)
Hy Glicol	–	1 (0)	2 (0)
Hy- EDA	–	27 (0)	16 (3)
Hy- EA	11 (1)	99 (11)	66 (2)
Tyrosol	1 (0)	11 (1)	19 (2)
Ty - EDA	18 (4)	38 (1)	28 (0)
Ty- EA	7 (0)	185 (21)	142 (4)
4-ethylphenol	8 (0)	–	–
Pinoreosinol	52 (3)	62 (1)	62 (6)
1- Acetoxypinoresinol	16 (1)	22 (2)	24 (2)
Luteolin	2 (0)	2 (0)	2 (0)
Apigenin	1 (0)	1 (0)	1 (0)
Total phenols	126 (8)	452 (35)	371 (13)

^a Data are the mean of duplicates. Standard deviation shown in parentheses. See section 2.1 and 2.2 for abbreviations.

oils (Table 3). After inoculation and 30 min of contact with the oils (50%), only BC showed antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. faecalis* (Fig. 3). This oil reduced the initial inoculum by more than 3 log units and no effect was observed for the rest of the oils and strains. Laincer et al. (2014) found a high antimicrobial activity in Algerian virgin olive oils against *S. aureus* and *Bacillus subtilis*. This bactericidal activity was attributed to the phenolic compounds of olive oil as being mainly responsible (Brenes et al., 2007). The effect of each individual phenolic compound was studied *in vitro* and showed that TyEDA and HyEDA presented a potent antimicrobial activity (Romero, Medina, Vargas, Brenes, & de Castro, 2007) due to the presence of the dialdehydic structure in their molecules (Medina et al., 2009). Both compounds possess the EDA structure linked to the phenols tyrosol and hydroxytyrosol respectively, that increases their lipophilic character and antibacterial efficacy. The results obtained in this work are in agreement with the previous studies. The BC olive oil presented higher concentrations of the oleuropein and ligustrosin derivatives than RC and SP oils (Table 3) which is related to a higher antimicrobial activity.

4. Conclusions

The results obtained in the present work have characterized the phenolic profile of products generated during olive oil extraction of three Algerian olive cultivars. Regarding the phenolic composition of olive products, no significant differences were found between the traditional discontinuous press and 3-phase centrifugal olive oil extraction processes. The antimicrobial test with isolated phenolic compounds revealed that EDA-like possesses a high bactericidal activity *in vitro*, and the high concentrations in the OMWW can explain the antimicrobial properties of this by-product. Moreover, the presence of glutaraldehyde-like compounds such as TyEDA and HyEDA in the virgin olive oils confer them with a strong antimicrobial activity. These results support that the high amount of antimicrobial compounds in the products derived from olive oil extraction such as virgin olive oil, pomace and OMWW, are a good source of natural antimicrobials with potential in healthcare, animal feed, the food industry or as pesticides in agriculture.

Acknowledgements

This research was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the Spanish Government (Project AGL2016-76820-R, AEI / FEDER, UE).

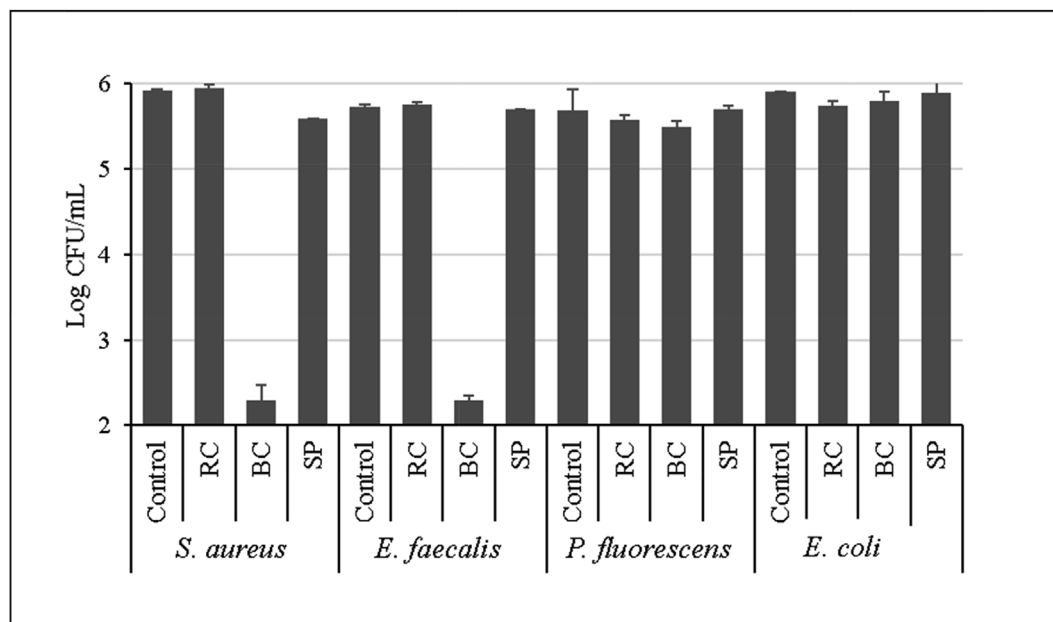


Fig. 3. Antimicrobial activity of olive oils against targeted microorganisms after 30 min of contact. Test was run in duplicates. Bars means standard deviations.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.044>.

References

- 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.
- Bengana, M., Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Amir, Y., Youyou, A., Segura-Carretero, A., et al. (2013). Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil. *Food Research International*, *54*, 1868–1875.
- Brenes, M., García, A., de los Santos, B., Medina, E., Romero, C., de Castro, A., et al. (2011). Olive glutaraldehyde-like compounds against plant pathogenic bacteria and fungi. *Food Chemistry*, *125*, 1262–1266.
- Brenes, M., Medina, E., Romero, C., & de Castro, A. (2007). Antimicrobial activity of olive oil. *Agro Food Industry Hi-tech*, *18*, 6–8.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcalis, M. A., & Cristinzio, G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill wastewaters. *Journal of Applied Bacteriology*, *79*, 393–398.
- Chatzistathis, T., & Koutsos, T. (2017). Olive mill wastewater as a source of organic matter, water and nutrients for restoration of degraded soils and for crops managed with sustainable systems. *Agricultural Water Management*, *190*, 55–64.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Mouti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, *48*, 1532–1552.
- Douzane, M., Tamendjari, A., Abdi, A. K., Daas, M. S., Mendid, F., & Bellal, M. M. (2013). Phenolic compounds in mono-cultivar extra virgin olive oils from Algeria. *Grasas y Aceites*, *64*, 285–294.
- D'Angelo, S., Ingrosso, D., Migliardi, V., Sorretino, A., Donnarumma, G., Baroni, A., et al. (2005). Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology & Medicine*, *38*, 908–919.
- El-Abbassi, A., Kiai, H., & Hafidi, A. (2012). Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*, *132*, 406–412.
- European Standard EN 1276 (1997). *Chemical disinfectants and antiseptics—quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used*.
- IOC, International Olive Council. *World table olive figures*. (2017). Available from <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures> Accessed 2017 Sep.
- Klen, T. J., & Vodopivec, B. M. (2012). The fate of olive fruit phenols during commercial olive oil processing: Traditional press versus continuous two- and three-phase centrifuge. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, *49*, 267–274.
- Laincer, F., Iaccarino, N., Amato, J., Pagano, B., Pagano, A., Tenore, G., et al. (2016). Characterization of monovarietal extra virgin olive oils from the province of Béjaïa (Algeria). *Food Research International*, *89*, 1123–1133.
- Laincer, A., Laribi, R., Tamendjari, A., Arrar, L., Rovellini, P., & Venturini, S. (2014). Olive oils from Algeria: Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities. *Grasas y Aceites*, *65* e001.
- Laribi, R., Rovellini, P., Deflaoui, L., Aidli, A., Mettouchi, S., Arrar, L., et al. (2009). Evolution of biophenolic compounds in virgin olive oil during olive ripening of Algerian cultivars. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, *86*, 151–161.
- Leouifoudi, I., Harnafi, H., & Ziad, A. (2015). Olive mill waste extracts: Polyphenols content, antioxidant, and antimicrobial activities. *Advances in Pharmacological Sciences*, *2015* 714138.
- McNamara, C. J., Anastasiou, C. C., O'Flaherty, V., & Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *61*, 127–134.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A., & de Castro, A. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 9817–9823.
- Medina, E., Brenes, M., García, A., Romero, C., & de Castro, A. (2009). Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products. *Journal of Food Protection*, *72*, 2611–2614.
- Medina, E., de Castro, A., Romero, C., & Brenes, M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oil and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 4954–4961.
- Medina, E., Romero, C., Brenes, M., de Castro, A., & García, A. (2008). Profile of anti-lactic acid bacteria compounds during the storage of olives which are not treated with alkali. *European Food Research and Technology*, *228*, 133–138.
- Medina, E., Romero, C., de los Santos, B., de Castro, A., García, A., Romero, F., et al. (2011). Antimicrobial activity of olive solutions from stored alpeorjuo against plant pathogenic microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 6927–6932.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A*. Wayne, PA: National Committee for Clinical. Laboratory Standards.
- Obied, H. K., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 1238–1248.
- Ramírez, E., Medina, E., Brenes, M., & Romero, C. (2014). Endogenous enzymes involved in the transformation of oleuropein in Spanish table olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 9569–9575.
- Romero, C., Medina, E., Mateo, M. A., & Brenes, M. (2017). New by-products rich in bioactive substances from the olive oil mill processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8460>wileyonlinelibrary.com.
- Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., & de Castro, A. (2007). In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 680–686.
- Rubio-Senent, F., Martos, S., García, A., Fernández-Bolaños, J. G., Rodríguez-Gutiérrez, G., & Fernández-Bolaños, J. (2015b). Isolation and characterization of a secoiridoid derivative from two-phase olive waste (alperujo). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 1151–1159.
- Rubio-Senent, F., Martos, S., Lama-Muñoz, A., Fernández-Bolaños, J. G., Rodríguez-Gutiérrez, G., & Fernández-Bolaños, J. (2015a). Isolation and identification of minor secoiridoids and phenolic components from thermally treated olive oil by-products. *Food Chemistry*, *187*, 166–173.
- Susanci, E., Romero, C., Tuncay, O., & Brenes, M. (2017). An explanation for the natural de-bittering of Hurma olives during ripening on the tree. *Grasas y Aceites*, *68* e182.
- Thielmann, J., Kohnen, S., & Hauser, C. (2017). Antimicrobial activity of *Olea europaea* Linné extracts and their applicability as natural food preservative agents. *International Journal of Food Microbiology*, *251*, 48–66.
- Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosio, R., Villa, M., Galli, G., et al. (2005). Virgin olive oil study (VOLOS): Vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *European Journal of Nutrition*, *44*, 121–127.